



HAL
open science

La composition des thèques d'amibes xénosomiques : utilisation potentielle comme bio-indicateur des dépôts de particules d'origine atmosphérique

Maxence Delaine

► **To cite this version:**

Maxence Delaine. La composition des thèques d'amibes xénosomiques : utilisation potentielle comme bio-indicateur des dépôts de particules d'origine atmosphérique. Biologie cellulaire. Université de Franche-Comté, 2016. Français. NNT : 2016BESA2017 . tel-01458824

HAL Id: tel-01458824

<https://theses.hal.science/tel-01458824v1>

Submitted on 6 Mar 2017

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.

Université de Bourgogne – Franche Comté

U.F.R. DES SCIENCES, TECHNIQUES ET GESTION DE L'INDUSTRIE

Laboratoire CHRONO-ENVIRONNEMENT

(UMR CNRS/UFC 6249, Usc INRA)

Ecole Doctorale « Environnements - Santé »



Thèse en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE- FRANCHE COMTE

Spécialité : Sciences de la Vie et de l'Environnement



Composition des thèses d'amibes xénosomiques : utilisation potentielle comme bio-indicateur des dépôts de particules d'origine atmosphérique

Présentée et soutenue publiquement par

Maxence DELAINE

Le 19 novembre 2016



Composition du Jury :

Urania CHRISTAKI , Professeur, Université du Littoral-Côte-d'Opale	Rapporteur
Taniel DANELIAN , Professeur, Université Lille 1	Rapporteur
Martine BUATIER , Professeur, Université de Bourgogne- Franche Comté	Examineur
Daniel GILBERT , Professeur, Université de Bourgogne - Franche Comté	Examineur
Nadine BERNARD , Professeur, Université de Bourgogne - Franche Comté	Directrice de thèse
Eric ARMYNOT DU CHATELET , Maître de conférences, Université Lille 1	Directeur de thèse
François GUILLOT , Chercheur libre HDR, Université Lille 1	Membre invité
Philippe RECOURT , Ingénieur d'études HC, Université Lille 1	Membre invité

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement mes directeurs de thèse, Nadine Bernard et Eric Armynot du Châtelet, pour tous les conseils qu'ils m'ont prodigué, leur investissement et leur disponibilité, et surtout pour avoir fait en sorte que cette thèse soit dirigée d'une manière irréprochable. Sans vous, je n'aurais jamais réussi à produire un travail de cette qualité.

Je remercie également Urania Christaki et Taniel Danelian qui ont accepté d'être rapporteurs de ces travaux de recherche, ainsi qu'à Martine Buatier et Daniel Gilbert pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Un grand merci à l'ensemble des personnels du laboratoire Chrono-Environnement de Montbéliard et du laboratoire d'Océanologie et de Géosciences de Villeneuve d'Ascq, pour m'avoir accueilli durant ces 3 années. En particulier, merci à Marie-Laure Toussaint, pour son aide administrative et technique « délocalisée ».

J'aimerais également remercier l'ensemble du personnel technique du SN5, et en particulier Marion, Sandra, Romain et Sylvie. Merci à « mon secouriste du travail bien fait », Philippe, pour un milliard de choses, notamment ses conseils, son humeur légendaire, sa franchise, ses dosettes de café et aussi pour m'avoir cédé son bureau quand j'ai été mis à la porte du 2^{ème} étage par les « grands géologues ». Son aide technique et son soutien ont une part immense dans la réalisation et la qualité de l'ensemble des travaux de cette thèse. Il y aura toujours un dossier « Philippe » dans ma clé usb, au cas où j'aurais du contenu sympa à te transférer...

Je voudrais remercier tous mes collaborateurs dans mes travaux, ou à qui j'ai pu demander conseil durant ces 3 années, en particulier Viviane Bout-Roumazeilles, Annette Hofmann, Catherine Noiriél, François Guillot, Jean-Luc Potdevin, Edward Mitchell et Daniel Gilbert. Un merci très spécial à Leonardo Fernández, avec qui j'ai pu réaliser un « conte » né chez les polonais. Les plus belles thèques, c'est de toi que je les ai eues. Merci également à Jeannine Lherminier de l'INRA de Dijon, pour son accueil, son aide et ses conseils.

Merci à mes collègues doctorants avec qui j'ai pu pendant un temps partager le bureau : Fabio, Sandra et Matthieu. Merci au « litho-préparateur expert » Alexandre pour avoir été présent dans mon entourage depuis mon M2, et qui a toujours des bons sujets de discussion méthodo en réserve à partager.

Pour les échanges scientifiques enrichissants, merci à tous les collègues spécialistes des thécamœbiens à travers le monde, et plus particulièrement Anush Kosakyan, Dan Lahr, Yuri Mazei et Ferry Siemensma.

Parce qu'une thèse peut transformer un cerveau commun en yaourt, il faut impérativement que je remercie également l'ensemble des personnes ou des éléments qui m'ont aidé à décrocher pour m'oxygéner l'esprit. Ils ne le sauront jamais, mais merci quand même au génie Alexandre Astier et sa compagnie de Kaamelott avec qui on en a pas gros, merci à Fred et Seb du Grenier, aux dissidents Fanta et Bob et à Benzaïe pour leur présence au cours de mes nuits d'insomnie, merci à Peter Jackson, qui n'aurait pas dû se laisser aller depuis 2003. Merci aussi à Jeremy Soule, Yann Tiersen et Carlos Núñez pour avoir dorloté mes oreilles pendant mes séances de travail. Merci à l'acide acétylsalicylique d'exister. Merci au Père Barnard breton qui rafraîchit en été, et au calme qui règne du côté de Peumerit-Quintin.

Il est temps de remercier du fond du cœur ma famille et mes amis, qui m'ont encouragé, supporté, motivé, et (pour certaines) fait de super gamelles pour les repas du midi à la cafétéria du labo. Un énorme merci à mes parents et mes grands-parents pour avoir toujours été là pour moi et aidé du mieux qu'ils le pouvaient. Je n'en serais pas là aujourd'hui sans vous. Merci à Pauline (aka Chichi), Marjorie (aka la Truite), Jonathan (aka Touna), David (aka Tête de Chips) tout simplement d'être mes amis. Un merci spécial à mon témoin Maxime (aka Moux), pour m'avoir fait remarquer que « je donnais à manger à des bestioles qu'on voit pas », pour avoir accepté de m'accompagner dans la fameuse tourbière du Russey, et d'avoir eu envie de partager avec moi une fondue neuchâteloise légèrement hors-saison, un soir caniculaire d'été 2014 (« Le gras, c'est la vie ! »).

Un immense merci et un gros bisou à Nina, qui était ma fiancée en début de thèse, et qui est désormais mon épouse. Tu as été ma lumière qui m'a guidé pendant les périodes les plus sombres de ma thèse (et il y en a eu quelques-unes !). Merci à ma fille chérie Leia pour son infinie gentillesse qui transparait dans ses yeux ; t'inquiètes pas, tonton Moux va bientôt venir.

Table des matières

Introduction	25
Chapitre 1 - Synthèse bibliographique	31
1 Introduction aux amibes à thèques	33
1.1 Aperçu général	33
1.1.1 Définition	33
1.1.2 Répartition des amibes à thèques	34
1.2 Phylogénie	35
1.3 Biologie des amibes à thèques	42
1.3.1 Reproduction	42
1.3.2 Régime alimentaire	44
2 Les thèques d'amibes	46
2.1 Taille, structure et différents types de thèques	46
2.1.1 Les thèques protéiques	50
2.1.2 Les thèques agglutinées	50
2.1.3 Les thèques siliceuses	54
2.1.4 Les thèques calciques	54
2.2 Composition des thèques d'amibes	56
2.2.1 Nature de la matrice organique	56
2.2.2 Composition minérale des thèques	59
2.3 Paramètres influençant la composition des thèques d'amibes	62
3 Bio-indication à l'aide des amibes à thèques	64
3.1 Utilisation des communautés d'amibes à thèque en tant que bio-indicateurs	64
3.1.1 Bio-indicateurs des environnements terrestres et dulçaquicoles	64
3.1.2 Bio-indicateurs des environnements passés	65
3.1.3 Bio-indicateurs des environnements sous influence anthropique	71
3.2 Potentiel de bio-indication des thèques d'amibes xénosomiques	72
Chapitre 2 - Solutions analytiques et visuelles développées dans le cadre de l'étude des thèques d'amibes à l'aide de la microscopie électronique à balayage avec spectroscopie élémentaire	75
1 Préambule	77
2 Scanning Electron Microscopy with EDS applied to the study of testate amoebae shells	79
2.1 Introduction	80
2.2 Material	81

2.3	How to prepare testate amoebae shells for SEM imaging? _____	84
2.3.1	Overview _____	84
2.3.2	Selection of the support _____	84
2.3.3	Selection of the coating _____	85
2.4	How to observe the shell surface and sub-surface? _____	87
2.4.1	Characterization of the shell surface with SEC electrons _____	87
2.4.2	Characterization of deeply integrated grains with BSE electrons _____	87
2.5	How to determine the elemental chemistry of shell grains? _____	89
2.5.1	Detection and distribution of atomic elements with EDS mappings and composite _____	89
2.5.2	Point-chemical analyses and mineral identification _____	89
2.6	How to represent and visualize shells in 3D? _____	91
2.7	How to enhance visual illustration with false colored SEM images? _____	93
3	Exemples illustrant les différents types de thèques et la variabilité de leur composition _	95
3.1	Les types de thèques _____	95
3.2	Variabilité de la composition des thèques _____	95
3.2.1	Variabilité de la nature des idiosomes _____	95
3.2.2	Contenu en fer de la matrice organique _____	95
Chapitre 3 – Diversité de la composition des thèques d’amibes : Exemple de <i>Bullinularia indica</i> vivant dans les tapis de <i>Sphagnum capillifolium</i> _____		101
1	Préambule _____	103
2	Diversity of testate amoebae shell content: Example of <i>Bullinularia indica</i> living in <i>Sphagnum capillifolium</i> carpet _____	104
2.1	Abstract _____	105
2.2	Introduction _____	105
2.3	Materials and Methods _____	106
2.3.1	Study Site and Sampling _____	106
2.3.2	Stems, Shells, and PM Deposit Treatment _____	107
2.3.3	Shell and PM Deposit Analysis _____	108
2.3.4	Total and Relative Mineral Composition of Shells and PM Deposits _____	108
2.3.5	Grain Size of Mineral Particles Composing Shells and PM Deposits _____	109
2.4	Results _____	109
2.4.1	Characterisation of <i>B. Indica</i> Shells: Morphology and Content Diversity _____	109
2.4.2	Characterisation of the Surrounding Environment _____	113
2.5	Discussion _____	117
2.5.1	Comparing <i>B. Indica</i> Shell Content with the Surrounding Environment _____	117
2.5.2	<i>Bullinularia Indica</i> Grain Selection _____	117

2.5.3	Xenosomic Testate Amoebae Shell Potential as Mineral Background Bioindicator	118
2.6	Conclusion	118
2.7	Acknowledgements	119

Chapitre 4 – Incorporation de particules minérales allochtones dans les thèques de *Bullinularia indica* **121**

1 Préambule **123**

2 Casse-tête minéral chez les amibes à thèque xénosomiques : Analyse de la capacité des amibes à sélectionner la nature des grains minéraux pour construire leur thèque en utilisant des apports de différents types de particules allochtones **124**

2.1	Résumé	125
2.2	Introduction	125
2.3	Matériel et Méthodes	127
2.3.1	Site de l'étude	127
2.3.2	Choix des minéraux et préparation des particules minérales	127
2.3.3	Apports artificiels de particules et prélèvements de sphaigne	127
2.3.4	Traitement des sphaignes et des thèques	128
2.3.5	Analyse des thèques	129
2.3.6	Analyse des particules minérales et traçage des particules déposées	129
2.4	Résultats	129
2.4.1	Capacité de <i>B. indica</i> à intégrer des particules minérales allochtones	129
2.4.2	Variation de l'intégration des particules minérales en fonction de leur nature	132
2.4.3	Influence de la quantité de particules minérales déposées sur leur dynamique d'intégration dans les thèques	132
2.5	Discussion	135
2.5.1	Hétérogénéité de la composition minéralogique des lots	135
2.5.2	Absence d'intégration de phlogopite	135
2.5.3	Affinité pour les minéraux riches en silice et tactisme	136
2.5.4	Influence de la quantité de l'apport particulaire artificiel sur la dynamique d'intégration des particules	136
2.5.5	Implications dans l'usage de la composition des thèques en bio-indication	137
2.6	Conclusion	137

Chapitre 5 – Intégration de cryptotephres issus de l'éruption récente du volcan Puyehue au Chili dans les thèques d'amibes xénosomiques **145**

1 Préambule **147**

2 Cinderella’s helping pigeons of the microbial world: the potential of testate amoebae for identifying cryptotephra	148
2.1 Abstract	149
2.2 Introduction	149
2.3 Materials and Methods	152
2.3.1 Geographical setting	152
2.3.2 Sampling	152
2.3.3 Sample treatment and ESEM-EDS photographs	154
2.3.4 Determining the mineral composition of particles composing tephra and testate amoeba shells	155
2.3.5 Determining the total mineral composition of tephra and testate amoeba shells	155
2.4 Results and Discussion	157
2.4.1 Mineral composition of particles composing tephra	157
2.4.2 Mineral composition of particles composing testate amoeba shells	158
2.5 Conclusions	164
2.6 Acknowledgments	164
<i>Discussion générale</i>	171
1 Quelles sont les optimisations techniques apportées dans le cadre de cette thèse pour l'observation et la caractérisation des thèques d'amibes ?	174
1.1 Microscopie électronique à balayage avec EDS	174
1.2 Analyse d'images	175
2 Quels sont les paramètres permettant l'intégration des particules minérales d'origine atmosphérique chez les amibes à thèque?	177
2.1 Taille des particules	177
2.2 Nature des particules	177
2.3 Type de source particulaire	178
3 Est-il pertinent d'utiliser les thèques d'amibes comme indicateurs de dépôts atmosphériques particuliers ?	180
<i>Conclusions et Perspectives</i>	183
1 Conclusions	185
2 Perspectives à court terme	186
3 Perspectives à long terme	190
<i>Bibliographie</i>	194

Liste des figures

Chapitre 1

Fig.1 – Schéma d'une amibe à thèque, <i>Hyalosphenia papilio</i> , d'après Chardez, 1967a	34
Fig.2 – a. Les deux types majeurs de pseudopodes, Lobose et Filose, d'après Ogden et Hedley (1980) ; b. Schémas d'après Chardez (1967a) représentant les différentes mesures pouvant être effectuées sur les thèques afin de caractériser puis déterminer les espèces de thécamœbiens.....	37
Fig.3 – Arbre d'après Adl et al. (2012) représentant les différents supergroupes et les classes d'appartenance des amibes à thèque (encadrés en noir). Les Lobose font partie de la classe Tubulinea (e.g. genre <i>Diffflugia</i>) tandis que les Filose sont repartis dans les classes des Stramenopiles (e.g. genre <i>Amphitrema</i>) et des Cercozoa (e.g. genre <i>Euglypha</i>)	38
Fig.4 – Arbre phylogénétique des Lobose d'après Meisterfeld (2002), consultable sur le site internet « Tree of Life web project » : http://tolweb.org/Arcellinida/124471	39
Fig.5 – Schémas représentant les différents types morphologiques établis d'après Bonnet (1964) et histogramme de leur distribution au sein des 6 milieux représentatifs étudiés.....	41
Fig.6 – Schémas des 2 types de reproduction des thécamœbiens d'après Chardez (1967a). a. La division mitotique et ses 3 variantes connues chez les amibes à thèque : la promitose,	43
Fig.7 – Image en microscopie électronique à balayage de <i>Heleopera petricola</i> en train d'attaquer une de ses proies favorites, <i>Tracheleuglypha dentata</i> (Coûteaux et Ogden, 1988). La barre d'échelle de gauche mesure 20µm.....	45
Fig.8 – Schéma hypothétique des correspondances morphologiques pour l'ensemble des <i>Diffflugia</i> pyriformes et corniculées, mettant en évidence les variations conduisant aux espèces, variétés et formes actuelles, de Chardez (1974)	48
Fig.9 – Schéma représentant les 4 différents types de thèques d'amibes principaux : protéiques, agglutinées, siliceuses et calciques et leurs variantes intrinsèques	49
Fig.10 – Images obtenues en microscopie électronique à balayage (MEB, a-b) et à transmission (MET, c) montrant la structure alvéolaire de la matrice organique des thèques organiques du genre <i>Arcella</i> . a : plusieurs vues de l'espèce <i>Arcella gibbosa</i> par Ogden & Hedley (1980) ; b : zoom sur les alvéoles de <i>Arcella hemisphaerica</i> (a) et <i>Arcella gibbosa</i> (b) par Meisterfeld (2002a) ; c : section tangente (MET) de <i>Arcella vulgaris</i> montrant les alvéoles (TA) et les puits intercalaires (flèches) dans Mignot et Raikov (1990)	52
Fig.11 - Images MEB des 3 variantes de recyclage de particules des thèques agglutinées (Ogden et Hedley, 1980) : les espèces qui recyclent les xénosomes (e.g. <i>Diffflugia oblonga</i>), à la fois xénosomes et idiosomes (e.g. <i>Heleopera sphagni</i>) ou des micro-squelettes (e.g. <i>Diffflugia bacillifera</i>) pour construire leur thèque	53

- Fig.12 – Images MEB montrant les 2 types de thèques à idiosomes siliceux (Ogden et Hedley, 1980). A gauche, une espèce du groupe des thèques autogènes à idiosomes siliceux (e.g. *Euglypha compressa*) ; à droite, une espèce faisant du groupe des thèques autogènes à idiosomes siliceux recouverts d'un vernis organique (e.g. *Assulina muscorum*) 55
- Fig.13 – Images MEB d'individus représentatifs des 2 types de thèques calciques : à gauche, *Paraquadrula irregularis*, qui sécrète des idiosomes calciques (image d'Eckhard Voelcker, visible sur le site de Ferry Siemensma <http://www.arcella.nl>) et *Cryptodifflugia oviformis*, qui sécrète une épaisse couche de phosphate de calcium amorphe et la recouvre d'un vernis organique (Ogden et Hedley, 1980)..... 56
- Fig.14 – Images en microscopie confocale laser à balayage de 3 espèces d'après Burdiková et al., 2010 (de gauche à droite : *Nebela tincta*, *Trigonopyxis arcula* et *Tracheleuglypha dentata*) dont certaines zones des thèques fluorescent en rouge suite au marquage à la fuschine acide. La fuschine acide cible la chitine, les vacuoles et le cytoplasme. Les barres d'échelles mesurent respectivement 20, 30 et 10µm..... 58
- Fig.15 – Images composites de cartographies élémentaires obtenues en microscopie électronique à balayage EDS de 11 espèces de thécamœbiens des sphaignes de tourbières franc-comtoises (Armynot du Châtelet et al., 2015). Les éléments chimiques cartographiés sont Si, Al, Na, Mg, Mn, K, Ca, Ti, Fe, P et S, à chacun correspond une couleur spécifique. La variation de couleurs au sein des thèques illustre la diversité élémentaire (i.e. la diversité minérale). Pour chaque thèque, l'ensemble des minéraux identifiés sont indiqués. 61
- Fig.16 – Courbes de croissance de *Netzelia tuberculata* mises en culture (1) dans une solution pauvre en silice (courbe « Treatment ») et (2) dans une solution enrichie en grains de sables (courbe « Control ») (Anderson,1990). Après un apport de grains de sables dans la solution de culture « Treatment », la multiplication (i.e. la croissance) des individus atteint un taux comparable à celui du groupe « Control »..... 63
- Fig.17 – Images en microscopie électronique de quelques spécimens de *Trigonocyrrillium horodyskii* découverts dans les nodules carbonatés néo-protérozoïques du Grand Canyon et présentés dans Porter et al. (2003). Les auteurs ont observé que la forme en triangle du pseudostome de ces individus (image n°8) rappelle celle d'un thécamœbien moderne, *Trigonopyxis arcula* (image n°20). 66
- Fig.18 – Images MEB (à gauche) et en microscopie photonique (à droite) de traces fossiles de thécamœbiens. A gauche, des images extraites des travaux de Foisser et Schiller (2001), qui ont retrouvé des écailles siliceuses correspondant aux idiosomes de *Scutiglypha crenulata* dans des sédiments du Miocène. A droite, Schmidt et al. (2004) montrent de nombreuses thèques de *Phryganella paradoxa* piégées dans de l'ambre du Crétacé. 67
- Fig.19 – a. Images en microscopie de *Assulina muscorum* (A) et *Euglypha strigosa* (B) montrant les conséquences d'une exposition de 2 jours à l'acide chlorhydrique sur les thèques idiosomiques de ces individus (Swindles et Roe, 2007). On notera que le pseudostome commence à se dissoudre chez *A. muscorum* alors que la liaison des écailles est fortement impactée chez *E. strigosa*. b. Graphique

montrant la robustesse/la sensibilité à la dissolution de 27 espèces qui prolifèrent dans les milieux acides des tourbières (d'après Swindles et Roe, 2007). 69

Fig.20 – Distribution granulométrique des grains contenus dans les thèques de 2 individus de *Diffflugia oblonga* (Armynot du Châtelet et al., 2013). La distribution est bi-modale et significativement différente de celle du sédiment, plus grossière et uni-modale. Une sélection des particules en fonction de leur taille est donc effectuée par cette espèce. La taille maximale des particules n'excède pas le diamètre du pseudostome, marqué par la limite notée « $\alpha\beta$ ». La taille du pseudostome est donc un facteur limitant dans la construction des thèques. 73

Chapitre 2

Fig.1 – Decision tree with the different uses of MEB-EDS..... 83

Fig.2 – Evaluation of the multiple supports on which shells are placed for SEM-EDS analysis (*Pp*: ease of preparation, *Sf*: quality of the surface, *Ch*: chemistry impact on BSE/EDS, *Fx*: ease of shell fixing and *Ps*: ease of shell repositioning) and evaluation of the coating methods. 86

Fig.3 – Comparison between images obtained thanks to SEC and BSE electrons signal and their respective applications 88

Fig.4 - Example of element mappings showing the spatial distribution of chemical elements (Si, Al, K, Fe, Ti, Mg, Ca, Na) within grains of a xenosomic shell of *Diffflugia oblonga var bryophila* (top left), with associated EDS composite image (top right). Below, EDS spectra of 4 quantitative point element analyses revealing the atomic composition of the 4 analyzed grains, which allows their mineral identification..... 90

Fig.5 – Step by step presentation of the methodology for anaglyph construction realized on a specimen of *Centropyxis elongata*. Below, overview of the risk of chromatic aberrations ('ghost effect') in case of bad positioning of red and cyan images during overlay process 92

Fig.6 – Exposition of the 2 methods of false-colored SEM images creation. On the left, the complete standard step-by-step method on an individual of *Euglypha strigosa*. On the right, an example of the fast method, which consists in stacking a BSE image with an EDS map of *Centropyxis ecornis* 94

Fig.1 - Images obtenues en microscopie électronique à balayage (MEB) de quelques espèces qui construisent des thèques protéiques et dont la matrice organique a une structure en alvéoles (à gauche) ou une structure en blocs (à droite)..... 96

Fig.2 – Images MEB montrant les multiples formes des idiosomes par le biais de plusieurs espèces du groupe des thèques siliceuses (à gauche), et 2 espèces du genre *Assulina*, qui font partie du groupe de thécamœbiens qui sécrètent des écailles siliceuses et les recouvrent d'un vernis organique (à droite)..... 97

Fig.3 - Images MEB de quelques espèces qui recyclent les xénosomes (*Diffflugia corona*), à la fois xénosomes et idiosomes (*Nebela aliciae*) ou des micro-squelettes (*Diffflugia bacillifera*) pour construire leur thèque..... 98

Fig.4 – Images MEB (BSE) de 2 espèces à thèques calciques : *Paraquadrula irregularis*, qui sécrète des idiosomes calciques et *Cryptodiffflugia oviformis*, qui sécrète une épaisse couche de phosphate de calcium amorphe et la recouvre d'un vernis organique..... 99

Fig.5 – Images EDS composites de 2 espèces à thèques idiosomiques : *Quadrullella symmetrica*, qui sécrète des idiosomes siliceux, et *Paraquadrula irregularis*, qui sécrète des idiosomes calciques 99

Fig.6 – Images MEB et cartographies élémentaires montrant la détection de fer dans la matrice organique d'*Arcella catinus* et de *Centropyxis ecornis*. Pour ce second individu, les variations de détection du fer entre les grains minéraux (verre volcanique) et la matrice organique qui lie ces grains sont clairement visibles. 100

Chapitre 3

Fig.1: A. Geographical localisation of the Frambouhans-Les Ecorces peatbog in the Jura Mountains, France. B. Photograph of the peatbog showing its openness to atmospheric particle deposits, with the 100 m² Sphagnum sampling zone and the Jura Mountains in the background. 107

Fig. 2: A. Example of the analysed grain-rich side of an individual *B. indica* shell as observed by SEM and secondary electrons (SEC). Superposition of the 38 mean ellipses (one for each shell) mimicking the specimen shape (bottom left). B. Width and length of the 38 specimens depicting two groups Type 1 (n = 33) and Type 2 (n = 5) with bigger shells with the number of *Sphagnum* spores agglutinated on their surface. 111

Figure 3: A. Succession of BSE pictures of five *B. indica* shells showing the increase of the mineral particle content in shells, as seen with bright reflectance. B. SEC and BSE pictures with biominerals (diatoms, filose amoebae shells, and siliceous scales) and organic grains (spores, fungal hyphae, and various debris) that are agglutinated on *B. indica* shells. 114

Fig.4: Mineral composition and grain-size distribution of mineral PM deposits (T+2 months, T+3 months, and T+6 months), *B. indica* shells (n = 38) and peat. A. EDS coloured composites of polished resins (atmospheric mineral deposits (n = 3) and peat) and an example of a shell, illustrating the chemical elements (i.e., mineral diversity). B. Pie charts describing the proportions of the four established mineral groups: (1) quartz, (2) FMC minerals, (3) Fe-Ti oxides, and (4) carbonates. C. Bar plots showing the grain-size distribution, with indication of the mode and cumulative 95% values.... 116

Supplementary Material 1: SEC and BSE pictures describing the significance of the position of the back side of the shell (richer in detectable grains) that face the electron beam. 120

Chapitre 4

Fig.1 – Correspondance entre les minéraux traçants contenus dans les poudres et ceux intégrés dans les thèques de *Bullinularia indica*. A. Images composites EDS des lots de particules n°1, 2, 3 et 4 et

illustrations des aspects morphologiques des minéraux dominants : après préparation par micro-broyage, les chlorites et chloritoides (A1) ont une forme pseudo-sphérique, le talc (A2) et la phlogopite (A3) se présentent en paillettes et la trémolite (A4) se présente sous la forme de bâtonnets. B. Images composites EDS de 3 thèques d'individus de *Bullinularia indica* ayant intégré des minéraux traçants. La phlogopite du lot n°3 n'est pas utilisée. 131

Fig.2 – Diagrammes en secteurs des proportions de minéraux traçants comptés et analysés dans les thèques soumises à un dépôt de particules allochtones du lot n°5 (mélange des 4 lots 1, 2, 3 et 4) avec une faible concentration de particules (diagramme A) et une forte concentration de particules (diagramme B). Le nombre de grains par minéraux et le nombre de thèques contenant des particules traçantes "n" est précisé pour chaque concentration. 133

Fig.3 – Evolution au cours de l'expérience i/ du nombre total de particules traçantes observées dans les thèques soumises à de faibles apports allochtones de particules (carrés oranges) et forts apports allochtones de particules (triangles oranges) et ii/ de la proportion du nombre de thèques contenant des minéraux traçants par rapport au nombre total de thèques analysées (histogrammes en bleu clair : amibes soumises à de faibles apports; histogrammes en bleu foncé : amibes soumises à de forts apports). A, B C et D présentent les résultats pour les apports des lots n°1, 2, 4 et 5 respectivement. 134

Matériel supplémentaire 1 – Distributions granulométriques de la proportion de particules (axe Y) en fonction de leur taille (axe X, échelle log), pour chaque lot (1 en bleu, 2 en jaune, 3 en rouge et 4 en vert). Chaque lot contient au moins 50% de particules inférieures à 15µm. Le lot contenant les particules les plus grossières est le lot n°2, composé de particules de talc. 139

Matériel supplémentaire 2 – A. Photo d'un des 36 anneaux de 137cm² délimitant une zone d'expérimentation (prélèvement et dépôt artificiel de particules allochtones) du tapis à *Sphagnum capillifolium*. B. Répartition des différents anneaux sur les 300m² de la zone d'étude, avec pour chacun leurs lots et leurs concentrations respectives faible ou forte. 140

Chapitre 5

Fig. 1. (a) Geographical localization of the Puyehue-Cordon Caulle volcanic complex (PCCVC) in Chile. (b) Sampling sites in the Puyehue National Park..... 153

Fig. 2. (a) 3D red/cyan anaglyph micrograph showing the morphological characteristics of tephra particles erupted on 2011 by the Puyehue-Cordón Caulle volcanic complex, Chile. (b) Zoom in of tephra particles showing sharp edges and conchoidal fractures. (c) Composite elemental map showing the chemical elements present within tephra. 157

Fig. 3. 3D anaglyph micrographs of testate amoeba species recorded in the Puyehue National Park, Chile. (a) *Argygnia dentistoma* (Penard, 1890), (b) *Cyclopyxis eurystoma* Deflandre, 1929, (c) *Centropyxis sylvatica* (Deflandre, 1929), (d) *Centropyxis elongata* (Penard, 1890), (e) *Diffflugia cf. bryophila* (Penard, 1902), (f) *Heleopera sylvatica* Penard, 1890, (g) *Centropyxis constricta* (Ehrenberg, 1841), (h) *Plagiopyxis declivis* Bonnet and Thomas, 1955, (i) *Diffflugia sp.*, (j) *Schwabia regularis* Jung,

1942, (k) <i>Centropyxis orbicularis</i> Deflandre, 1929, (l) <i>Diffflugia cf. lata</i> (Jung, 1942), (m) <i>Padaungiella</i> sp. (undescribed species, Fernández et al. unpublished data), (n) <i>Centropyxis ecornis</i> (Ehrenberg, 1841), (o) <i>Diffflugia cyphodera</i> (Jung, 1942), (p) <i>Diffflugia cf. lacustris</i> (Penard, 1899), (q) <i>Diffflugia oblonga</i> Ehrenberg, 1838.	159
Fig. 4. Detail of mineral particles and xenosomes composing testate amoeba shells. Letters correspond to species as in Fig. 3.	161
Fig. 5. Composite elemental maps showing the identity of the mineral particles composing testate amoeba shells. Letters correspond to species as in Fig. 3.	162
Fig. 6. Total mineral composition of the shell of testate amoeba species collected in the Puyehue National Park, Chile. The chart mainly focuses on showing the amount (%) of volcanic glass particles agglutinated by each species to build its shell. See Fig. 3 for species identity and Table 2 for the identity and amount of other mineral particles used by the species to build their shells.	163
Supplementary material 1. Supplementary figure illustrating the process followed to estimate the total mineral composition of tephra and each testate amoeba shell. This figure particularly shows the procedure followed to calculate the total mineral composition in the testate amoeba species <i>Argygnia dentistoma</i> (Penard, 1890). First, we constructed a composite elemental map for the tephra sample and each species. Next, we cropped all mineral particles with the same mineral identity (i.e. those having the same color) from the elemental map. Finally, we calculated the total area (%) occupied by each mineral present in the elemental map. The mineral identity of the analyzed mineral particles was determined by comparing their chemical compositions with that of known minerals following Arminot du Châtelet et al. (2015). Elemental maps were constructed using an Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an Energy Dispersive X-ray Spectrometer and a back-scattered electrons (BSE) mode.	165
Supplementary material 3. Internal chemical heterogeneity of the volcanic glass particles composing the analyzed tephra sample. Particles were photographed using an Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an Energy Dispersive X-ray Spectrometer and a back-scattered electrons mode. Particles were treated with epoxy resin and then diamond polished before being photographed.	167
Supplementary material 4. A Total Alkali Silica diagram (Le Maitre et al. 2002) showing the volcanic glass types composing the tephra sample and testate amoebae shells collected in the Puyehue National Park, Chile. This diagram is the result of point elemental analyzes conducted only on transversely cut volcanic glass particles composing the tephra sample and testate amoeba shells. Point elemental analyzes were conducted using an Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an Energy Dispersive X-ray Spectrometer and a back-scattered electrons (BSE) mode (i.e. a quantitative elemental analysis).	168

Conclusions et Perspectives

- Fig. 1 - Schéma montrant les différentes espèces de *Nebela*, identifiées en fonction de 3 paramètres morphologiques : largeur de la thèque, longueur de la thèque et diamètre du pseudostome 188
- Fig.2 - Quelques exemples de particules traçantes intégrées chez les espèces du genre *Nebela* (chl=chloritoïde, tcl=talc; trem=trémolite)..... 188
- Fig.3 - Images MEB (BSE) de plusieurs individus d'amibes à thèque appartenant au genre *Nebela* et montrant la diversité de leur taille et du contenu en idiosomes issus de l'intégration des squelettes de leurs proies 189

Liste des tableaux

Chapitre 2

Table 1: Inventory of preparation and methodological tests developed in this work..... 82

Chapitre 3

Table 1: Morphological measurement, mineral grain content, and mineral composition (estimated areas and proportions) of the 38 *B. indica* shells. Total mineral composition is the sum of the three mineral (quartz, oxides, and FMC minerals) group proportions. 112

Table 2: Mineral diversity of particles composing atmospheric deposits, peat, and *B. indica* shells. Results are given in atomic per cent of each detected element (Si, Ti, Al, Fe, Mn, Mg, Ca, Na, K, P, S, Cl, Cr, Ni, Cu, As, and Zr). An example of point elemental analysis has been selected (among 149 realised on testate amoebae, 157 on atmospheric PM, and 48 on peat grains) for each crystallised mineral identified. 115

Chapitre 4

Matériel supplémentaire 3 – Liste des minéraux traçants composant chaque lot avec les poids d'oxydes mesurés (SiO₂, TiO₂, Al₂O₃, FeO, MnO, MgO, CaO, Na₂O, K₂O). 141

Matériel supplémentaire 4 (1/2) – Données de comptage des différents paramètres analysés pour chacun des prélèvements à T0, T+1, T+2, T+4, T+6 et T+15. Les données sont présentées par lots de particules minérales, et additionnées. 142

Matériel supplémentaire 4 (2/2) – Données de comptage des différents paramètres analysés pour chacun des prélèvements à T0, T+1, T+2, T+4, T+6 et T+15. Les données sont présentées par lots de particules minérales, et additionnées. 143

Chapitre 5

Table 1. Information associated to the microhabitats sampled in the Puyehue National Park, Chile. 154

Table 2. Mineral composition of tephra and testate amoeba shells. Values are in percentages. The values were estimated through point elemental analyzes conducted on different mineral particles composing tephra and testate amoeba shells. Elemental analyzes were conducted with an Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an Energy Dispersive X-ray Spectrometer. For tephra, total mineral composition does not sum 100% because the percentage of diatom shells was not included (6.34% of the total area of the sample). 156

Supplementary material 2. Average abundances (%) for each chemical element observed in the tephra sample and each testate amoeba species. Abundance values were estimated through qualitative and quantitative elemental analyzes. 166

Supplementary material 5. Mineral diversity of particles agglutinated by analyzed testate amoebae. Results are given in oxides weight (%SiO₂, %TiO₂, %Al₂O₃, %FeO, %MnO, %MgO, %CaO, %Na₂O and %K₂O). An example of point elemental analysis has been selected (among 161 realized on testate amoebae) for each crystallized mineral characterized. For non-crystalline mineral (here volcanic glass), an average has been calculated on n=95 point elemental analyzes identified as volcanic glass. 169

Liste des publications et communications à congrès relatives à ces travaux de thèse

Liste complète des publications et communications: http://www.researchgate.net/profile/Maxence_Delaine/

Publications

En 1^{er} auteur :

DELAINE, M., FERNANDEZ, L.D., ARMYNOT DU CHATELET, E., RECOURT, P., POTDEVIN, J-L., MITCHELL, E.A.D., BERNARD, N., 2016. Cinderella's helping pigeons of the microbial world : The potential of testate amoebae for identifying cryptotephra. *European Journal of Protistology (in press)*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2016.05.003>

DELAINE, M., BERNARD, N., GILBERT, D., RECOURT, P., ARMYNOT DU CHATELET, E., 2016 (in revision). Diversity of testate amoebae shell content: Example of *Bullinularia indica* living in *Sphagnum capillifolium* carpet. En révision pour European Journal of Protistology.

En co-auteur :

ARMYNOT DU CHATELET, E., BERNARD, N., DELAINE, M., GUILLOT, F., GILBERT, D., 2015. The mineral composition of the tests of 'testate amoebae' (Amoebozoa, Arcellinida): The relative importance of grain availability and grain selection. *Revue de Micropaléontologie* **58**, 141-154.

Communications orales :

DELAINE, M., FERNANDEZ, L.D., ARMYNOT DU CHATELET, E., RECOURT, P., POTDEVIN, J-L., MITCHELL, E.A.D., BERNARD, N. Les pigeons de Cendrillon du monde microbien : le potentiel des amibes à thèque pour identifier les cryptotéphras. JDD LOG 2016, Wimereux, France. 07/2016.

DELAINE, M., BERNARD, N., GILBERT, D., GUILLOT, F., RECOURT, P., ARMYNOT DU CHATELET, E. Les amibes à thèques sont-elles capables de sélectionner des particules minérales présentes dans l'environnement pour constituer leur thèque ? FJC 2015, Dijon, France. 06/2015.

DELAINE, M., BERNARD, N., GILBERT, D., GUILLOT, F., RECOURT, P., ARMYNOT DU CHATELET, E. Les amibes à thèques sont-elles capables de sélectionner des particules minérales présentes dans l'environnement pour constituer leur thèque ? JDD LOG 2015, Wimereux, France. 06/2015.

ARMYNOT DU CHATELET, E., BERNARD, N., DELAINE, M., GUILLOT, F., GILBERT, D. Size and mineral diversity of particles constituting the shells of testate amoebae. International Symposium on Testate Amoebae 7, Poznan, Poland. 09/2014.

ARMYNOT DU CHATELET, E., BERNARD, N., DELAINE, M., GUILLOT, F., GILBERT, D. Taille et diversité minéralogique des particules constituent les thèques d'amibes xénogènes. JDD Géosystèmes 2014, Villeneuve d'Ascq, France. 05/2014.

ARMYNOT DU CHATELET, E., BERNARD, N., DELAINE, M., GUILLOT, F., GILBERT, D. Size and mineral diversity of particles constituting the shells of testate amoebae. Fundamental and applied protistology, Neuchâtel, Switzerland. 04/2014.

Posters :

DELAINE, M., ARMYNOT DU CHATELET, E., BOUT-ROUMAZEILLES, V., GANNE, A., GOUBERT, E., LEROYER, C., LE CADRE, V., PENAUD, A., ARTHUIS, R. Transgression holocène et interactions sociétés-milieux : étude multiproxies du remplissage sédimentaire de l'estuaire de la Loire à Nantes. SGF-AFEQ-CNF INQUA, Paris, France. 12/2015.

DELAINE, M., ARMYNOT DU CHATELET, E., COURCOT, L., FRANCESCANGELI, F., RECOURT, P., VENTALON, S. Micro-organismes, à quoi ça sert ? Journées de la mer, Boulogne-sur-mer, France. 07/2015.

DELAINE, M., ARMYNOT DU CHATELET, E., COURCOT, L., FRANCESCANGELI, F., RECOURT, P., VENTALON, S. Micro-organismes : l'incroyable diversité ! Journées de la mer, Boulogne-sur-mer, France. 07/2015.

DELAINE, M., ARMYNOT DU CHATELET, E., BOUT-ROUMAZEILLES, V., GOUBERT, E., LE CADRE, V., RECOURT, P., TRENTESAUX, A., ARTHUIS, R. Benthic foraminifera and testate amoebae as tracers for Holocene estuarine sediment infilling: a multi-proxy approach. TMS Foraminifera and Nannofossil Spring Meeting, Texel, Netherlands. 12/2014.

DELAINE, M., RECOURT, P., ARMYNOT DU CHATELET, E. Anaglyphic SEM pictures : a new method which improves presentation and description of testate amoebae's shell morphology. International Symposium on Testate Amoebae 7, Poznan, Poland. 09/2014.

DELAINE, M., ARMYNOT DU CHATELET, E., GILBERT, D., GUILLOT, F., RECOURT, P., BERNARD, N. Diversity of mineral and organic objects agglutinated by *Bullinularia indica* and *Nebela cf collaris*. International Symposium on Testate Amoebae 7, Poznan, Poland. 09/2014.

Introduction



Les amibes à thèque, également appelés thécamœbiens, forment un groupe polyphylétique de micro-organismes unicellulaires, eucaryotes, hétérotrophiques et mixotrophes, qui construisent une enveloppe rigide, appelée thèque ou coquille (Adl et al., 2012). Ces théques ont des tailles, formes et natures très variées. Dès la fin du XIX^{ème} siècle les scientifiques entreprennent de classer les espèces sur la base de la diversité morphologique. Leidy (1879) et Penard (1902) font partie des pionniers qui ont indiscutablement fait considérablement avancer la classification des amibes à thèque (Corliss, 2001). Vers la fin du XX^{ème} siècle, après avoir passé plusieurs décennies à caractériser les espèces d'amibes à thèque en établissant la classification sur la base des traits morphologiques, les scientifiques se sont aperçus lors d'essais en culture que non seulement certains individus pouvaient posséder une variabilité morphologique très élevée, mais que certains facteurs tels que la quantité de particules disponibles (Ogden 1988 et 1989), de silice dissoute (Anderson 1990), de proies (Ogden 1989) et de nutriments (Wanner et Meisterfeld 1994) avaient un fort impact sur la taille et la forme des théques. Le polymorphisme des théques a également été observé en comparant des populations géographiquement éloignées (Bobrov et al., 1995), pouvant s'expliquer par des mécanismes génétiques (Schönborn 1992) ou plus simplement les conditions climatiques (Wanner et Meisterfeld 1994), qui peuvent moduler la disponibilité des nutriments. De plus, les théques peuvent subir des variations en fonction des relations prédateurs-proies au sein des communautés microbiennes, comme l'ont démontré Coûteaux et Ogden (1988) en analysant l'impact de la prédation par *Thecamoeba sphaeronucleolus* et *Heleopera petricola* sur *Tracheleuglypha dentata*. Ces différents travaux ont conduit à reconsidérer la classification des espèces d'amibes à thèque sur la base des critères morphologiques. De fait, au cours de la dernière décennie, la classification a évolué grâce au développement des techniques de biologie moléculaire (séquençage de l'ARN ribosomique) qui ont permis de préciser, et jusqu'à parfois remettre en cause, la phylogénie des thécamœbiens (Lara et al., 2007).

Les amibes à thèque sont, pour la plupart, des organismes cosmopolites qui se développent dans les biomes terrestres et aquatiques d'eau douce et jusqu'à la limite des milieux marins (Smith et al., 2008). Leur diversité est la plus forte dans les biomes où les précipitations annuelles sont élevées et les températures chaudes, comme c'est le cas dans les forêts humides tropicales et tempérées (Krashevskaya et al., 2007 ; Bamforth, 2010 ; Fernandez et al., 2016). Ils représentent également un des groupes de micro-organismes eucaryotes les plus abondants et diversifiés dans les tourbières à sphaignes. Pour cette raison, l'écologie des amibes à thèque a été largement étudiée dans ces zones humides (Charman, 1997 ; Bobrov et al., 2002 ; Qin et al., 2012 ; Fournier et al., 2016). Ils ont, cependant, aussi été

retrouvés dans des écosystèmes les plus extrêmes, comme les déserts (Fernandez, 2015), la toundra (Bobrov et al, 2012) et les eaux douces polaires (Zapata et Matamala, 1987).

Ces dernières années, les recherches sur les amibes à thèque ont notamment porté sur l'écologie des espèces (Ogden 1989 ; Wanner et Meisterfeld 1994 ; Anderson 1990 ; Gilbert et al, 1998a). De nombreux autres travaux ont montré que les amibes à thèque sont très sensibles aux perturbations de l'environnement, et notamment aux dépôts de contaminants métalliques ou organiques (Nguyen-Viet et al., 2008 ; Meyer et al., 2013). Ces travaux ont souligné l'intérêt d'utiliser les amibes à thèque comme bio-indicateurs de la qualité des milieux (Meyer et al., 2012 ; Meyer et al., 2013). L'utilisation des amibes à thèque comme bio-indicateurs de la qualité des milieux a conduit les chercheurs à s'intéresser à nouveau à l'identification des espèces sur la base de la morphologie de la thèque. En effet, la classification des amibes à thèque sur la base des analyses moléculaires est encore très loin d'être complète et ne peut de toute façon pas être utilisée lorsque la thèque seule persiste, comme c'est le cas pour les études en paléoécologie. Cet intérêt pour la morphologie des thèques a conduit à reprendre les travaux portant sur la composition de ces thèques.

Les outils de microscopie électronique et de spectrométrie avaient permis d'établir la description chimique globale de différentes thèques d'amibes (Moraczewski, 1971 ; Saucin-Meulenberg et al., 1973 ; Stout et Walker, 1976 ; Ogden, 1988). Plus récemment, l'amélioration de la précision analytique a permis d'aller plus loin dans la caractérisation des objets (notamment minéralisés) constitutifs des thèques et leur distribution au sein de ces thèques (Armynot du Châtelet et al. 2010, 2013, 2015). Ces nouvelles études ont montré tout l'intérêt qu'il pouvait y avoir à mieux connaître la composition des thèques et leur mode de formation. De plus, elles ont conduit à émettre l'hypothèse que les amibes xénosomiques, c'est-à-dire celles dont les thèques sont constituées de particules exogènes, peuvent constituer des bio-indicateurs pertinents de la diversité particulaire de l'environnement minéral, organique et biologique dans lequel évoluent ces microorganismes et, de là, de la nature des dépôts de particules atmosphériques naturels ou anthropiques parvenant dans les écosystèmes.

C'est dans ce contexte que les objectifs des présents travaux ont été déterminés. L'objectif principal des recherches réalisées dans le cadre de cette thèse vise donc à caractériser la composition des thèques d'amibes xénosomiques et à étudier leur utilisation potentielle en tant que bio-indicateurs des dépôts de particules d'origine atmosphérique. Pour cela, des thèques d'amibes ont été analysées *in situ* (1) en conditions naturelles et après dépôts (2) artificiels (apports de particules minérales allochtones) ou (3) de particules naturelles (dépôts de tephras suite à une éruption volcanique récente). Ce manuscrit est présenté sous la

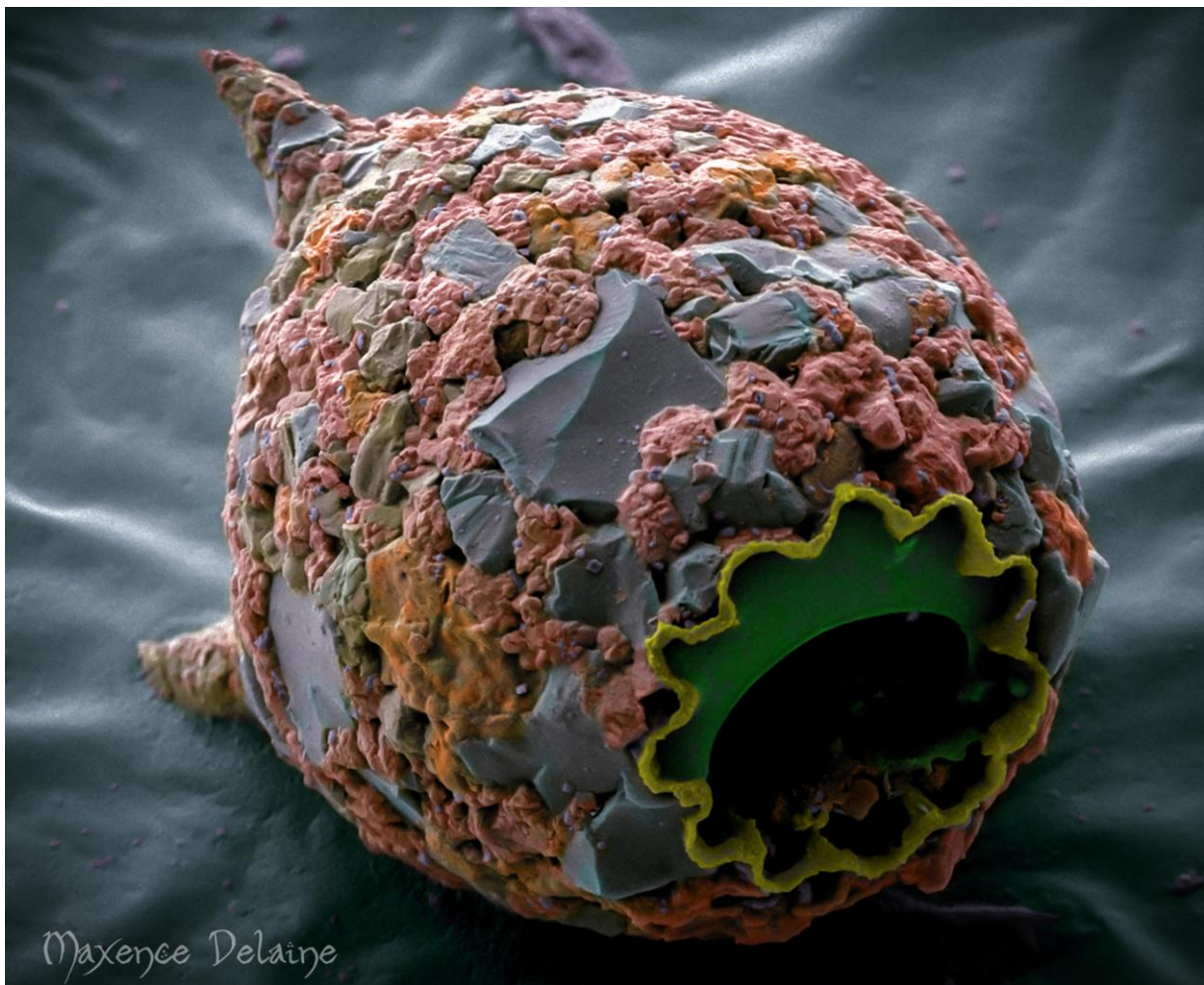
forme d'une thèse sous articles. Par conséquent, elle se compose de parties en français et d'articles en anglais, acceptés, soumis ou en préparation.

Les résultats de ce travail se présentent sous la forme d'un recueil de quatre publications :

- La première détaille les solutions analytiques et visuelles développées dans le cadre de l'étude des thèques d'amibes à l'aide de la microscopie électronique à balayage avec spectroscopie élémentaire. Ce chapitre correspond à une publication en préparation pour la revue *Scanning* en tant que premier auteur.
- La deuxième présente les résultats d'une étude menée *in situ* portant sur la diversité des grains contenus dans les thèques de l'espèce xénosomique *Bullinularia indica* d'une tourbière à sphaignes, dans des conditions naturelles non perturbées. Ce chapitre correspond à une publication soumise début octobre 2016 en tant que premier auteur dans la revue *European Journal of Protistology*, et actuellement en révision.
- La troisième correspond à une étude menée *in situ* et testant la capacité de sélection des particules minérales en fonction de leur nature par l'espèce d'amibe à thèque xénosomique *Bullinularia indica*. Ce chapitre correspond à une publication en préparation pour la revue *Protist* en tant que premier auteur.
- Enfin, la quatrième détaille le potentiel des thèques d'amibes xénosomiques comme outil permettant d'identifier la présence de cryptotéphras. Ce chapitre correspond à une publication publiée en tant que premier auteur dans la revue *European Journal of Protistology* (2016, sous presse).

Des annexes sont également proposées en fin de manuscrit, avec plusieurs articles issus de travaux de master portant sur les amibes à thèques et publiés durant la thèse : 1) un article en anglais en premier auteur publié dans la revue *The Holocene*, et 2) un second article en co-auteur publié dans la *Revue de Micropaléontologie*. Les différents posters présentés à l'occasion de rassemblements scientifiques (congrès locaux ou internationaux) figurent également en annexes.

Chapitre 1 - Synthèse bibliographique



1 INTRODUCTION AUX AMIBES À THÈQUES

1.1 APERÇU GÉNÉRAL

1.1.1 Définition

Les amibes à thèque, également appelés thécamœbiens, sont des micro-organismes unicellulaires qui forment un groupe polyphylétique comprenant de nombreuses espèces hétérotrophes et mixotrophes. Ils font partie de deux lignées éloignées, les Amoebozoa et le supergroupe SAR (Adl et al., 2012). Ces organismes ont la particularité de construire une coquille, aussi appelée thèque (d'où l'origine du terme « amibe à thèque », Fig.1), qui est en une partie ou en totalité sécrétée par l'amibe. Elle sert d'enveloppe protectrice à la cellule, est symétrique et possède une ouverture appelée le pseudostome. Dans de rares cas, ce pseudostome peut être double (e.g. les espèces des genres *Archerella* et *Amphitrema*). La forme et la taille du pseudostome sont très variables. C'est par ce pseudostome que passent les extensions cytoplasmiques rétractiles, appelés pseudopodes, qui servent à la préhension des objets ou des proies et à la locomotion (Chardez, 1967a). Ces pseudopodes ont des formes très différentes selon les espèces. C'est la forme de ces pseudopodes qui a servi de critère pour effectuer la première classification des amibes à thèque. La fixation de l'amibe à la thèque se fait très souvent à l'aide de fins pseudopodes appelés épipodes. Ils fixent la cellule à la thèque mais ils sont également des organes à fonction nerveuse, permettant le retrait rapide de l'amibe dans sa thèque lorsqu'elle est touchée par un corps étranger ou qu'elle subit un choc (Chardez, 1967a). Le nombre de ces épipodes est très variable selon les espèces. Les thécamœbiens peuvent être uninucléés, binucléés ou multinucléés. La position du/des noyau(x) est différente selon leur nombre. Par exemple, les amibes uninucléées (e.g. *Hyalosphenia papilio*) ont leur noyau positionné dans la partie postérieure du corps de l'amibe. Les amibes binucléées (e.g. le genre *Arcella*) ont des noyaux qui se situent de part et d'autre du pseudostome (Chardez, 1967a). Deux grands types de vacuoles sont présentes dans la cellule des amibes à thèque : les vacuoles digestives (gastrioles) et les vacuoles pulsatiles (pulsoles). Ces dernières ont un nombre variable et elles ont pour fonction la régulation osmotique. Dans le cytoplasme on peut aussi trouver des microalgues symbiotiques (Zoochlorelles), des proies en voie de digestion, des matériaux de réserve, des produits du métabolisme (e.g. cytoprocte) et des globules lipidiques. Enfin, certaines espèces possèdent des pores dans la thèque, permettant un contact permanent avec le milieu extérieur même lorsque l'amibe est enkystée.

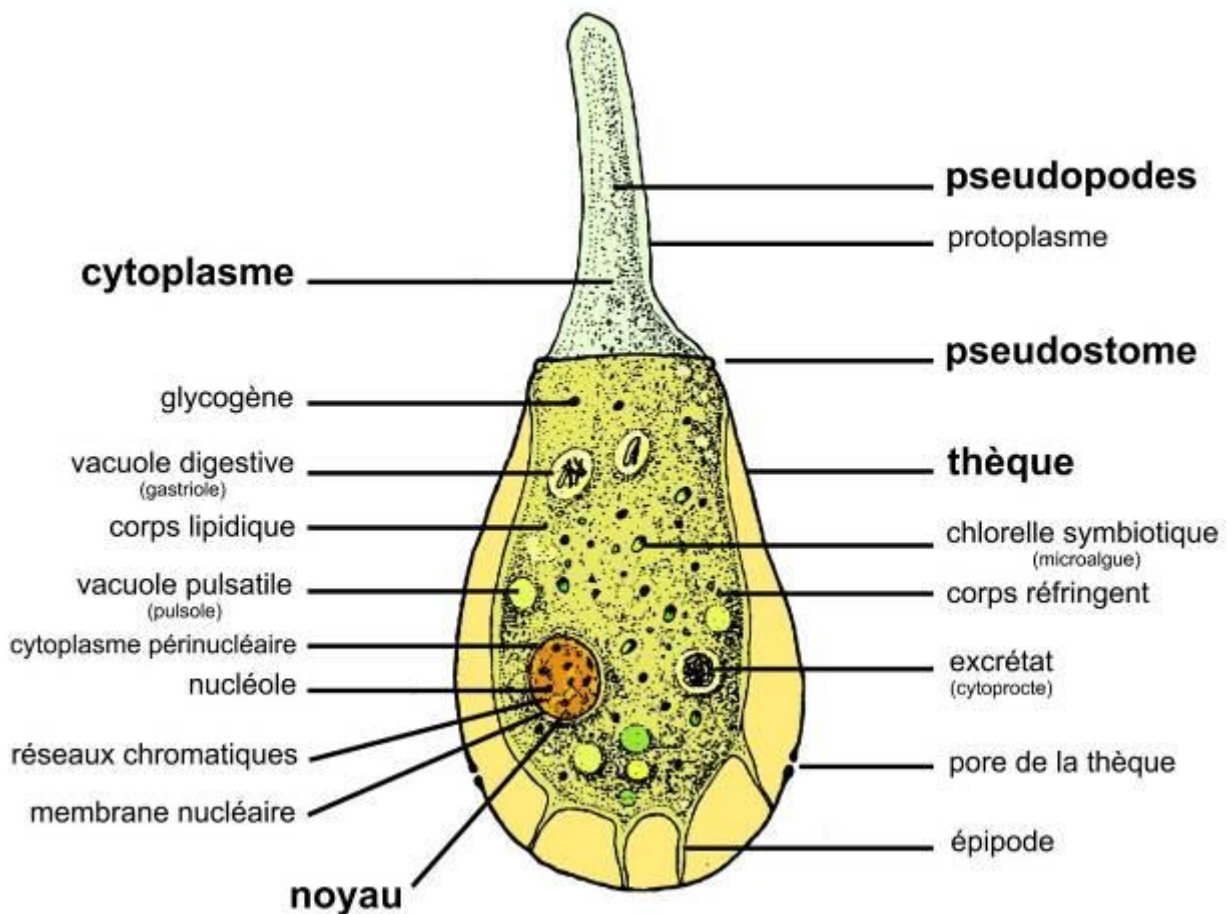


Fig.1 – Schéma d'une amibe à thèque, *Hyalosphenia papilio*, d'après Chardez, 1967a

1.1.2 Répartition des amibes à thèques

Les thécamœbiens sont cosmopolites et se développent dans presque tous les biomes dulçaquicoles et terrestres de la planète. Ils sont plus abondants et diversifiés dans les forêts humides tropicales et tempérées en raison des températures chaudes et de la forte pluviométrie annuelle (Krashevskaya et al., 2007 ; Bamforth 2010 ; Fernandez et al., 2012). Ils colonisent également les milieux plus extrêmes tels que les déserts (Fernandez 2015), la toundra (Mazei et Chernyshov, 2011) et les eaux douces polaires (Zapata et Matamala, 1987). Ils représentent un des plus diversifiés et abondants groupes de micro-organismes eucaryotes dans les tourbières, c'est pourquoi leur diversité et leur écologie ont été très étudiées dans ces habitats (Charman 1997 ; Bobrov et al., 2002 ; Qin et al., 2012 ; Marcisz et al., 2014 ; Fournier et al., 2016). Certaines espèces tolèrent mieux les eaux saumâtres. Ces thécamœbiens interstitiels (dits psammobiontes) colonisent par exemple les eaux souterraines des plages maritimes (Golemansky et Coûteaux, 1982). Chardez (1965a) a observé que sur les 1129 espèces de thécamœbiens alors répertoriées :

- 65,9% des espèces sont inféodées aux eaux douces (dont 48,5% vivent uniquement dans ce milieu),
- 22,9% dans les mousses (dont 7,3% vivent uniquement dans ce milieu),
- 22,1% dans les sphaignes (dont 9,8% vivent uniquement dans ce milieu),
- 10,7% dans les sols (dont 7% vivent uniquement dans ce milieu)
- 1,4% en milieu marin (dont 1,1% vivent uniquement dans ce milieu)

Au sein d'un même biome, la diversité des micro-habitats que peuplent les amibes est élevée. Parce qu'elles font partie de la microfaune benthique et planctonique des étendues d'eaux (Penard, 1902, Wall et al., 2010), on retrouve leurs vestiges dans les milieux sédimentaires en milieux ouverts (e.g. sédiments fluviaux, estuariens) ou plus fermés (e.g. sédiments lacustres, stagnastres, palustres). De plus, elles évoluent également dans les milieux endogènes humides (e.g. sols, humus, litière végétale, Bonnet, 1958) et dans l'eau de rétention de nombreux bryophytes (e.g. sphaignes des tourbières). Dans les tourbières, les amibes à thèques peuvent représenter le groupe dominant de micro-organismes en atteignant une densité de 20000 individus par gramme de matière sèche (Mitchell et al., 2000). De façon générale, elles se développent dans les environnements avec une teneur en matière organique élevée (Wilkinson, 2001).

1.2 PHYLOGÉNIE

Les premières monographies sur les thécamœbiens datent de la fin du XIX^{ème} siècle et début du XX^{ème}. Ces dessins décrivant les amibes ont d'abord été réalisés par Leidy (1879), puis Penard (1899, 1902), Cash et Hopkinson (1905, 1909), Cash et al. (1915, 1919), Hoogenraad et De Groot (1940) et Jung (1942). Ce courant précurseur a servi d'étrier à des études plus précises à partir de la fin des années 50, dont certaines s'appuient déjà sur l'imagerie électronique : Grospietch (1958), Bonnet et Thomas (1960), Chardez (1967a), Ogden et Hedley (1980), Ogden (1983, 1984, 1988a-b-c), Mediolli et Scott (1985), Ellison et Ogden (1987), Charman et al. (2000), Meisterfeld (2002a, 2002b), Clarke (2003), Mazei et Tsyganov (2006). Dans le même temps, ces guides ou atlas sont complétés avec des études s'arrêtant à l'échelle du genre : *Arcella* (Deflandre, 1928), *Centropyxis* (Deflandre, 1929 ; Décloitre, 1978, 1979), *Nebela* (Deflandre, 1936 ; Décloitre, 1977), *Lesquereusia* (Thomas et Gauthier-Lièvre, 1959), *Plagiopyxis* (Thomas, 1958a), *Paraquadrula* (Décloitre, 1961), *Diffugiella* (Schönborn, 1965a), *Phryganella* (Chardez, 1969), *Euglypha* (Coûteaux et al., 1979), *Trinema* (Décloitre, 1981), *Diffugia* (Ogden, 1983 ; Ogden et Meisterfeld, 1989), *Pontigulasia*, *Lagenodiffugia* et *Zivkovicia* (Ogden, 1987), *Cucurbitella* (Ogden et Meisterfeld, 1989), *Netzelia* (Ogden et Meisterfeld, 1989) et *Cyphoderia* (Chardez, 1991).

Les études récentes visant à donner les variations morphologiques d'un genre de thécamœbiens utilisent des mesures biométriques plus nombreuses (Lahr et Lopes, 2006).

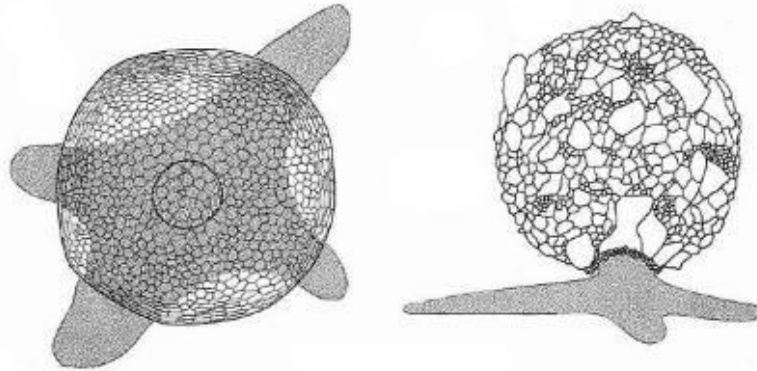
Les amibes à thèques ont d'abord été classés en fonction de la forme de leurs pseudopodes (De Saedeleer, 1934 ; Chardez, 1967a, Fig.2) :

- les Filose : pseudopodes très effilés, très longs et ectoplasmiques,
- les Lobose : pseudopodes constitués d'une masse cytoplasmique arrondie au sommet,
- les Granuloreticulose : pseudopodes qui ont la faculté de s'anastomoser et de digérer, alors que dans les autres groupes cette dernière fonction n'est réalisée qu'à l'intérieur de la thèque,
- les Reticulose : pseudopodes digités, pointus mais non effilés, qui peuvent s'anastomoser

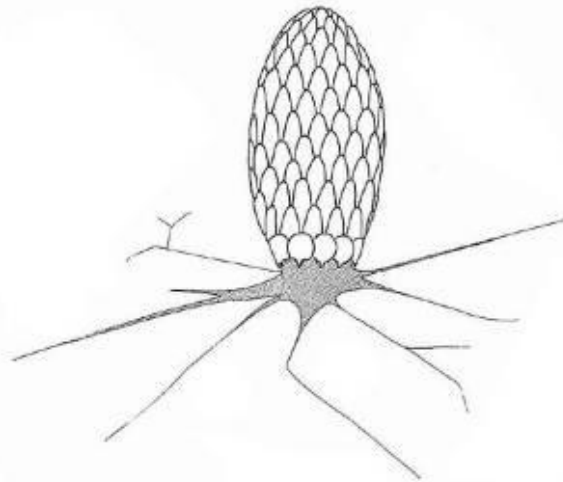
Ces deux dernières formes de pseudopodes sont dans la pratique regroupés dans le terme Granuloreticulose. Ce type est présent mais assez rare chez les thécamœbiens (Meisterfeld, 2002b). Cependant, il est caractéristique des foraminifères, des rhizopodes cousins des amibes à thèques et inféodés aux milieux aquatiques marins. En l'absence d'autres moyens analytiques, la classification originelle était alors basée essentiellement sur des critères morphologiques, ou de composition générale de la thèque.

a.

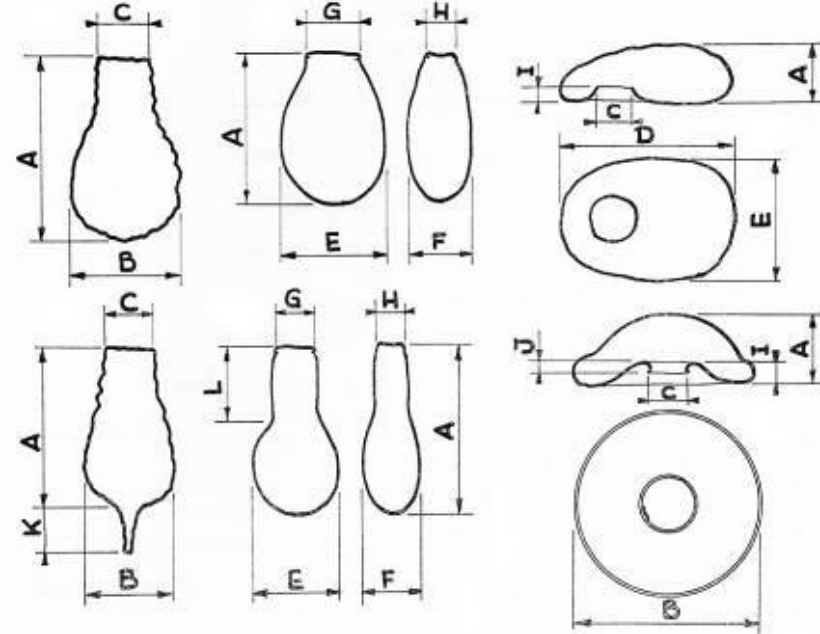
Type Lobose



Type Filose



b.



- A - Hauteur de la thèque
- B - Diamètre de la thèque
- C - Diamètre du pseudostome
- D - Longueur de la thèque
- E - Largeur de la thèque
- F - Epaisseur de la thèque
- G - Longueur du pseudostome
- H - Largeur du pseudostome
- I - Profondeur de l'invagination du pseudostome
- J - Hauteur du tube buccal
- K - Longueur de corne
- L - Hauteur du col

Fig.2 – a. Les deux types majeurs de pseudopodes, Lobose et Filose, d'après Ogden et Hedley (1980) ; b. Schémas d'après Chardez (1967a) représentant les différentes mesures pouvant être effectuées sur les thèques afin de caractériser puis déterminer les espèces de thécamœbiens.

Les techniques actuelles de biologie moléculaire (barcoding moléculaire de l'ARNr ribosomique « SSU rRNA » ou de la cytochrome oxydase « COI ») permettent de préciser la phylogénie des amibes à thèque (Heger et al., 2011 ; Kosakyan et al., 2012, 2015, 2016). Ces techniques ont confirmé la polyphylie des amibes à thèque (Nikolaev et al., 2004, 2005). Les 2 grands groupes initiaux sont gardés dans la dernière classification d'Adl et al. (2012) (Fig.3) : les Lobose ou Lobosea appartiennent au groupe Amoebozoa tandis que les Filose font partie du supergroupe SAR (acronyme de Stramenopiles, Alveolata et Rhizaria). On se sert donc de la biologie moléculaire pour préciser les liens entre les différentes espèces, mais la taxonomie établie au XX^{ème} siècle est toujours d'actualité.

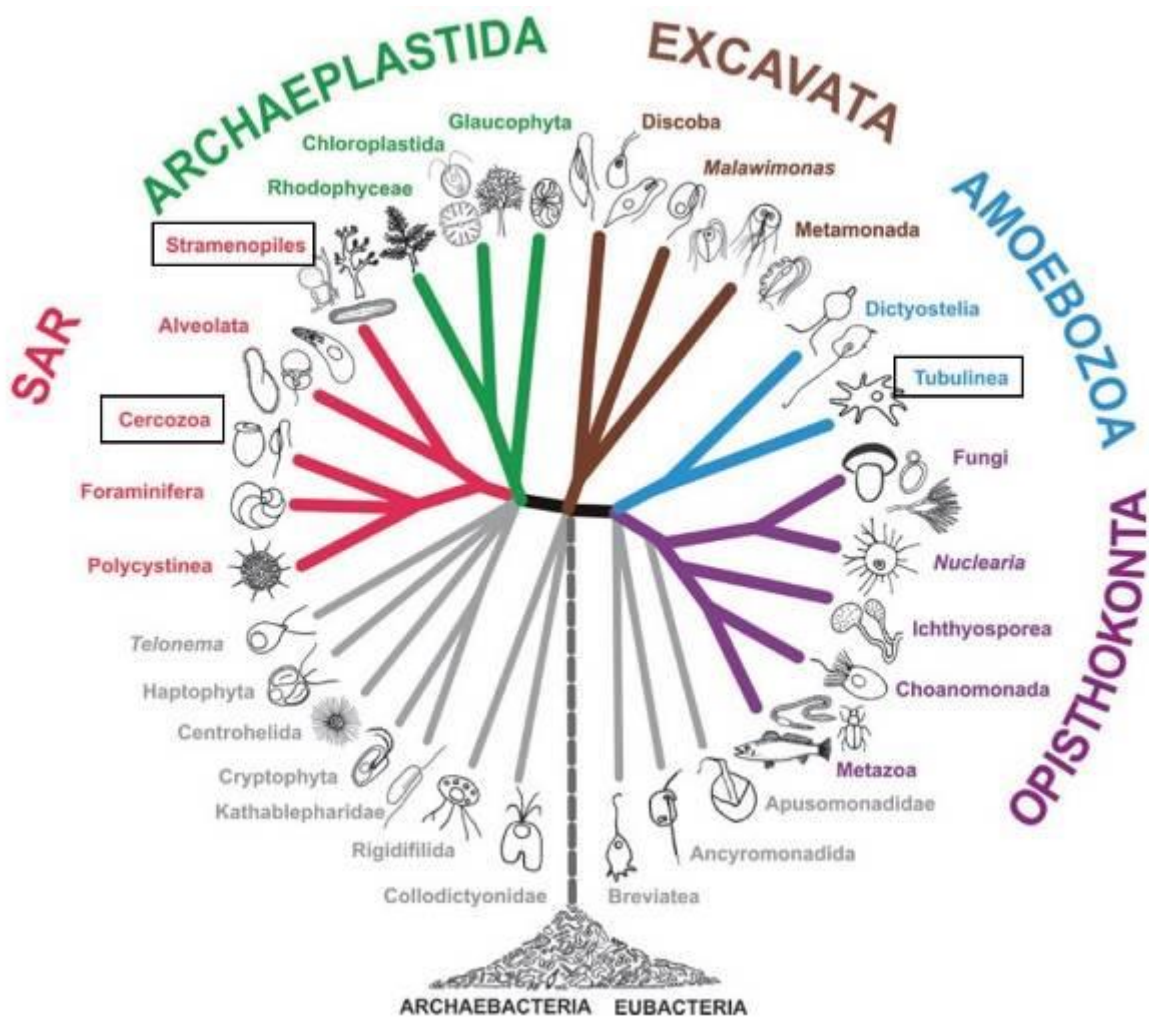


Fig.3 – Arbre d'après Adl et al. (2012) représentant les différents supergroupes et les classes d'appartenance des amibes à thèque (encadrés en noir). Les Lobose font partie de la classe Tubulinea (e.g. genre *Diffflugia*) tandis que les Filose sont repartis dans les classes des Stramenopiles (e.g. genre *Amphitrema*) et des Cercozoa (e.g. genre *Euglypha*)

Les trois quarts des espèces d'amibes à thèque connues font partie de l'ordre des Arcellinida (Meisterfeld et Mitchell, 2008), lui-même appartenant au groupe Lobose (Fig.4), comme l'ont confirmé en Lara et al. (2008). Les récentes analyses génétiques ont pu largement contribuer à améliorer la connaissance des positions des thécamœbiens sur l'arbre phylogénétique du vivant. Récemment, Lahr et al. (2013) ont démontré qu'à la différence des Echinamoebioea, Leptomyxida, Amoebida et Poseidonida, les lignées Arcellinida (ou Arcellacean) et Hartmanellidae ne sont pas monophylétiques. Gomaa et al. (2012) ont démontré qu'au sein même des Arcellinida, le genre le plus représenté, *Diffflugia*, n'est finalement pas monophylétique.

Le dernier quart correspond aux amibes à thèques appartenant au groupe Cercozoa. Ce groupe hétérogène comprend les Euglyphida et les Amphitremida, correspondant aux 2 lignées indépendantes complémentaires des Arcellinida (Kosakyan et al., 2016). Les résultats obtenus via les analyses génétiques n'en sont encore qu'à leur début et il est certain que de nombreuses précisions sur la phylogénie des thécamœbiens sont à venir.

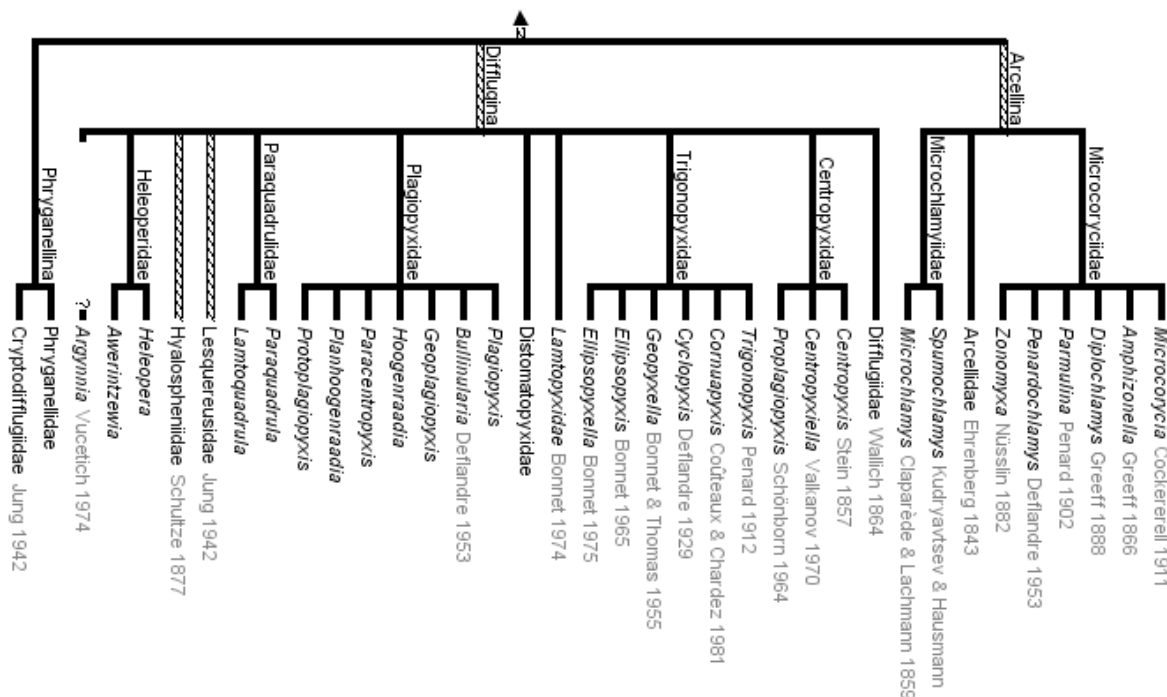


Fig.4 – Arbre phylogénétique des Lobose d'après Meisterfeld (2002), consultable sur le site internet « Tree of Life web project » : <http://tolweb.org/Arcellinida/124471>

L'identification des espèces de thécamœbiens repose sur des critères morphologiques. Traditionnellement, on regroupe les espèces morphologiquement similaires en « morphotypes ». Cette classification, qui ne tient pas compte des liens génétiques entre les différentes espèces, reste néanmoins d'actualité car il a été démontré que la morphologie des thécamœbiens et leur réponse écologique en milieu naturel sont étroitement liées (Bonnet, 1964, 1975 ; Chardez et Lambert, 1981 ; Chardez, 1989). Par exemple, Bonnet (1964) a proposé de regrouper les différentes formes de thèques en 7 types morphologiques (Fig.5), la plupart indexées sur la position et la forme du pseudostome :

- le type *Arcella*,
- le type acrostome (e.g. *Diffugia*, *Nebela*),
- le type axial à sole (e.g. *Cyclopyxis*),
- le type plagiostome (e.g. *Centropyxis plagiostoma*, *Trinema*)
- le type plagiostome à visière (e.g. *Centropyxis aerophila*)
- le type cryptostome (e.g. *Plagiopyxis minuta*)
- le type cryptostome à visière (e.g. *Plagiopyxis labiata*)

Il a alors pu constater que certaines formes étaient caractéristiques d'un milieu, en comparant les proportions des espèces (et classées en morphotypes) dénombrées en 6 différents milieux : les lacs, les étangs, les sphaignes, les mousses aériennes, les mousses épigées et les sols (Fig.5). Les tableaux de comptage utilisés par Bonnet pour étayer son hypothèse sont issus des études de Moraczewski (1961), Chardez (1961), Grospietsch (1954), Bartos (1940), Thomas (1961) et Bonnet (1960).

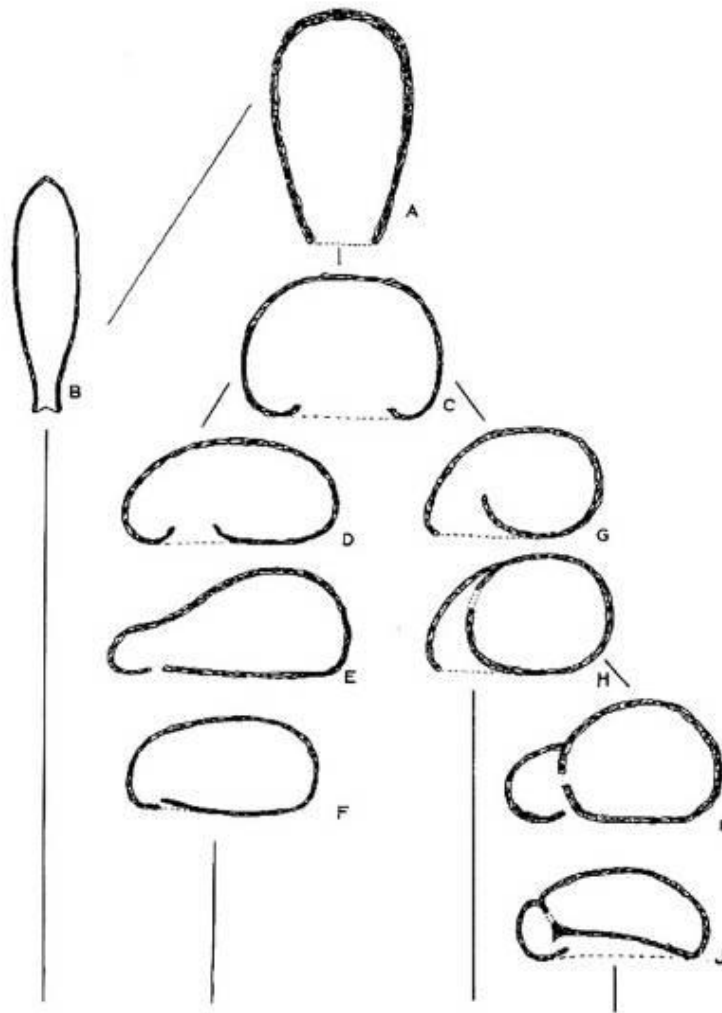


Schéma hypothétique de l'évolution des Lobosa. — A, type acrostome à symétrie axiale (*Diffflugia*); B, acrostome aplati (*Nebela*); C, axial à sole (*Cyclopyxis*); D, plagiostome simple (*Centropyxis plagiostoma*); E, type faisant transition avec le type cryptostome simple (*Protoplagiopyxis delamarei*); F, cryptostome simple (*Plagiopyxis minuta*); G, plagiostome à visière (*Centropyxis aerophila*); H, id. (*C. sylvatica*); I, cryptostome à visière (*Plagiopyxis callida*); J, id. (*Paracentropyxis mimetica*).

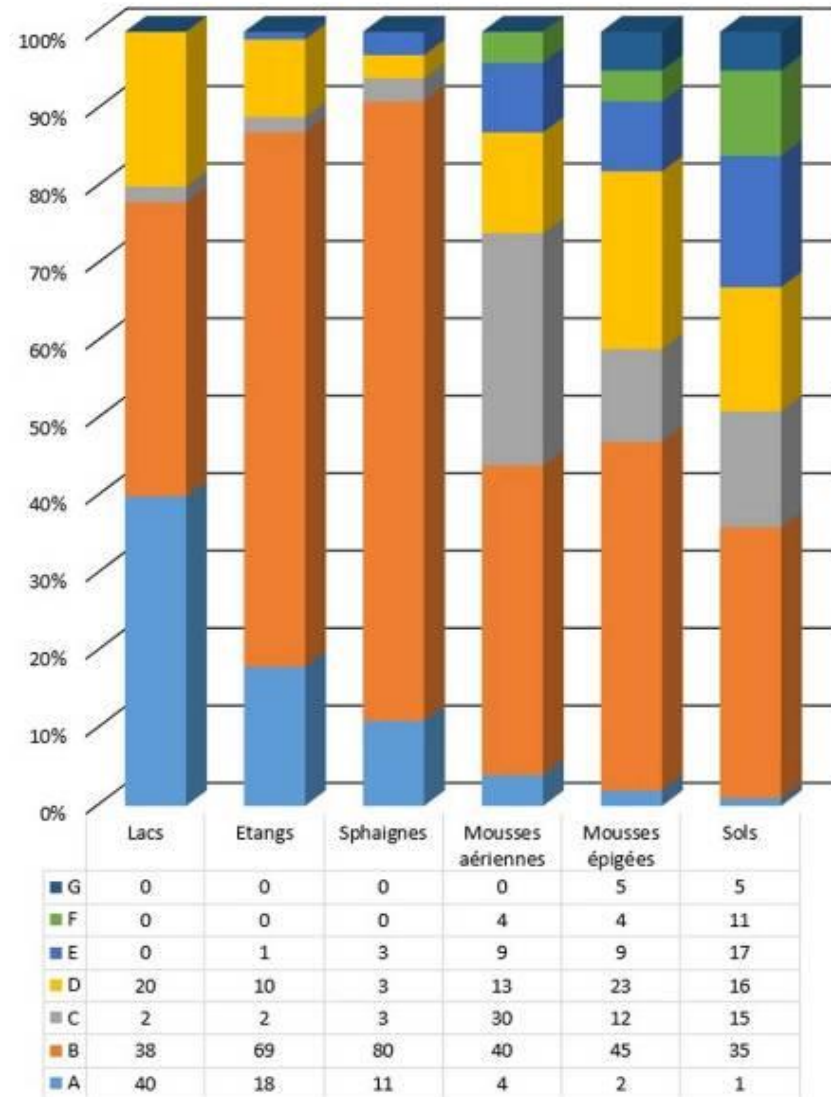


Fig.5 – Schémas représentant les différents types morphologiques établis d'après Bonnet (1964) et histogramme de leur distribution au sein des 6 milieux représentatifs étudiés

L'identification des thécamœbiens basée sur la morphologie de la thèque est, en plus d'être économique (en comparaison aux analyses génétiques), l'unique solution dans le cadre de matériel fossile utilisé lors d'études paléoenvironnementales. Néanmoins, bien que primordiale pour caractériser la diversité d'un groupe d'individus, il est aujourd'hui démontré que cette approche ne permet pas le bon positionnement des espèces dans l'arbre phylogénétique du vivant (Meisterfeld et Mitchell, 2008).

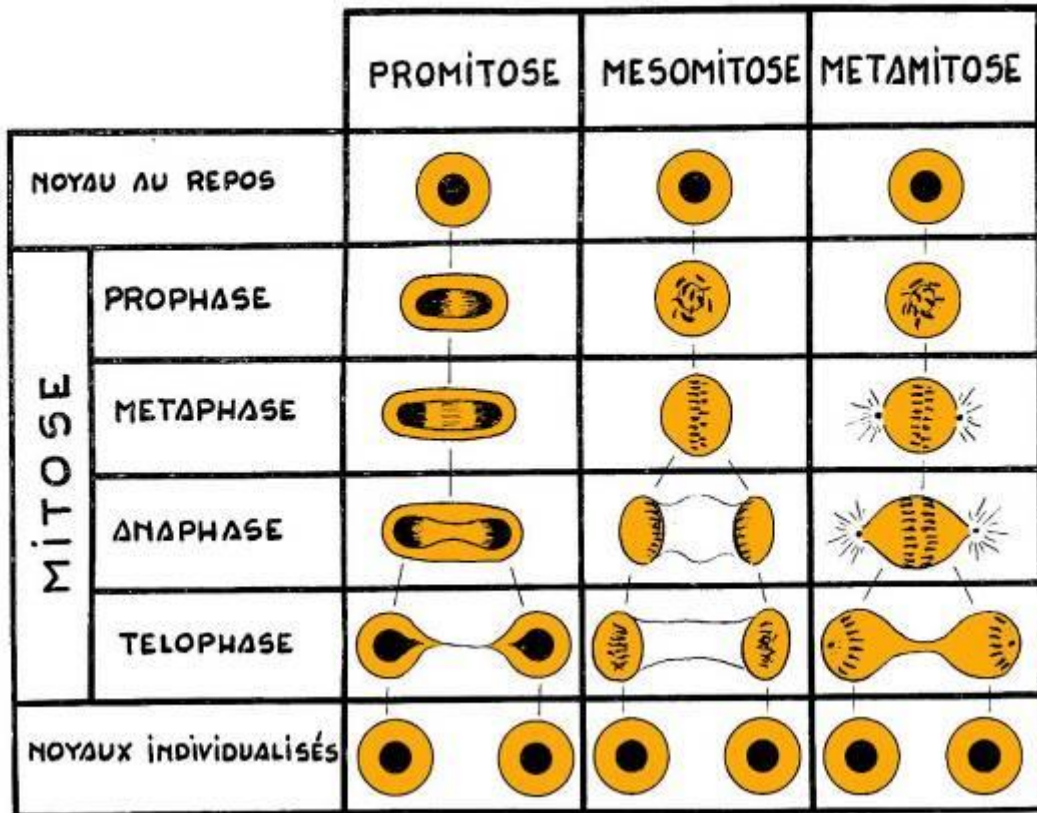
Décloitre (1986) a estimé le nombre total d'espèces d'amibes à thèque à 1890 espèces. Cette estimation est probablement largement sous-estimée pour 2 raisons : (1) à cette époque, la majorité des études sur les thécamœbiens est localisée à l'Europe et (2) Meisterfeld et Mitchell (2008) ont montré qu'entre des espèces morphologiquement très similaires, il existe d'importantes différences génétiques dans les séquences de l'ARNr ribosomique, ce qui suggère que la classification basée sur la morphologie des théques sous-estime la diversité des thécamœbiens.

1.3 BIOLOGIE DES AMIBES À THÈQUES

1.3.1 Reproduction

Les thécamœbiens se reproduisent par division mitotique, qui livre deux cellules filles identiques à la cellule mère (Fig.6). La cellule mère subit une exuviation (évacuation de la cellule de sa coquille) avec les matériaux stockés en prévision de la construction d'une nouvelle thèque (Chardez, 1967a). S'en suit une migration nucléaire et la séparation des deux nouvelles théques filles. Des observations ont montré que parfois, chez certains thécamœbiens, la reproduction pouvait s'effectuer par « sporulation » (Fig.6). Cette sporulation consiste à l'élaboration d'un kyste qui va à son tour créer 2 à 8 éléments reproducteurs, qui vont se disséminer, passer par un stade amiboïde avant de reconstituer une thèque. Ces phénomènes ont été observés chez les genres *Arcella* (Prowazek, 1900 ; Penard, 1902), *Euglypha* (Penard, 1902) ; *Plagiopyxis* (Bonnet, 1960). En 1964, Bonnet et Chardez ont respectivement décrit ce phénomène chez des thécamœbiens du sol et aquatiques. La reproduction n'est pas le seul phénomène qui entraîne l'exuviation de l'organisme. En effet, il a été observé que lorsque la thèque était endommagée de manière irréparable sans que l'individu soit blessé, alors celui-ci se libérait de sa coquille pour en recréer une (Charret, 1962 ; Chardez, 1967a).

a.



b.

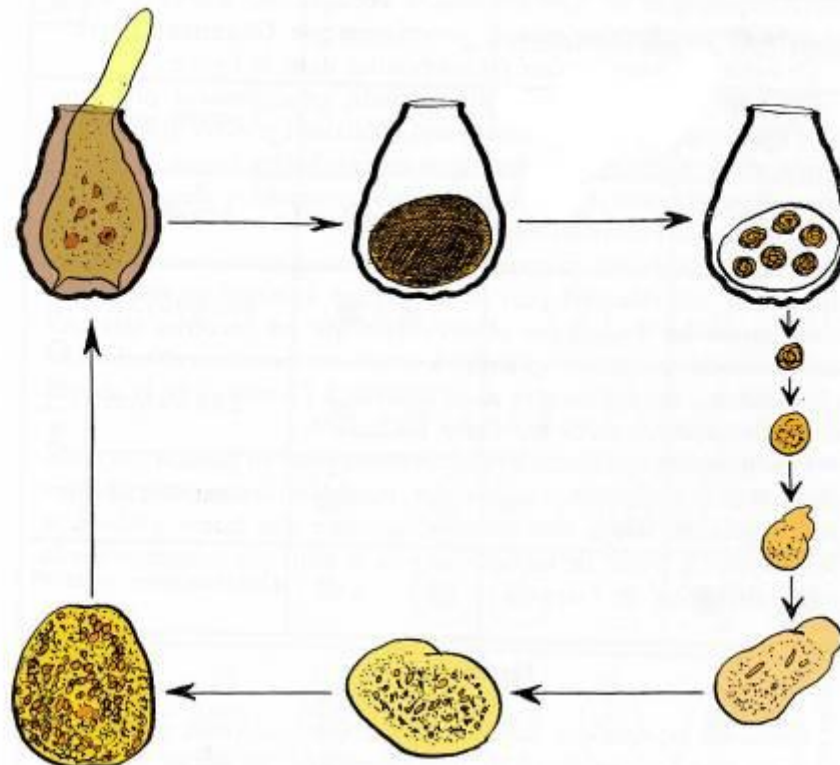


Fig.6 – Schémas des 2 types de reproduction des thécamœbiens d'après Chardez (1967a).
 a. La division mitotique et ses 3 variantes connues chez les amibes à thèque : la promitose,

la mésomitose et la métamitose ; b. La reproduction par création d'éléments reproducteurs, ou « sporulation ».

Le taux de génération observé lors de cultures d'amibes à thèque en laboratoire varie entre 2 et 4 jours (Hedley et Ogden, 1973, 1974a ; Hedley et al., 1974, 1977). Dans des conditions plus naturelles, on estime qu'une génération se renouvelle entre 6 et 11 jours (Heal, 1964a). Schönborn (1992) a constaté que les thécamœbiens peuvent effectuer 10 à 100 nouvelles générations par an, en fonction des paramètres environnementaux (température, quantité de nutriments disponibles, densité de population). Les stratégies de reproduction des amibes à thèques dépendent de leur lignée : les Lobose ont une stratégie de type « K » alors que les Filose développent une stratégie de type « r » (Mattheeussen et al., 2005).

1.3.2 Régime alimentaire

Une majorité de thécamœbiens sont hétérotrophes et certains sont mixotrophes (Gilbert et al., 2000 ; Goma et al., 2014). Le régime alimentaire des thécamœbiens est très varié : selon l'espèce, ils peuvent se nourrir matière organique particulaire détritique, de bactéries, d'hyphes ou de spores de champignons, de protozoaires ou de métazoaires (rotifères, nématodes). Certaines espèces sont polyphages et d'autres ont un régime alimentaire beaucoup moins varié (Gilbert et al., 2000). Certaines espèces comme *Nebela marginata* sont algivores et se nourrissent de débris algues ou de l'algue en entier (Deflandre, 1936). D'autres sont bactérivores comme *Euglypha cristata* (Gilbert et al., 1998). Bien que difficilement assimilés, les spores de champignons sont fréquemment retrouvées dans les vacuoles digestives de *Phryganella acropodia* (Coûteaux et Pussard, 1983) ou de *Nebela tincta* (Jassey et al., 2012). De nombreuses espèces endogènes ont un régime détritivore ou nécrophage (Bonnet, 1964 ; Coûteaux et Pussard, 1983). Certaines espèces de thécamœbiens sont de redoutables prédateurs : les espèces du genre *Cyphoderia* se nourrissent de diatomées, desmidiées et trachelomonas (Thomas, 1958b), d'autres comme les *Arcella* peuvent se nourrir de protozoaires flagellés hétérotrophes (Deflandre, 1953), certaines *Nebela* chassent les espèces du genre *Euglypha* ou *Trinema*, *Hyalosphenia papilio* ingère des rotifères et des ciliés (Jassey et al., 2012) et *Hyalosphenia platystoma* s'attaque fréquemment à d'autres thécamœbiens de plus grande taille en perforant leur thèque (Gilbert et al., 2000).

Les thécamœbiens utilisent leurs pseudopodes pour appréhender leurs proies, puis les phagocytent, les digèrent via leurs vacuoles digestives les rejettent par exocytose. Lors du processus de prédation, certaines espèces en profitent pour prélever des éléments constitutifs des thèques ou la totalité de l'enveloppe rigide de leur proie (e.g. frustules de diatomées, petites thèques d'*Euglypha*) pour compléter leur propre thèque. C'est le cas de

quelques espèces du genre *Nebela* ou *Padaungiella* qui réutilisent les idiosomes siliceux ou s'en servent comme mur protecteur lors du processus de digestion (Lahr et al., 2015). Les processus de reconnaissance et de sélection des proies sont multiples et varient selon les espèces. En effet, il apparaît que le contact direct des pseudopodes est nécessaire chez *Corythion dubium*, alors que les espèces du genre *Nebela* sont capables de détecter à distance leur proie par chimiotactisme (Gilbert et al., 2000).

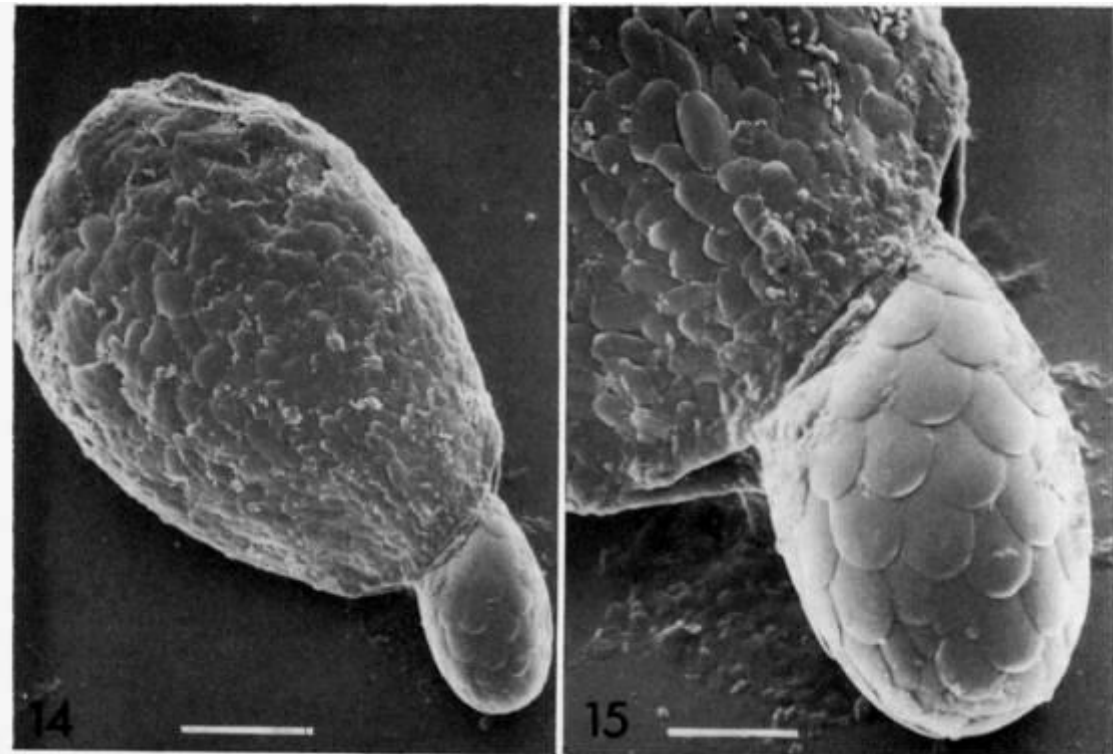


Fig.7 – Image en microscopie électronique à balayage de *Heleopera petricola* en train d'attaquer une de ses proies favorites, *Tracheleuglypha dentata* (Coûteaux et Ogden, 1988).
La barre d'échelle de gauche mesure 20µm.

Les amibes à thèque sont au bout de la chaîne alimentaire microbienne. Ils peuvent donc renseigner sur les niveaux trophiques inférieurs qu'ils consomment (Mast et Root, 1916 ; Gilbert et al., 2000). Par conséquent, ils occupent un rôle majeur dans la boucle microbienne (Schröter et al., 2003 ; Aoki et al., 2007 ; Wilkinson et al., 2008). En tant que « top prédateurs », ils régulent la prolifération des microorganismes qu'ils consomment. Malgré leur taille microscopique, leur biomasse relative dans les tourbières a été estimée par Gilbert et al. (1998b) de 19 et 48%, puis par Mitchell et al. (2003) entre 4,2 et 30%. Ces estimations renforcent l'hypothèse de leur rôle clé sur le cycle des nutriments dans ces biomes.

2 LES THÈQUES D'AMIBES

Les thèques, enveloppes extracellulaires construites par ces amibes, sont la particularité majeure qui a entraîné la caractérisation de ce groupe polyphylétique. Ces thèques sont le centre de gravité des travaux présentés dans cette thèse. Leurs compositions et dans quelle mesure celles-ci peuvent traduire l'environnement sont les 2 fils directeurs qui sont tissés dans l'ensemble des chapitres de ce rapport. Dans cette partie, on s'attache à donner le détail des différents types de thèques, puis la composition de celles-ci, à l'origine de cette classification. Enfin, on évoque les différents paramètres qui conditionnent la composition des thèques.

2.1 TAILLE, STRUCTURE ET DIFFERENTS TYPES DE THEQUES

L'intervalle de taille des thèques est important, et s'échelonne d'une dizaine de microns (e.g. *Cryptodiffugia minuta*) à environ 600 μm (e.g. *Diffugia gigantea*). L'immense majorité des espèces possède une taille inférieure à 300 μm (Chardez, 1967a). Les variations morphologiques (Fig.8) et du contenu des thèques est très variable et complexe, et sera détaillé dans le paragraphe suivant (cf « 2.2-Composition des thèques d'amibes »).

Mesurant l'importance que ces thèques avaient sur la caractérisation de la morphologie des individus, de nombreux scientifiques ont tenté, dès les années 60, d'analyser la composition des thèques d'holotypes de nombreuses espèces. Colin Gerald Ogden est à l'origine de nombreux articles sur le sujet et père d'un atlas (« An atlas of freshwater testate amoebae », Ogden et Hedley, 1980) encore largement utilisé par l'ensemble de la communauté de spécialistes presque 40 ans après sa publication.

La classification la plus utilisée est basée sur la composition des thèques et possède plusieurs degrés de complexité. Ogden et Hedley (1980) classent les thèques en 4 catégories, en se basant sur la composition générale des thèques :

- les thèques protéiques, qui sont les thèques endogènes totalement organiques, dont la matrice organique est sécrétée par l'amibe (e.g. *Archerella flavum*)
- les thèques siliceuses, correspondant aux thèques endogènes constituées de plaques ou d'objets siliceux amorphes de formes et de tailles variées sécrétés par l'amibe, arrangés et collés grâce à une matrice organique (e.g. *Euglypha strigosa*)
- les thèques agglutinées, qui regroupent les thèques exogènes construites avec des grains recyclés (« xénosomes », e.g. particules minérales, organiques ou d'origine biologique) par l'amibe (e.g. *Diffugia pyriformis*)

- les thèques « calciques », très peu représentées, sont des thèques endogènes carbonatées composées d'une épaisse couche interne de phosphate de calcium amorphe protégée par une fine couche externe organique (Hedley et al., 1977). Parmi les espèces qui composent ce groupe, on retrouve *Cryptodiffugia oviformis* et *Paraquadrula irregularis*.

Les différents objets constituant les thèques idiosomiques sont appelés les idiosomes. Ces idiosomes peuvent, chez certaines espèces, être utilisées en complément de particules minérales ou organiques recyclées, appelés xénosomes, dans le cas des thèques xénosomiques. Le contenu de la thèque en ces différents objets va exercer une influence sur la conservation des thèques. Par exemple, les formes xénosomiques ont une meilleure résistance mécanique et à la dissolution (Mitchell et al., 2008). Les paramètres physico-chimiques (e.g. acidité, conditions rédox) et énergétiques du milieu vont donc moduler la conservation des thèques.

Certains paramètres comme la quantité de grains disponibles, le degré d'humidité, la teneur en silice dissoute et la qualité et quantité de nutriments (Ogden 1988 et 1989 ; Anderson 1990 ; Wanner et Meisterfeld 1994) peuvent faire varier les dimensions et la morphologie des thèques de certaines espèces. Ces variations intra-spécifiques rendent l'identification de certaines espèces complexes : « Nombreuses sont les espèces qui ont été subdivisées en variétés et formes sur des critères morphologiques de la thèque en réalité peu apparents et souvent sujet à interprétation. » (Chardez, 1974, *Note sur la morphologie des thécamœbiens*). Les formes les plus massives, majoritairement xénosomiques, sont le plus souvent inféodées aux étendues d'eau permanentes tels que les étangs, lacs, rivières et zones supratidales des estuaires. A l'inverse, on retrouve les thèques les plus miniatures dans les sols, et des thèques de tailles intermédiaires dans les sphaignes, les mousses et la tourbe (Chardez, 1965a). L'hétérogénéité des composants agglutinés dans les thèques dépend de l'espèce, du milieu de vie mais aussi des habitudes alimentaires et de la capacité de sélection des objets (Ogden et Hedley, 1980).

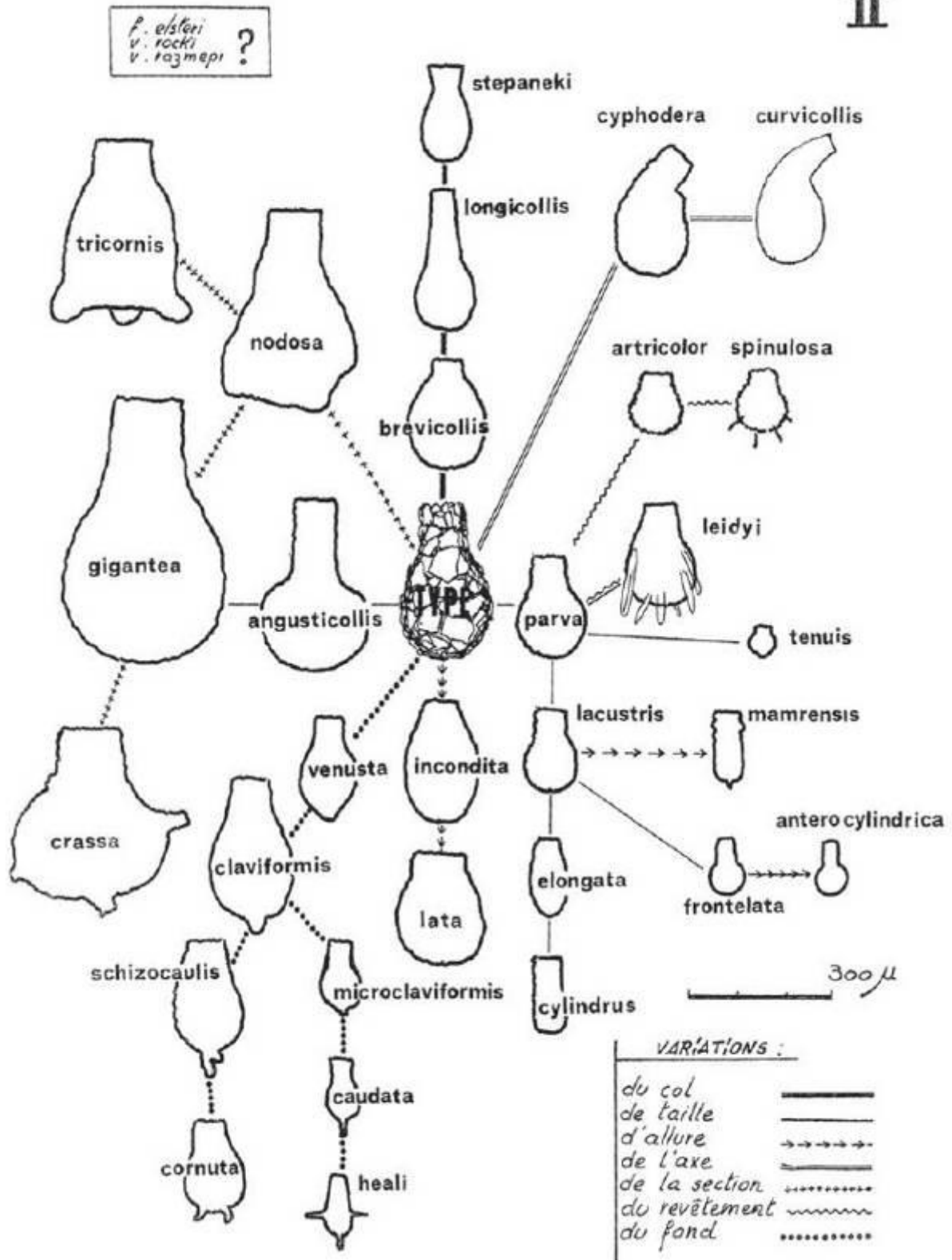


Fig.8 – Schéma hypothétique des correspondances morphologiques pour l'ensemble des *Diffugia* pyriformes et corniculées, mettant en évidence les variations conduisant aux espèces, variétés et formes actuelles, de Chardez (1974)

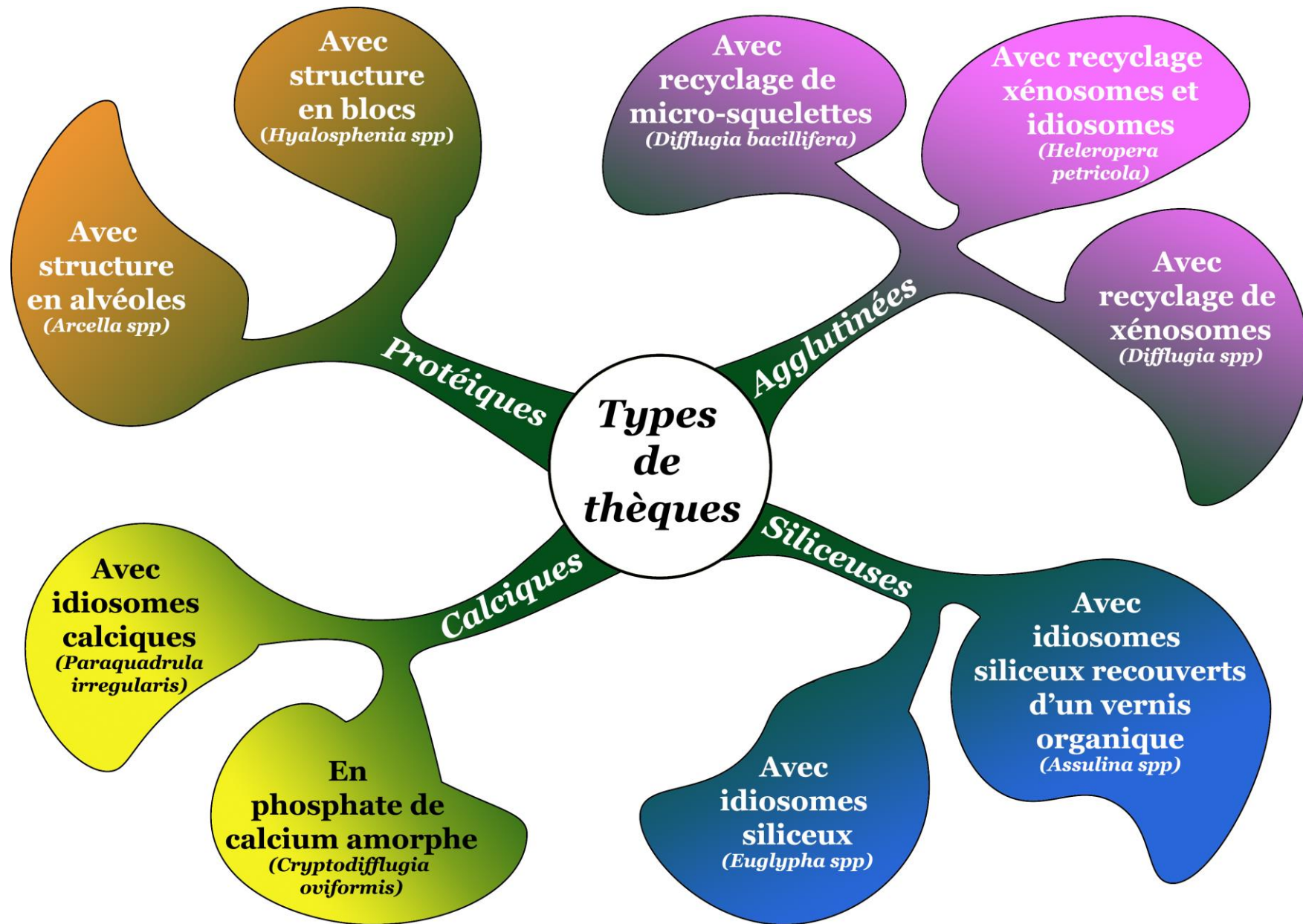


Fig.9 – Schéma représentant les 4 différents types de thèques d'amibes principaux : protéiques, agglutinées, siliceuses et calciques et leurs variantes

intrinsèques

2.1.1 Les thèques protéiques

Les thèques protéiques sont endogènes ; l'organisme va sécréter lors de la division cellulaire un matériel organique homogène pour construire l'intégralité la thèque « fille ». Ces thèques ont une apparence lisse et homogène. Seule l'observation au microscope électronique permet de subdiviser les thèques protéiques en 2 catégories : les thèques protéiques structurées en (1) alvéoles (Fig.10) ou (2) en blocs. *Arcella* est un genre représentatif de la catégorie de thèques alvéolées, comme l'a montré Netzel (1975a-b). On verra plus loin que ce matériel organique alvéolaire sert de base d'agglutinat à certaines espèces xénosomiques telles que *Centropyxis discoides*. *Hyalosphenia* est quant à lui le genre représentatif des thèques protéiques homogènes construites « en blocs » (Joyon et Charret, 1962).

2.1.2 Les thèques agglutinées

Les thèques agglutinées sont nettement plus complexes. Elles sont exogènes et peuvent contenir selon l'espèce et son environnement une multitude de composants qui seront intégrés à la thèque en surface ou en profondeur à l'aide d'un ciment organique similaire à celui produit par les espèces aux thèques protéiques. Selon Ogden et Hedley (1980), on peut distinguer 2 groupes parmi les thèques agglutinées : (1) les thèques qui agglutinent uniquement des xénosomes (une grande partie de la famille des Diffugiidae) et (2) les thèques qui agglutinent à la fois des xénosomes et des idiosomes (Fig.11).

Le premier groupe est composé d'une grande partie des espèces du genre *Diffugia*, qui recyclent des grains minéraux, organiques ou d'origine biologiques issus de leur environnement immédiat. La distribution des particules est plus ou moins soignée selon l'espèce. Certaines, comme *Diffugia corona* arrangent les fines particules au niveau du pseudostome pour créer un motif ressemblant à des dents (Ogden et Hedley, 1980).

Le second groupe est constitué de nombreuses espèces du genre *Nebela* et *Heleopera*, qui, après s'être nourrit de petits thécamœbiens comme les espèces du genre *Euglypha*, vont prélever leurs idiosomes siliceux et les agglutiner à l'aide d'un ciment organique au sein de leur propre thèque (phénomène baptisé « kleptosquamie » -comprendre le « vol d'écailles » provenant d'autres individus- par Dan Lahr (Lahr et al., 2015)).

On pourrait ajouter à ces 2 catégories une troisième, comprenant les espèces avec les thèques agglutinées constituées majoritairement ou intégralement d'enveloppes siliceuses intactes ou fragmentées d'autres microorganismes (e.g. thèques, frustules) (Fig.11). Parmi les espèces qui font partie de ce groupe, on peut citer *Diffugia bacillifera*, *Diffugia bacilliarum*, *Diffugia hydrostatica* (Meisterfeld et Mitchell, 2008) ou encore *Diffugia angulostoma* (Ogden, 1983). A la lueur de ces groupes, on s'aperçoit que le régime

alimentaire des thécamœbiens xénosomiques doit, en tout cas pour certaines espèces (e.g. celles du genre *Nebela*), avoir des répercussions sur la composition de leur thèque.

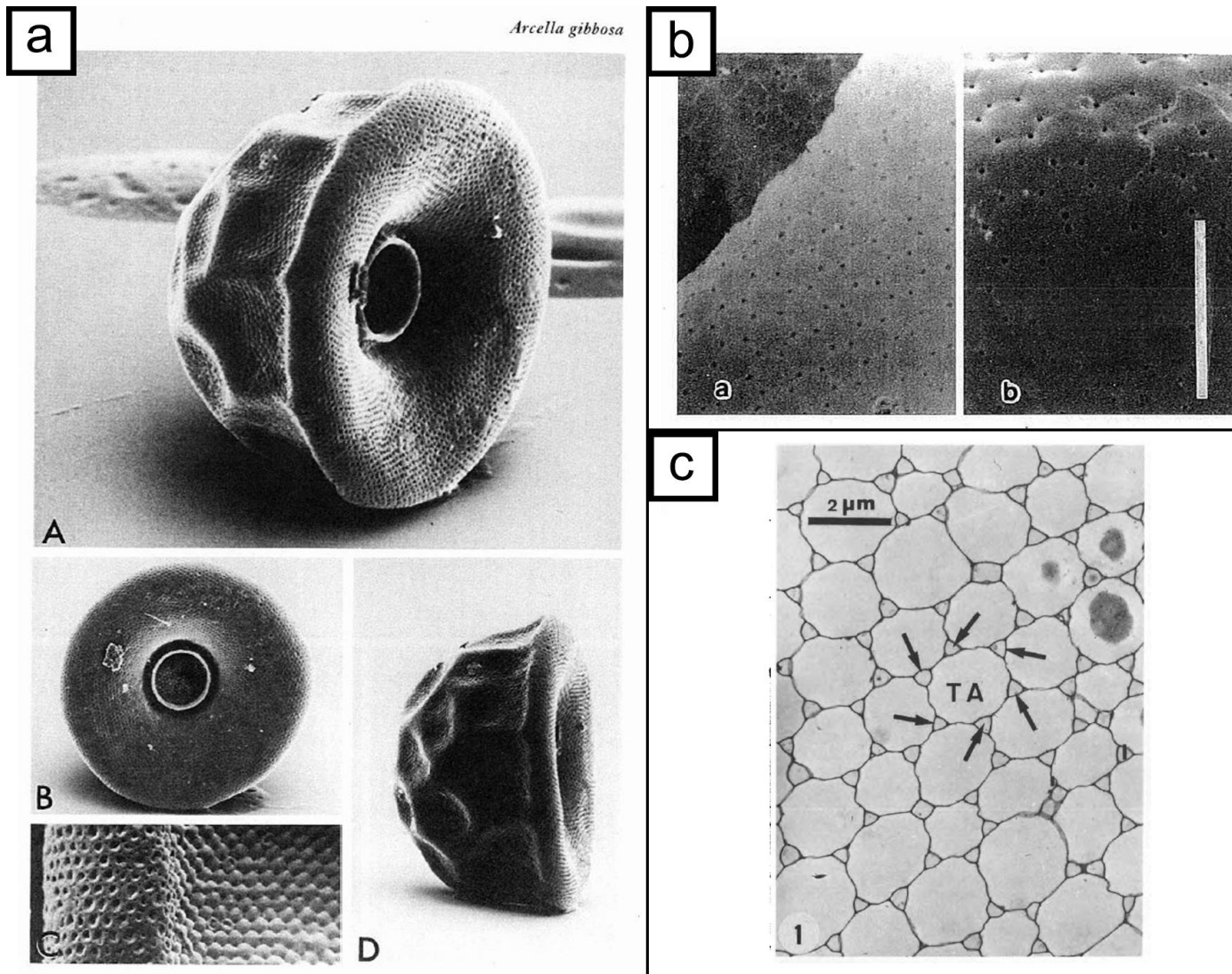
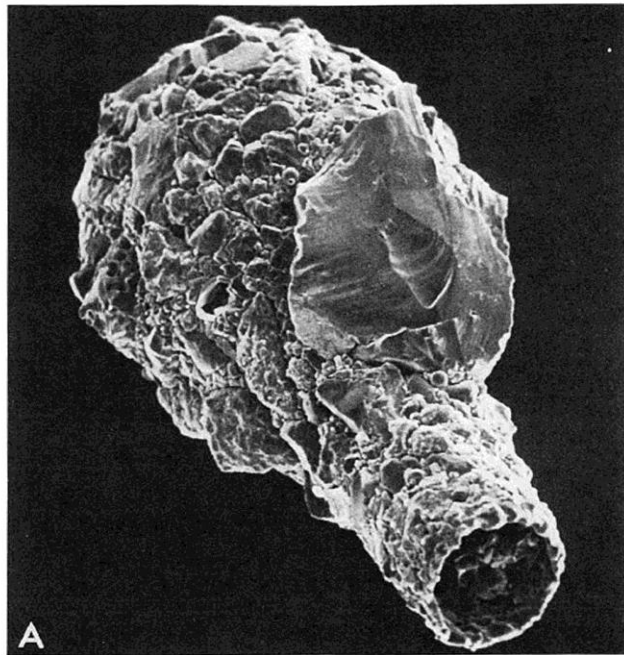
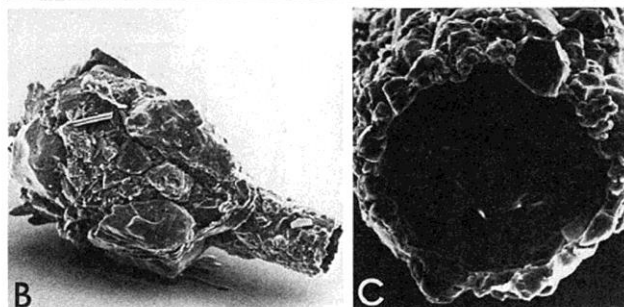


Fig.10 – Images obtenues en microscopie électronique à balayage (MEB, a-b) et à transmission (MET, c) montrant la structure alvéolaire de la matrice organique des thèques organiques du genre *Arcella*. a : plusieurs vues de l'espèce *Arcella gibbosa* par Ogden & Hedley (1980) ; b : zoom sur les alvéoles de *Arcella hemisphaerica* (a) et *Arcella gibbosa* (b) par Meisterfeld (2002a) ; c : section tangente (MET) de *Arcella vulgaris* montrant les alvéoles (TA) et les puits intercalaires (flèches) dans Mignot et Raikov (1990)

Recyclage de
xénosomes



A

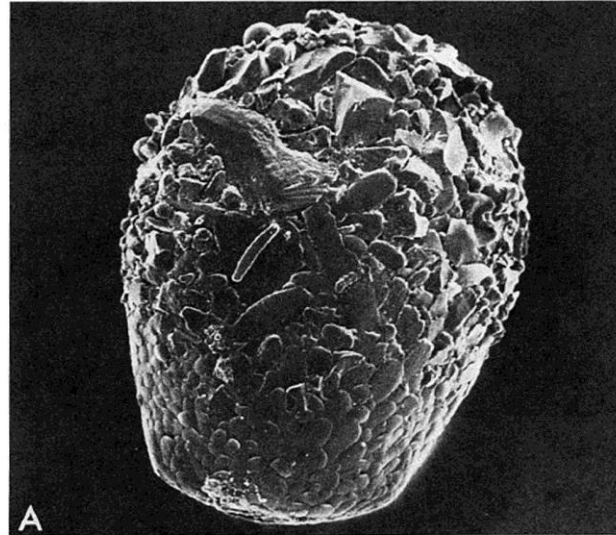


B

C

Diffflugia oblonga

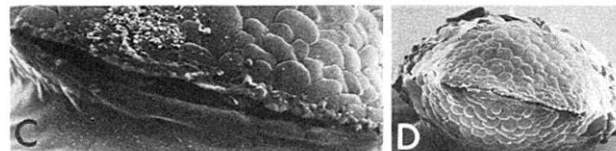
Recyclage de
xénosomes et d'idiosomes



A



B

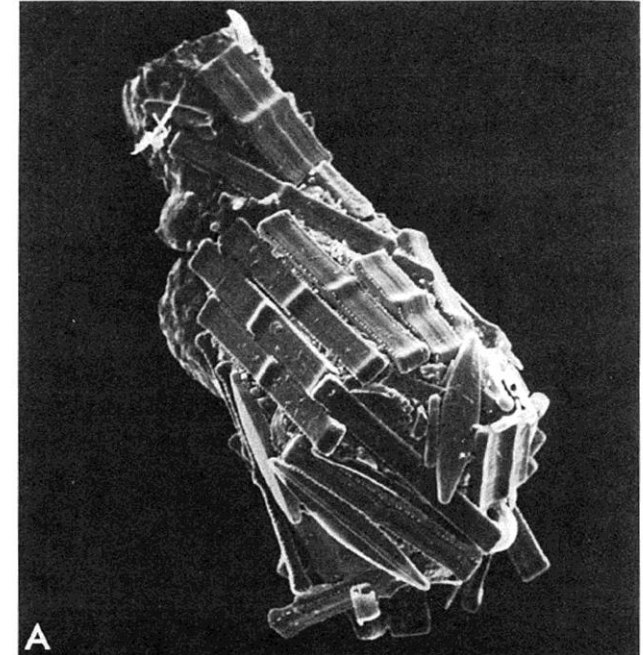


C

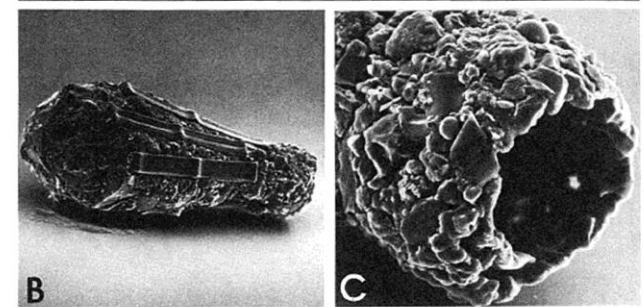
D

Heleopera sphagni

Recyclage de
micro-squelettes



A



B

C

Diffflugia bacillifera

Fig.11 - Images MEB des 3 variantes de recyclage de particules des thèques agglutinées (Ogden et Hedley, 1980) : les espèces qui recyclent les xénosomes (e.g. *Diffflugia oblonga*), à la fois xénosomes et idiosomes (e.g. *Heleopera sphagni*) ou des micro-squelettes (e.g. *Diffflugia bacillifera*) pour construire leur thèque

2.1.3 Les thèques siliceuses

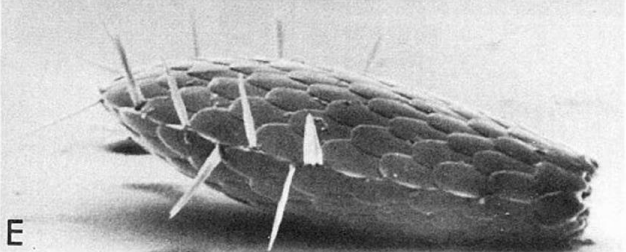
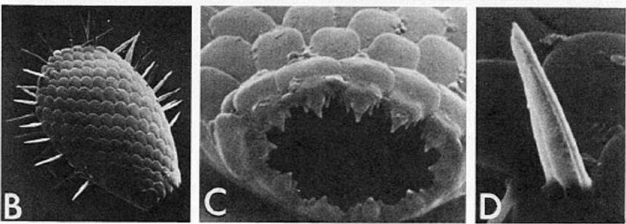
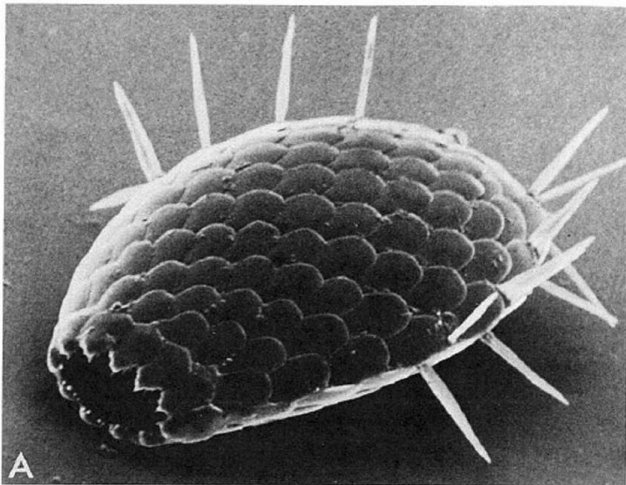
Les thèques siliceuses comprennent les espèces qui sécrètent et construisent une thèque faite d'idiosomes siliceux. Ces idiosomes siliceux sont formés avant la division cellulaire et stockés dans le cytoplasme à proximité du noyau adulte (Hedley et Ogden, 1973, 1974a). Lors de la division, le cytoplasme chargé en idiosomes siliceux sort du pseudostome, des microtubules forment un cœur au centre du cytoplasme et les idiosomes se distribuent en périphérie du cytoplasme. Ils sont alors organisés en fixés par un ciment organique pour former un motif identique à celui de la cellule mère (Hedley et Ogden, 1974b). Ce ciment organique est surtout présent aux jonctions entre les idiosomes. Les idiosomes siliceux ont une grande variété de taille et de formes : ils peuvent se présenter sous la forme d'écaille ovale (e.g. *Euglypha rotunda*), circulaire (e.g. *Trinema enchelys*), ou carrée (e.g. *Quadrullella symmetrica*) ou de tiges (e.g. *Lesquereusia spiralis*). Des éléments ornementaux imbriqués dans les idiosomes tels que des épines sont développés par certaines espèces (e.g. *Euglypha strigosa*), d'autres encore manipulent l'ornementation en modifiant la longueur des idiosomes existants (e.g. *Lesquereusia spiralis hirsuta*). Il arrive chez certaines espèces (e.g. *Sphenoderia lenta*) que la taille des idiosomes varie considérablement entre le corps de l'amibe et la zone voisine du pseudostome (Chatelain et al., 2013). Mitchell et al. (2008) subdivisent ce groupe en 2 catégories : les thèques idiosomiques non recouvertes (e.g. genre *Euglypha*) et les thèques idiosomiques recouvertes par un épais vernis organique (e.g. genre *Assulina*) (Fig.12). C'est justement ce recouvrement qui explique la meilleure résistance des thèques des espèces du genre *Assulina* à la dissolution/décomposition (Swindles et Roe, 2007 ; Mitchell et al., 2008).

2.1.4 Les thèques calciques

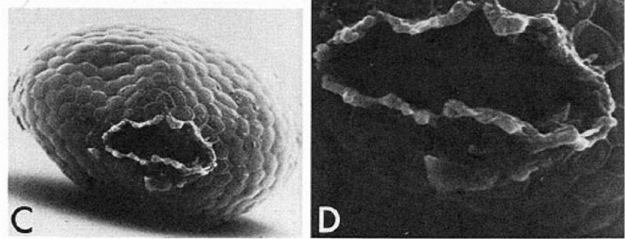
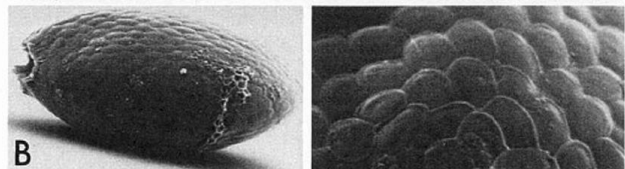
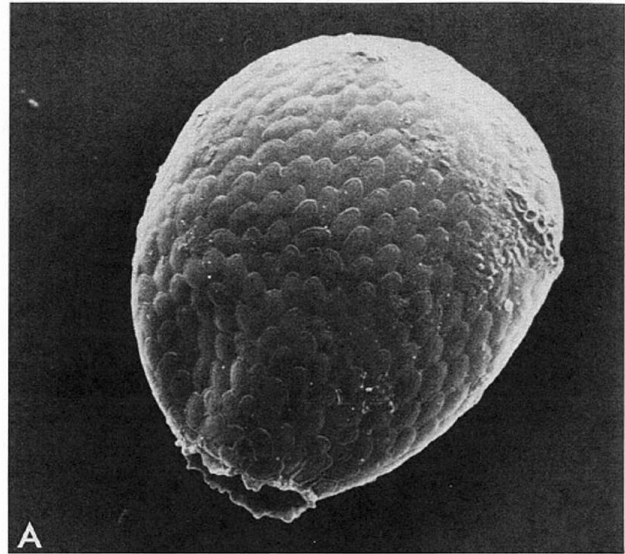
Le dernier type de thèque correspond aux thèques calciques. Ce type de thèque est nettement plus rare et ne contient que peu de représentants. *Cryptodiffugia oviformis*, dont la thèque est composée d'une épaisse couche de phosphate de calcium amorphe entourée d'un fin vernis organique externe (Hedley et al., 1977) compose un premier sous-groupe de thèques calciques (Fig.13). Le second sous-groupe est constitué d'espèces appartenant au genre *Lamptoquadrula* (e.g. *Lamptoquadrula deflandrei*, Bonnet 1974), *Pomoriella* (e.g. *Pomoriella valkanovi*, Golemansky 2008) et certaines *Paraquadrula* (e.g. *Paraquadrula irregularis*, qui prolifère notamment dans l'extrême arctique canadien, Beyens et al., 1991) (Fig.13). Ces thèques se composent d'idiosomes de carbonate amorphe sous la forme d'écailles carrées, qui se dissolvent lorsqu'on les expose à l'acide chlorhydrique, contrairement aux thèques siliceuses.

Idiosomes siliceux

Idiosomes siliceux recouverts d'un vernis organique



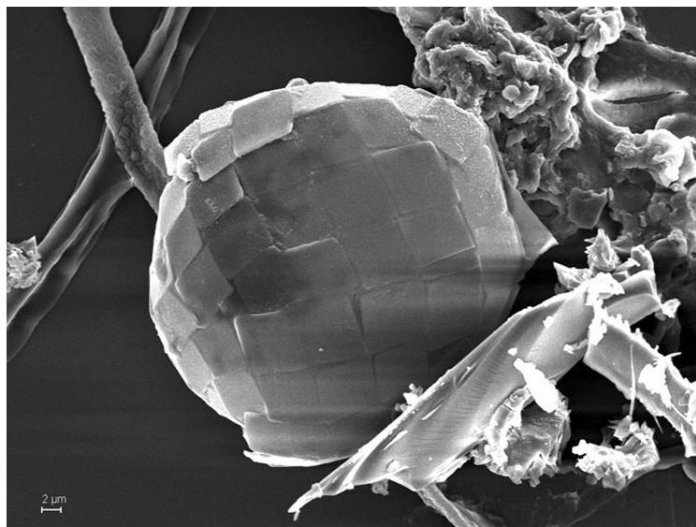
Euglypha compressa



Assulina muscorum

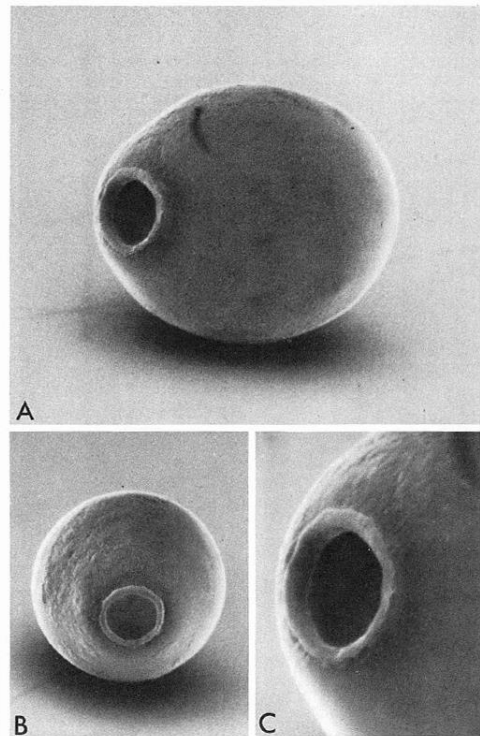
Fig.12 – Images MEB montrant les 2 types de thèques à idiosomes siliceux (Ogden et Hedley, 1980). A gauche, une espèce du groupe des thèques autoçènes à idiosomes siliceux (e.g. *Euglypha compressa*) ; à droite, une espèce faisant du groupe des thèques autoçènes à idiosomes siliceux recouverts d'un vernis organique (e.g. *Assulina muscorum*)

Idiosomes calciques



Paraquadrula irregularis

Phosphate de calcium amorphe



Cryptodifflugia oviformis

Fig.13 – Images MEB d'individus représentatifs des 2 types de thèques calciques : à gauche, *Paraquadrula irregularis*, qui sécrète des idiosomes calciques (image d'Eckhard Voelcker, visible sur le site de Ferry Siemensma <http://www.arcella.nl>) et *Cryptodifflugia oviformis*, qui sécrète une épaisse couche de phosphate de calcium amorphe et la recouvre d'un vernis organique (Ogden et Hedley, 1980)

2.2 COMPOSITION DES THÈQUES D'AMIBES

Excepté pour les formes protéiques qui ne sont pas pourvues d'éléments minéralisés, les deux composants majeurs des thèques sont (1) une partie organique, sous la forme d'une matrice et/ou d'un vernis servant à fixer (2) une partie minérale, composée d'éléments autogènes (idiosomes), xénogènes (xénosomes) ou les deux. C'est donc en 2 temps que l'on donnera le détail de l'état de connaissances sur la composition des thèques d'amibes.

2.2.1 Nature de la matrice organique

La nature chimique de la matrice organique n'est à ce jour pas encore précisément déterminée. Les premiers travaux sur la partie organique des thèques parlent de la présence d'une protéine similaire à de la kératine (Awerinzew, 1906). Le terme de « pseudo-chitine » a alors été introduit, et la chitine admise comme composant majeur de la matrice organique

(« vernis de chitine d'origine cytoplasmique » dans Chardez, 1967a). En 1964, Charret révèle la présence de mucoprotéines (un polysaccharide associé à une protéine) dans la thèque de *Hyalosphenia papilio*. A cette époque, une seule expérience (Jeuniaux, 1963) a montré des traces de composés similaires à de la chitine dans les thèques. Cependant, celle-ci est contestée par Moraczewski (1971) et Saucin-Meulenberg et al., 1973. Le terme « pseudo-chitine », est alors perçu comme inapproprié. Dans son étude de 1971, Moraczewski a entrepris, via les moyens analytiques en cytochimie de l'époque, de déterminer une bonne fois pour toutes la nature de cette substance organique chez une forme nue, *Arcella discoïdes*. Ces résultats ont montré que la coque d'*Arcella* contient les acides aminés suivants : glycine, acide glutamique, alanine, leucine, arginine, valine, phénylalanine, cystine et tyrosine. Les différentes analyses effectuées n'ont pas détecté la présence de mucopolysaccharides, qui tradiraient la présence d'un dérivé de chitine. Il en conclut qu'il faut renoncer au terme de pseudo-chitine au profit de la nature protéique de cette substance. Saucin-Meulenberg et al. (1973) confirment la nature protéique de la matrice organique, qui ne contiendrait ni chitine ni cellulose pour les 7 espèces étudiées. Le terme « pseudo-chitine » devient progressivement obsolète, on parle désormais de nature protéique de la matrice organique. Netzel (1975a-b) parle plus tard de la présence de scléroprotéine kératinoïde au cours d'analyses sur *Centropyxis discoïdes* et *Arcella vulgaris* var. *multinucleata*. Récemment, Burdíkóvá et al. (2010) ont remarqué au cours de leurs expériences visant à faire fluorescer les différents organites et endosymbiotes des thécamœbiens que chez certaines espèces une fluorescence s'opérait entre les idiosomes et au niveau du pseudostome (Fig.14). Cette fluorescence s'expliquerait par la présence d'estérases non spécifiques présents dans la matrice organique qui ont été réceptifs à la fuschine acide. Cette fuschine acide marque la chitine, les vacuoles et le cytoplasme. Après tout ce temps, le débat sur la présence de chitine dans la matrice organique des amibes à thèques semble donc ré-ouvert.

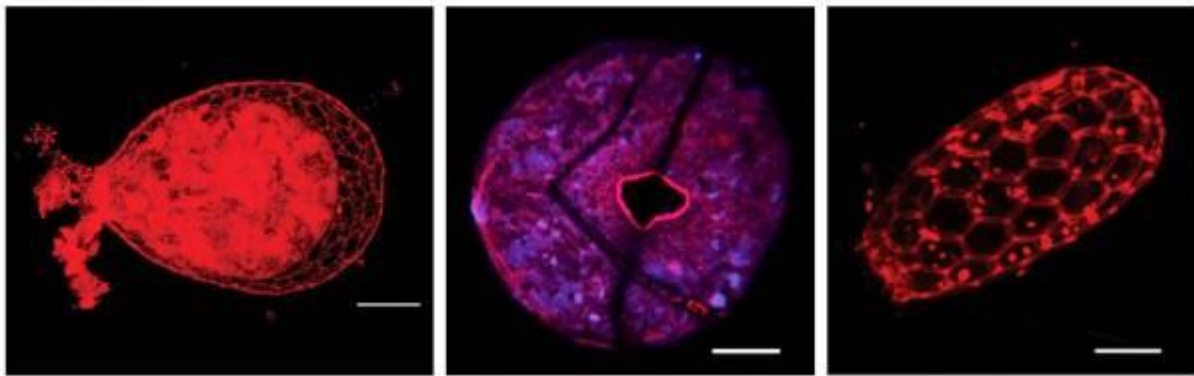


Fig.14 – Images en microscopie confocale laser à balayage de 3 espèces d'après Burdiková et al., 2010 (de gauche à droite : *Nebela tincta*, *Trigonopyxis arcula* et *Tracheleuglypha dentata*) dont certaines zones des thèques fluorescent en rouge suite au marquage à la fuschine acide. La fuschine acide cible la chitine, les vacuoles et le cytoplasme. Les barres d'échelles mesurent respectivement 20, 30 et 10µm.

Hedley et al. (1976) et Ogden (1988b) ont observé que la matrice organique des structures alvéolaires pouvait contenir du calcium, du phosphore, de chlore et du potassium, mais aussi des éléments métalliques lourds amorphes tels que le manganèse et le fer chez les genres *Diffflugia* et *Centropyxis*. La présence de ces éléments s'accroîtrait avec l'âge des thèques et ils contribueraient à la renforcer tout en provoquant son assombrissement. Ces observations ont également été constatées dans des travaux personnels (non publiés) chez des *Arcella* provenant de tourbières franc-comtoises et des *Centropyxis* provenant du Chili (cf Chapitre 2).

Des travaux personnels réalisés lors d'un stage de 1^{ère} année de master (non publiés) ont été menés à l'aide de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) sur les principales espèces d'amibes à thèques des sphaignes des tourbières. Cette technique analytique permet de mettre en évidence les liaisons chimiques des composants de la matrice organique des thèques grâce aux longueurs d'ondes des pics d'absorbance. Les résultats obtenus montrent la présence dans la plupart des espèces de groupements O-H et N-H, de lipides (groupes méthyle et méthylène) et du groupe carboxyle. Ils confirment également l'existence de protéines par la présence de pics de toutes les familles d'amides (primaires, secondaires et tertiaires). Enfin, on note la présence de la liaison –COO-, du pic de silice (uniquement présent chez les espèces idiosomiques) et de pics correspondant aux argiles (uniquement présent chez les espèces xénosomiques).

2.2.2 Composition minérale des thèques

2.2.2.1 Composition minérale autogène

Exprimer la composition minérale autogène revient, pour la quasi-intégralité des espèces (sauf *Cryptodifflugia oviformis*), à déterminer la nature chimique des idiosomes. Or, on a vu dans la partie 1.4.2 que ceux-ci pouvaient être de nature siliceuse ou calcique.

Composition des idiosomes

Les idiosomes carbonatés, rares et présents notamment chez les espèces du genre *Paraquadrula* ont d'abord été définis comme siliceux par Penard (1891) puis calcaires par Lagerheim (1902). Penard, Cash, Awerintzew et Deflandre ont par la suite confirmé cette nature calcaire selon Décloitre (1961). Une simple goutte d'acide chlorhydrique déposée sur les thèques de cette espèce dissout totalement les idiosomes et confirment leur composition carbonatée.

La nature siliceuse de la plupart des idiosomes est déduite de la seule observation de leur morphologie, depuis les premières descriptions des thécamœbiens idiosomiques (e.g. Leidy, 1878c). Néanmoins, les microanalyses élémentaires vérifiant ces hypothèses n'ont été mises en œuvres que bien plus tard, par Stout et Walker (1976) et Jeanson et Coûteaux (1977). Les résultats de leurs expériences, bien que peu précises à cause des techniques de métallisation de l'époque, ont permis de confirmer la nature siliceuse des idiosomes en forme d'écailles des espèces appartenant au genre *Euglypha*. En 1987, Von Karl Rauenbusch a effectué des microanalyses élémentaires plus précises sur de nombreuses espèces de thécamœbiens de sols forestiers, qui ont confirmé la nature siliceuse des écailles secrétées par les genres *Euglypha* et *Trinema*. *Netzelia tuberculata*, une espèce sécrétant des granules siliceux plutôt que des écailles, a aussi été étudiée en détail par Anderson (1987, 1988 et 1990).

Composition de *Cryptodifflugia oviformis*

A ce jour, *Cryptodifflugia oviformis* est la seule espèce connue pour être capable de sécréter du phosphate de calcium amorphe pour construire sa thèque (Hedley et al., 1977). En ce sens, elle représente à elle seule une composition minérale particulière d'origine autogène.

2.2.2.2 Composition minérale xénogène

La composition minérale xénogène est bien plus variée que la composition minérale autogène. En effet, celle-ci correspond, chez les formes xénosomiques, à l'ensemble de la diversité minérale des particules recyclées par les thécamœbiens. Les constituants minéraux peuvent être d'origine terrigène (débris issus de l'érosion des roches) mais aussi d'origine

biogénique, sous la forme de squelettes de micro-organismes (à l'état complet ou fragmentaire ; e.g. diatomées).

Basés sur les descriptions de Leidy (1879), Eckert et McGee-Russell (1974) définissent les éléments minéraux de *Diffugia lobostoma* comme étant des « grains de sable ». Stout et Walker (1976) sont les premiers à avoir qualitativement analysé les composants minéraux des thèques d'amibes à l'aide d'une microsonde RX couplée à un microscope électronique à balayage. Sans mettre un nom sur les minéraux qui composent les thèques, les résultats de leurs expériences montrent néanmoins que les *Diffugia* contiennent les éléments Si, Al, Na et Cl, les *Centropyxis* et *Cyclopyxis* sont composés des éléments Si, Al, K et Ca et les *Euglypha* sont composés majoritairement de silice (Si) avec des traces d'aluminium (Al). A l'aube des années 80, la diversité minérale des amibes xénogènes est encore très largement sous-estimée. Ogden et Hedley (1980) n'évoquent que le quartz (SiO₂) comme minéral présent dans les thèques agglutinées. D'autres études basées sur les micro-analyses élémentaires sont répétées en 1977 par Jeanson et Coûteaux et en 1987 par Von Karl Rauenbusch. Ces études montrent que d'autres éléments tels que le fer (Fe), le titane (Ti) le magnésium (Mg) ou le manganèse (Mn) peuvent faire partie des éléments constitutifs des thèques. Cependant, ces scientifiques n'ont pas réussi à relier la diversité élémentaire, si large soit elle, avec la diversité des minéraux dont ils sont les constituants. Il a fallu attendre des collaborations interdisciplinaires entre microbiologistes et géologues pour lever le voile sur la minéralogie des xénosomes. En 2010, Armynot du Châtelet et al. analysent la composition minérale de thécamœbiens lacustres appartenant aux genres *Centropyxis* et *Diffugia* et dénombrent 6 espèces minérales différentes (quartz, calcite, muscovite, rutile, albite et microcline) et avec un degré de précision moindre 3 familles minérales (chlorite, oxyde de fer et séricite) utilisées pour la construction des thèques. Dans cette étude, la taille et la nature minérale des xénosomes composant les thèques est mise en relation avec le sédiment duquel les thèques ont été extraites. En 2013, Armynot du Châtelet et al. ajoutent à cette liste l'orthose, le plagioclase, l'épidote et des amphiboles, détectées dans des thèques de *Diffugia oblonga*. Enfin, 24 minéraux différents sont identifiés dans 7 espèces d'amibes à thèques provenant de plusieurs tourbières à sphaignes par Armynot du Châtelet et al. (2015) (Fig.15). Les conclusions de cette dernière étude sont que les particules minérales utilisées par les amibes reflètent l'environnement géologique proche et que les tailles de celles-ci semblent être en relation avec la distance de leur source.

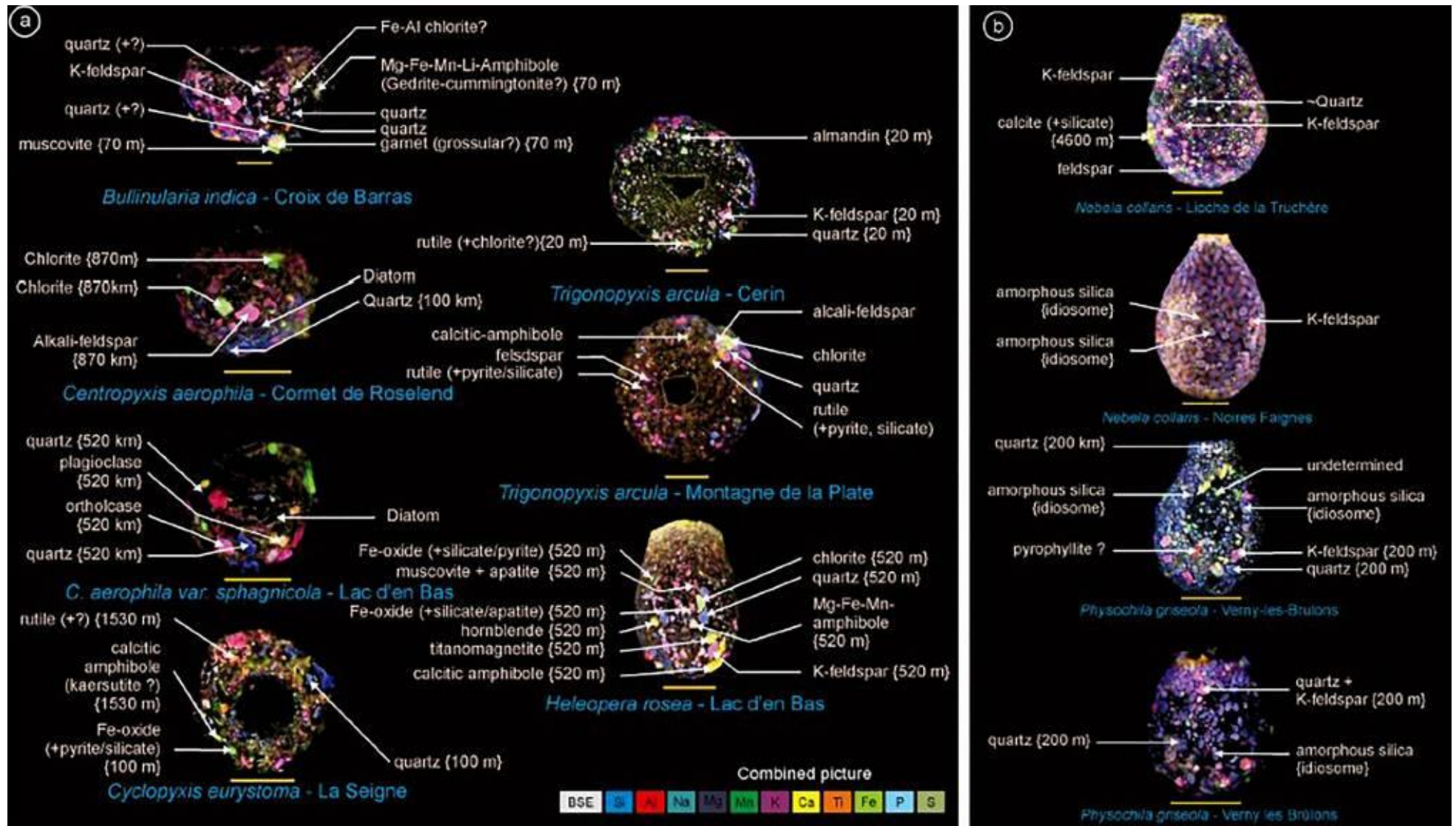


Fig.15 – Images composites de cartographies élémentaires obtenues en microscopie électronique à balayage EDS de 11 espèces de thécamœbiens des sphaignes de tourbières franc-comtoises (Armynot du Châtelet et al., 2015). Les éléments chimiques cartographiés sont Si, Al, Na, Mg, Mn, K, Ca, Ti, Fe, P et S, à chacun correspond une couleur spécifique. La variation de couleurs au sein des thèques illustre la diversité élémentaire (i.e. la diversité minérale). Pour chaque thèque, l'ensemble des minéraux identifiés sont indiqués.

2.3 PARAMÈTRES INFLUENÇANT LA COMPOSITION DES THÈQUES D'AMIBES

Vers la fin des années 80, la polymorphie constatée de certaines espèces au cours d'essais en culture ont poussé les scientifiques à mieux comprendre les facteurs à l'origine des variations morphologiques des thèques d'amibes. Ce besoin de connaissance était alors alimenté par la nécessité de comprendre jusqu'où la précision de la description des traits morphologiques pouvait s'étendre, dans le but d'éviter la multiplication des noms d'espèces basée sur des critères fluctuants. La quantité de particules disponibles module la morphologie de *Diffflugia globulosa*, qui en l'absence de particules minérales disponibles construit une thèque totalement organique selon Ogden, 1988. En 1989, Ogden poursuit ses expériences et démontre que la qualité des éléments mis à disposition de *Heleopera petricola* influence également la construction de sa thèque. En l'absence de particules détritiques, *Heleopera petricola* utilise alors les idiosomes de ses proies pour construire sa thèque. Lorsque les éléments de constructions favorisés par ce thécamœbien ne sont pas disponibles, le temps nécessaire à la génération de nouveaux individus est allongé, à cause de la perte de temps occasionnée pour trouver des matériaux de substitution (dans le cas d'*Heleopera petricola*, des idiosomes siliceux). Le processus s'inverse lorsque des particules minérales sont rajoutées dans le milieu de culture. Anderson (1990) observe que la quantité de silice dissoute favorise la vitesse de croissance et modifie la composition des thèques de *Netzelia tuberculata* (Fig. 16).

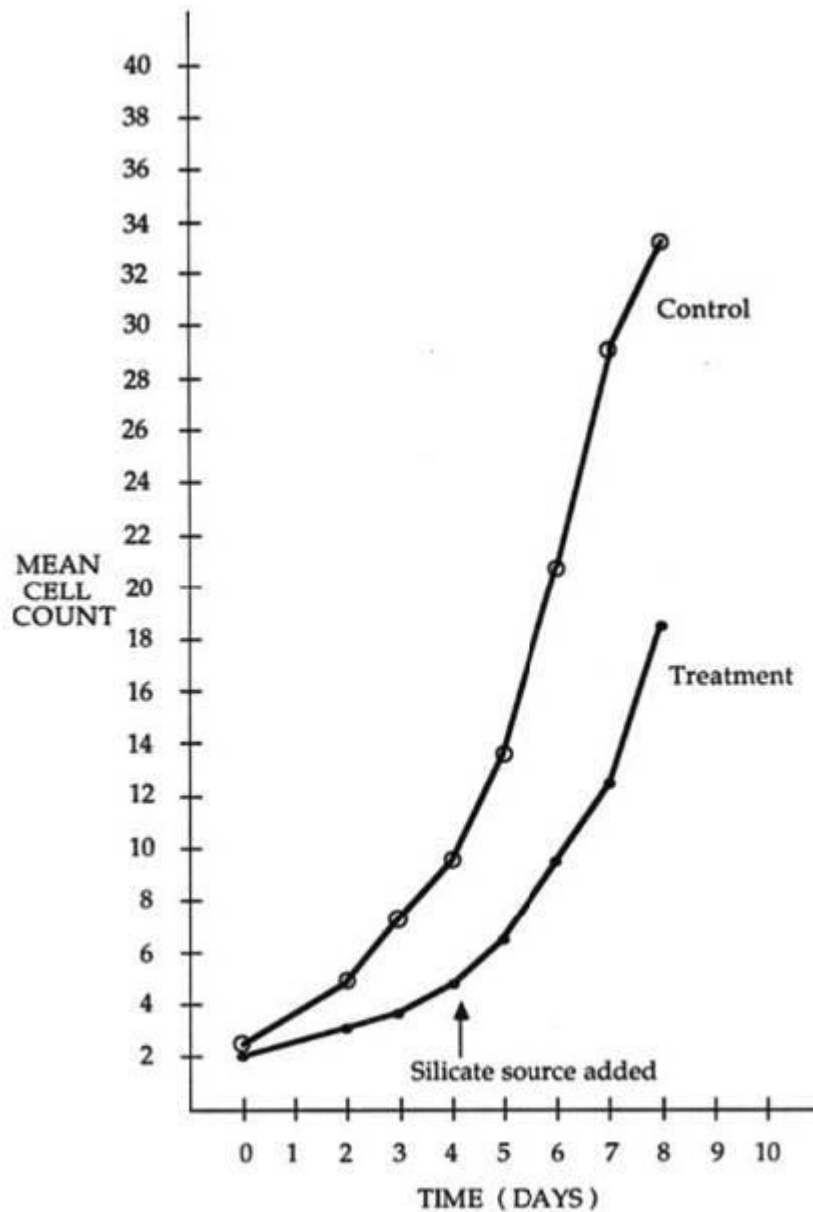


Fig.16 – Courbes de croissance de *Netzelia tuberculata* mises en culture (1) dans une solution pauvre en silice (courbe « Treatment ») et (2) dans une solution enrichie en grains de sables (courbe « Control ») (Anderson,1990). Après un apport de grains de sables dans la solution de culture « Treatment », la multiplication (i.e. la croissance) des individus atteint un taux comparable à celui du groupe « Control ».

3 BIO-INDICATION A L'AIDE DES AMIBES A THEQUES

« Les bio-indicateurs comprennent les processus biologiques, les espèces ou les communautés, et sont utilisés pour évaluer la qualité de l'environnement et comment il change au fil du temps. Les changements environnementaux sont parfois attribués à des bouleversements anthropiques (e.g. une pollution, un changement d'utilisation des terres) ou des contraintes naturelles (e.g. la sécheresse, les gelées printanières), bien que les facteurs de stress anthropiques forment le principal sujet de recherche de bio-indicateurs » (Holt & Miller, 2011).

Cette dernière partie est consacrée à l'utilisation des amibes à thèques, par le biais de l'analyse des communautés actuelles vivantes ou des micro-restes (i.e. thèques) d'anciennes communautés, pour évaluer la qualité des micro-habitats (actuels ou anciens) desquels ils sont extraits. Dans un premier temps, on fait l'inventaire des utilisations des thécamœbiens comme traducteurs d'environnements terrestres et dulçaquicoles actuels et passés, puis on détaille leur utilisation comme marqueurs de pressions d'origine anthropique.

3.1 UTILISATION DES COMMUNAUTES D'AMIBES A THEQUE EN TANT QUE BIO-INDICATEURS

3.1.1 Bio-indicateurs des environnements terrestres et dulçaquicoles

Un bon bio-indicateur doit être fréquent et coloniser une large palette d'environnements. D'une façon générale, les thécamœbiens traduisent les environnements terrestres et aquatiques d'eau douce. Ils prolifèrent essentiellement dans les zones humides (Bonnet, 1974) avec une quantité élevée de nutriments disponibles (sous la forme de matière organique, Wilkinson, 2001). Cependant, leur grande capacité d'adaptation aux conditions environnementales difficiles leur permet de coloniser les habitats les plus extrêmes tels que les milieux arctiques (Zapata et Matamala, 1987 ; Beyens et al., 1995) ou les déserts (Robinson et al., 2002 ; Fernandez et al., 2015). Cette résistance aux variations environnementales est en partie permise grâce aux processus symbiotiques que certaines espèces mettent en œuvre avec des algues microscopiques (e.g. *Chlorella vulgaris*), et qui leur permettent de pallier à un manque d'oxygène ou de nourriture (Chardez, 1967a). Dans des conditions encore plus extrêmes, des mécanismes d'enkystement permettent également

aux thécamœbiens de résister temporairement à un manque d'humidité, de nourriture ou d'oxygène (e.g. *Hyalosphenia papilio* dans Chardez 1965b).

C'est également leur capacité de dispersion qui permet d'expliquer leur colonisation de tous les environnements terrestres et dulçaquicoles de la planète. En effet, même si les pseudopodes ne permettent pas aux thécamœbiens de se déplacer rapidement (*Arcella gibbosa* se déplace 8 millions de fois moins vite qu'un cheval au galop selon Deflandre, 1929, qui exprime les vitesses de déplacement des thécamœbiens en μm par seconde), ils sont facilement transportés par le vent, la pluie, les oiseaux migrateurs, les poils ou plumes d'animaux ou les arthropodes (Chardez, 1967a, 1986 ; Finlay, 2002 ; Wilkinson et al., 2012 ; Wanner et al., 2015). Ces microorganismes qui prolifèrent en abondance peuvent se disperser à large échelle, à la faveur des forces naturelles, et se distribuer tout autour du globe dans des habitats favorables. C'est la base du principe énoncé par Bass Becking en 1934 : « Tout est partout, mais l'environnement sélectionne », qui avance le caractère cosmopolite de l'ensemble des micro-organismes (De Wit et Bouvier, 2006).

3.1.2 Bio-indicateurs des environnements passés

A la mort des thécamœbiens, la partie cellulaire se dégrade tandis que les thèques s'accumulent et se préservent (plus ou moins bien, cf 3.1.2.2) dans le sédiment. De ce fait, ce sont les thèques prélevées dans les sédiments qui servent d'indicateur d'un environnement propice au développement des thécamœbiens à l'époque du dépôt sédimentaire.

3.1.2.1 Enregistrement fossile des thèques d'amibes

Les plus vieux fossiles de thécamœbiens

Les plus vieux thécamœbiens fossiles trouvés à ce jour sont issus de nodules carbonatés dans des schistes noirs du groupe Chuar du Grand Canyon, datés de 742 Ma +/- 6 Ma (Porter et Knoll, 2000 ; Porter et al., 2003) (Fig.17). Ces premières traces Néoprotozoïques montrent déjà une diversité morphologique qui suggère qu'à cette époque les deux groupes Filose et Lobose étaient déjà différenciés, et évoluaient alors en milieu marin. D'autres fossiles ressemblants aux thécamœbiens ont également été découverts par Bosak et al. (2011) dans des carbonates de Namibie et Mongolie d'âge post-Sturtien (premier étage du Cryogénien : 850-650 Ma), cependant les fossiles en question sont très dégradés et, contrairement à Porter et al. (2003), leur affiliation aux thécamœbiens est difficilement confirmable. Farooqui et al., (2014) ont également décrit des thécamœbiens fossiles dans des sédiments continentaux du Permien, et Bassi et al., 2008 en ont identifié dans des sédiments oligohalins d'âge Jurassique.

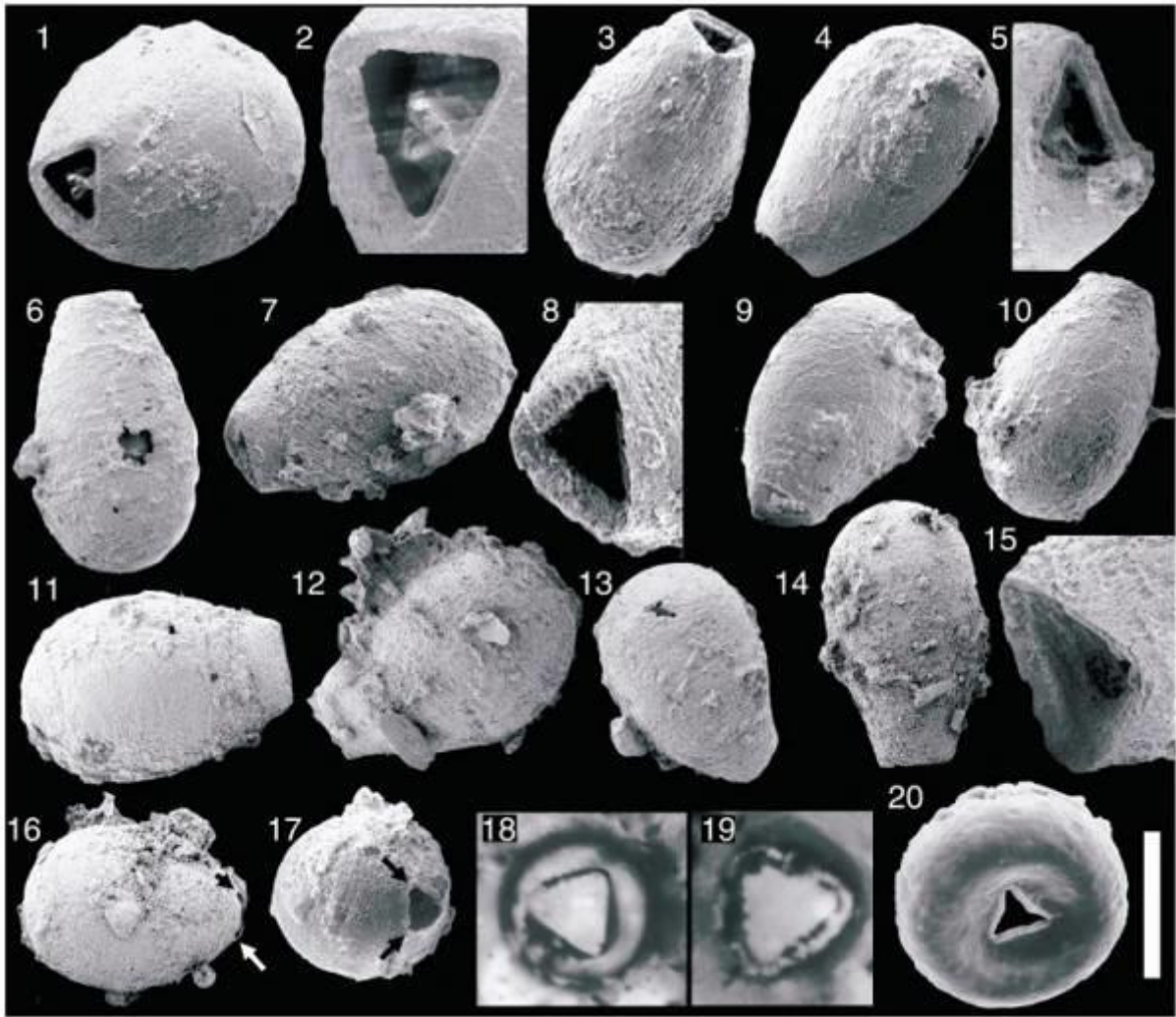


Fig.17 – Images en microscopie électronique de quelques spécimens de *Trigonocyrrillium horodyskii* découverts dans les nodules carbonatés néo-protérozoïques du Grand Canyon et présentés dans Porter et al. (2003). Les auteurs ont observé que la forme en triangle du pseudostome de ces individus (image n°8) rappelle celle d'un thécamœbien moderne, *Trigonopyxis arcula* (image n°20).

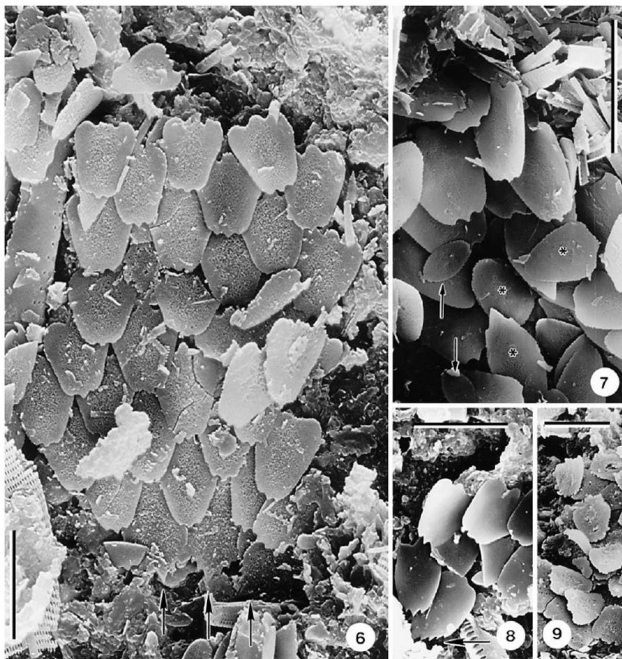
Les fossiles de thécamœbiens du Crétacé

Bien que rares, des enregistrements fossiles de thécamœbiens (e.g. genres *Centropyxis*, *Cyphoderia*, *Hyalosphenia*, *Phryganella*) ont été découverts dans des ambres du Crétacé à plusieurs reprises (Waggoner, 1996a-b ; Schönborn et al., 1999 ; Schmidt et al., 2004, 2006 ; Adl et al., 2011 ; Fig.18). Ils ont aussi été retrouvés dans des sédiments dans la formation Dakota (datée du Crétacé supérieur, Hengstum et al., 2007) mais également dans d'autres dépôts d'âge Crétacé inférieur de la plateforme néo-écossaise (Fiorini et al., 2008).

Les fossiles et subfossiles de thécamœbiens du Cénozoïque

Des thèques fossiles ont également été retrouvées dans des sédiments plus récents, datés de l'Eocène (Barber et al., 2013), du Miocène moyen (genre *Scutiglypha*, Foissner et Schiller, 2001, Fig.18), du Pliocène supérieur (genre *Trinema*, Bœuf et Gilbert, 1997), du Pléistocène (Müller et al., 2009) et de l'Holocène (Charman, 1999).

Restes (idiosomes) de
Scutiglypha crenulata dans des
sédiments d'âge Miocène



Nombreuses thèques de
Phryganella paradoxa piégées
dans de l'ambre d'âge
Cénomaniens (Crétacé)

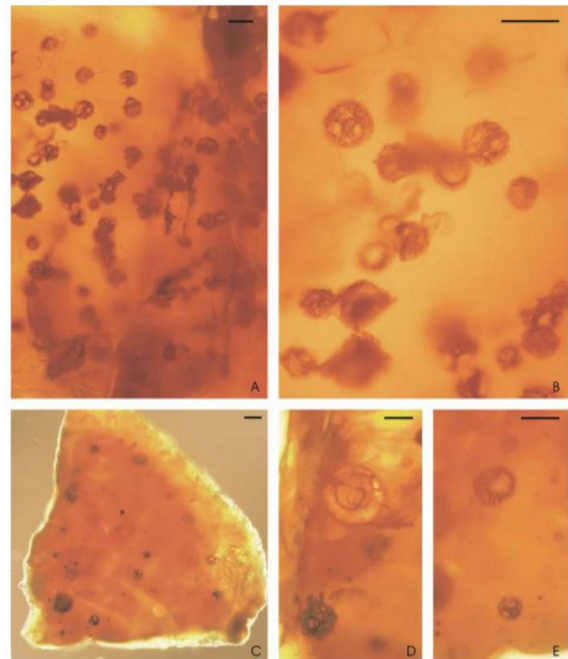


Fig.18 – Images MEB (à gauche) et en microscopie photonique (à droite) de traces fossiles de thécamœbiens. A gauche, des images extraites des travaux de Foissner et Schiller (2001), qui ont retrouvé des écailles siliceuses correspondant aux idiosomes de *Scutiglypha crenulata* dans des sédiments du Miocène. A droite, Schmidt et al. (2004) montrent de nombreuses thèques de *Phryganella paradoxa* piégées dans de l'ambre du Crétacé.

3.1.2.2 Conditions de préservation des thèques d'amibes

Les lacunes de l'enregistrement fossile des thèques soulèvent la question des paramètres qui agissent sur la préservation des thèques. Comme pour les fossiles d'autres organismes, ce sont les conditions physico-chimiques du milieu d'enregistrement (nature du sédiment, dynamique de dépôt, processus d'oxydo-réduction puis degré d'épigénisation) qui provoquent un bon/mauvais enregistrement fossile des thécamœbiens. Bien qu'on en retrouve facilement dans les sédiments du Quaternaire (Ellison et Ogden, 1987), il apparaît qu'ils sont plus rares dans les sédiments tertiaires (où l'on en trouve plus fréquemment piégés dans de l'ambre) ou plus anciens. Les rares traces de thécamœbiens fossiles dans les sédiments anciens ont conduit les scientifiques à tenter de mieux comprendre les processus de décomposition des thèques. Louisier et Parkinson (1981), Meisterfeld et Heisterbaum (1986) et Coûteaux (1992) ont successivement établi que l'oxygénation du milieu de dépôt entraîne une décomposition rapide des thèques. Louisier et Parkinson (1981) ont observé que 74 à 97% des thèques idiosomiques disparaissaient en une semaine contre 42 à 68% pour les thèques xénosomiques. A l'inverse, Coûteaux (1992) n'observe pas de décomposition significative des thèques sur une expérience de 5 semaines. Dans leurs études respectives, Swindles et Roe (2007) et Mitchell et al. (2008) mettent tout le monde d'accord en rappelant que la composition des thèques et les conditions environnementales sont les 2 paramètres majeurs à prendre en compte pour comprendre la capacité de préservation des thèques dans les sédiments. Certaines espèces xénosomiques, appartenant aux genres *Heleopera*, *Trigonopyxis* ou certaines *Diffflugia* (dont la forme ressemble beaucoup aux formes Néo-protérozoïques), sont beaucoup plus résistantes à la dissolution (et aux contraintes mécaniques) que les *Euglypha* (comme les formes écrasées retrouvées dans les sédiments miocènes) (Fig.19).

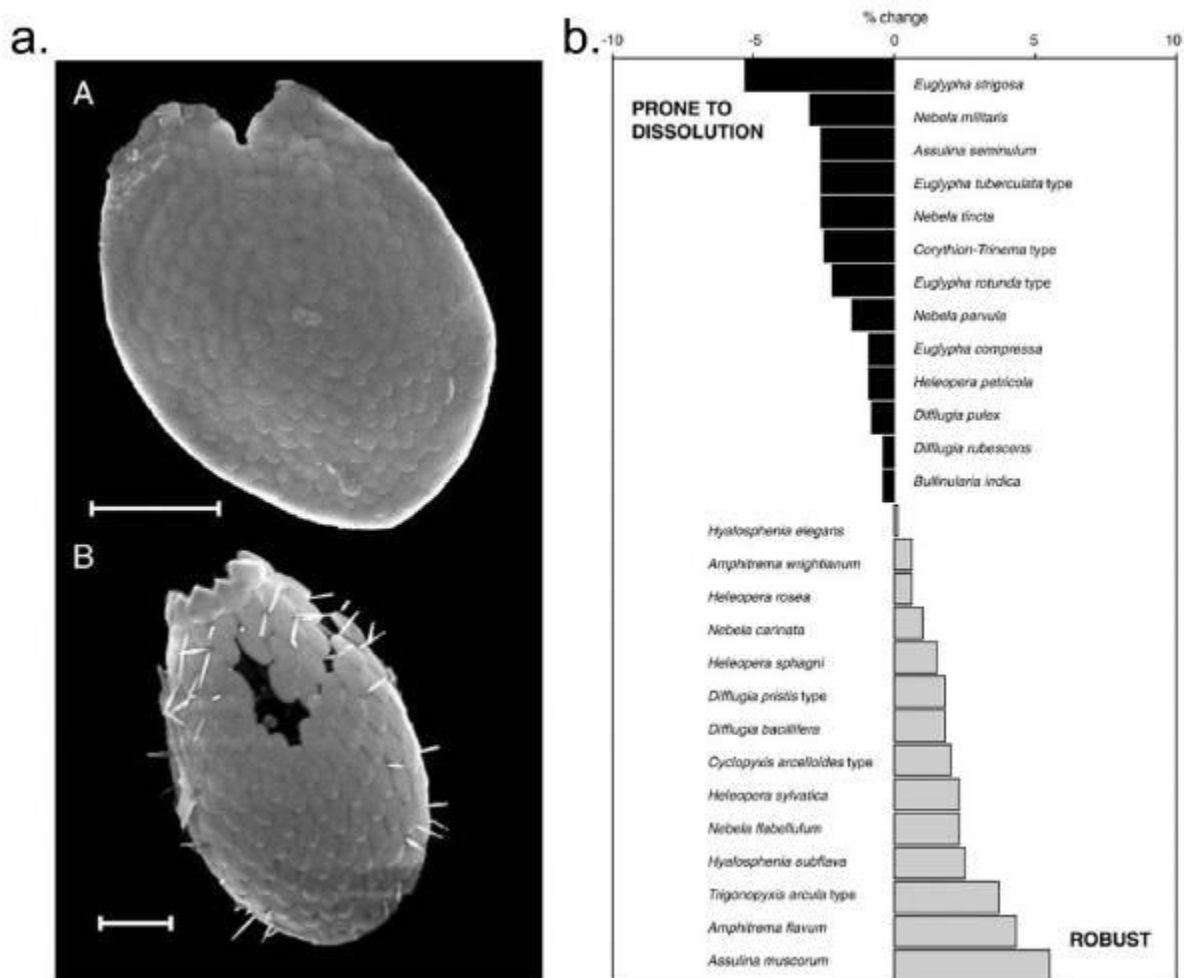


Fig.19 – a. Images en microscopie de *Assulina muscorum* (A) et *Euglypha strigosa* (B) montrant les conséquences d'une exposition de 2 jours à l'acide chlorhydrique sur les thèques idiosomiques de ces individus (Swindles et Roe, 2007). On notera que le pseudostome commence à se dissoudre chez *A. muscorum* alors que la liaison des écailles est fortement impactée chez *E. strigosa*. b. Graphique montrant la robustesse/la sensibilité à la dissolution de 27 espèces qui prolifèrent dans les milieux acides des tourbières (d'après Swindles et Roe, 2007).

3.1.2.3 Utilisation des amibes à thèques dans les reconstitutions paléo-environnementales

De nombreuses études paléo-environnementales ont pu utiliser efficacement les assemblages fossiles d'amibes à thèque comme proxy afin de reconstituer les conditions environnementales récentes, au cours du Quaternaire. Dans les tourbières, ils ont notamment permis de révéler les fluctuations climatiques anciennes ainsi que l'évolution hydrologique et végétale de ce milieu (Beyens et Chardez, 1987 ; Booth, 2002 ; Booth et al., 2006). Les assemblages de thécamœbiens successifs sont analysés et compilés pour alimenter des fonctions de transfert qui vont traduire l'évolution du niveau de la nappe ou de

l'humidité de surface au fil du temps (Warner et Charman, 1994 ; Charman et Warner, 1997 ; Payne et al., 2006 ; Elliott et al., 2012 ; Swindles et al., 2015, 2016). Les assemblages de thécamœbiens ont également été utilisés pour reconstituer les variations de l'acidité (pH) des tourbières par Mitchell et al. (2013).

En milieu lacustre, des études ont montré que les assemblages de thécamœbiens pouvaient traduire le niveau trophique des lacs et aider à reconstruire des paléoclimats (Asioli et al., 1996 ; Burbidge et Shröder-Adams, 1998 ; Dallimore et al., 2000 ; Beyens et Meisterfeld, 2001 ; Wall et al., 2010). Lloyd (2000) a combiné l'utilisation des foraminifères et thécamœbiens pour retracer l'évolution de l'ouverture d'un bassin isolé écossais. Dans des milieux plus dynamiques tels que les estuaires, ils sont utilisés pour marquer la limite d'influence de l'eau salée, en continuité avec les foraminifères benthiques (Scott et al., 1991, 2001 ; Vazquez Riveiros et al., 2007). Gehrels et al. (2001) fixent à 7 jours/an le seuil maximal de tolérance permettant la prolifération d'amibes à thèques dans les marais salants. Au-delà, l'assemblage de protistes observé est constitué majoritairement de foraminifères benthiques agglutinants supratidaux (e.g. genres *Jadammina* ou *Trochammina*). Camacho et al. (2015) ont montré que les thécamœbiens et les tintinnides, en raison des variations de leur distribution et prolifération saisonnière, peuvent être des bio-indicateurs de l'évolution de la configuration des marges intertidales. Ooms et al. (2011) les utilisent comme indicateurs du niveau d'eau estuarien. Enfin, les thécamœbiens sont fréquemment associés aux diatomées et aux foraminifères pour alimenter les fonctions de transfert permettant les reconstructions de paléo-niveaux marins (Gehrels et al., 2001 ; Roe et al., 2002 ; Charman et al., 2010) ou révéler l'évolution hydrodynamique d'estuaires (Duleba et Debenay, 2003 ; Eichler et al., 2006).

Actuellement, leur champ d'étude s'élargit aux environnements particuliers tels que les permafrosts, dans lesquels les assemblages de thécamœbiens sont utilisés comme bio-indicateurs des changements climatiques (Bobrov et al., 2004 ; Müller et al., 2009) ou de variations hydrologiques (Swindles et al., 2015) lors du Pléistocène et de l'Holocène.

3.1.3 Bio-indicateurs des environnements sous influence anthropique

Dans un milieu naturel sans contraintes anthropiques, les amibes à thèque ont un cycle de vie court et s'adaptent rapidement aux changements environnementaux (Costan et Planas, 1986 ; Gilbert et al., 1998a). Certains facteurs naturels comme la température, le pH, l'humidité ou les nutriments disponibles influencent directement la structure des communautés d'amibes à thèque (Heal, 1961, 1962, 1964 ; Mitchell et al., 2000 ; Mitchell et Gilbert, 2004 ; Opravilova et Hajek, 2006 ; Booth et al., 2008). D'autres facteurs tels que l'altitude ou la végétation exercent également une grande influence sur les assemblages (Jassey et al., 2011a ; Tsyganov et al., 2011, 2012, Lamentowicz et al., 2013). Cependant, ils sont aussi sensibles aux conséquences des activités anthropiques sur la qualité des écosystèmes.

On sait aujourd'hui que leur abondance et leur diversité sont affectées par l'apport de polluants d'origine atmosphérique. Ceci a été démontré par Nguyen-Viet et al. (2004, 2005), qui ont observé qu'une pollution au plomb perturbait fortement la communauté de thécamœbiens des sphaignes. Un apport de polluants sous forme particulaire ou de dioxyde d'azote NO₂ ont également des conséquences néfastes sur le développement et la diversité des amibes à thèque selon Meyer et al (2010, 2012).

On sait aussi que les pratiques agricoles modulent le développement des communautés de thécamœbiens endogènes. Foissner (1997) a observé que les biocides (pesticides, insecticides, herbicides) provoquent une réduction drastique de l'activité des communautés d'amibes à thèque. Ceci a également été constaté en 2012 par Heger et al. qui ont observé que l'abondance des thécamœbiens était 5 fois supérieure dans les systèmes agricoles biodynamiques par rapport aux systèmes conventionnels.

Dans les lacs, les communautés de thécamœbiens sont également conditionnées par les apports d'eaux chargées en phosphore issu des activités agricoles et plus particulièrement de l'usage de fertilisants chimiques (Patterson et al., 2012). Les apports de métaux lourds (e.g. arsenic, mercure, cobalt) diminuent également leur abondance et leur diversité (Patterson et al., 1996 ; Reinhardt et al., 1998).

Dans les tourbières, Kajukalo et al. (2016) ont étudié l'évolution des traits morphologiques d'assemblages de thécamœbiens au fil du temps. Cette évolution est modulée par les bouleversements écologiques consécutifs à des modifications du milieu suite aux activités humaines (e.g. déforestation, incendies). Ces actes entraînent alors une élévation de la hauteur de nappe et des apports particuliers accrus, qui à leur tour provoquent des variations des populations de thécamœbiens.

D'un point de vue plus anecdotique, des études ont montré que les communautés changent rapidement en présence de cadavres et peuvent donc s'avérer utiles pour estimer l'intervalle de temps post-mortem de cadavres en décomposition (Lambert et Chardez, 1978 ; Szelez et al., 2014). Cette technique d'estimation pourrait venir en complément des méthodes entomologiques en médecine légale, qui perdent de leur efficacité au-delà de 4 à 6 semaines de décomposition.

3.2 POTENTIEL DE BIO-INDICATION DES THÈQUES D'AMIBES XÉNOSOMIQUES

Dans les précédents paragraphes, on a vu que les amibes xénosomiques avaient la faculté de construire leur thèque en recyclant les particules minérales, organiques, éventuellement d'origine biologique, en les prélevant dans leur environnement immédiat. De plus, les thèques à xénosomes se préservent mieux que les autres types de thèques, car elles sont plus résistantes à la dissolution et aux contraintes mécaniques (Swindles et Roe., 2007 ; Mitchell et al., 2008). En ce sens, elles constituent un outil de bio-indication potentiel plus attrayant que les autres types de thèques d'amibes.

Lorsque cette thèse a débuté, aucune étude in-situ n'avait encore été entreprise pour rechercher le potentiel de bio-indication des thèques d'amibes. Depuis, et en dehors des articles publiés dans le cadre de cette thèse (en 1^{er} auteur ou en co-auteur), seule une publication (Fiałkiewicz-Kozieł et al., 2015) a montré que certaines espèces d'amibes xénosomiques étaient capables d'utiliser des particules polluantes atmosphériques issues de la combustion du charbon. Les chapitres suivants confirmeront que les amibes xénosomiques, sous l'influence d'apports particuliers atmosphériques particuliers, peuvent être utilisées comme bio-indicateurs.

Cependant, évaluer et utiliser pleinement le rôle de bio-indicateur des thèques d'amibes suppose (1) une bonne connaissance de la diversité des éléments utilisés pour la construction des thèques, et (2) de mieux connaître la capacité de sélection de ces éléments par les amibes xénosomiques. Or, très peu d'études ont été entreprises dans ce sens.

Parmi ces rares études en milieu naturel, on peut citer celles d'Armynot du Châtelet et al. (2010, 2013), qui comparent la composition des thèques avec leur milieu d'extraction (le sédiment). En 2010, Armynot du Châtelet et al. montrent que la taille des particules disponibles dans l'environnement est un facteur limitant pour la construction des thèques. En 2013, Armynot du Châtelet et al. poursuivent ce champ d'étude et effectuent des analyses microtomographiques sur des *Diffugia oblonga* prélevés *in-situ*. Ils en concluent que la taille maximale des grains utilisés par cette espèce est limitée par la taille du pseudostome (Fig.20).

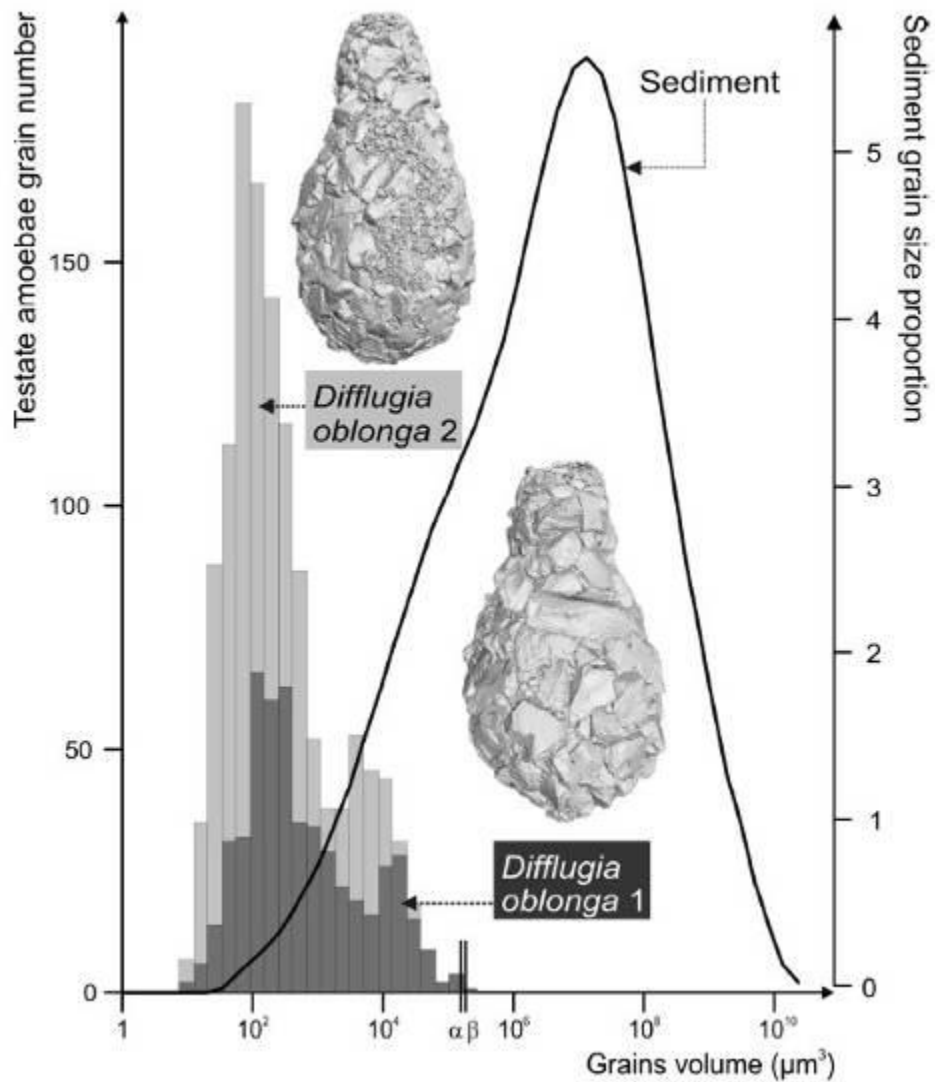
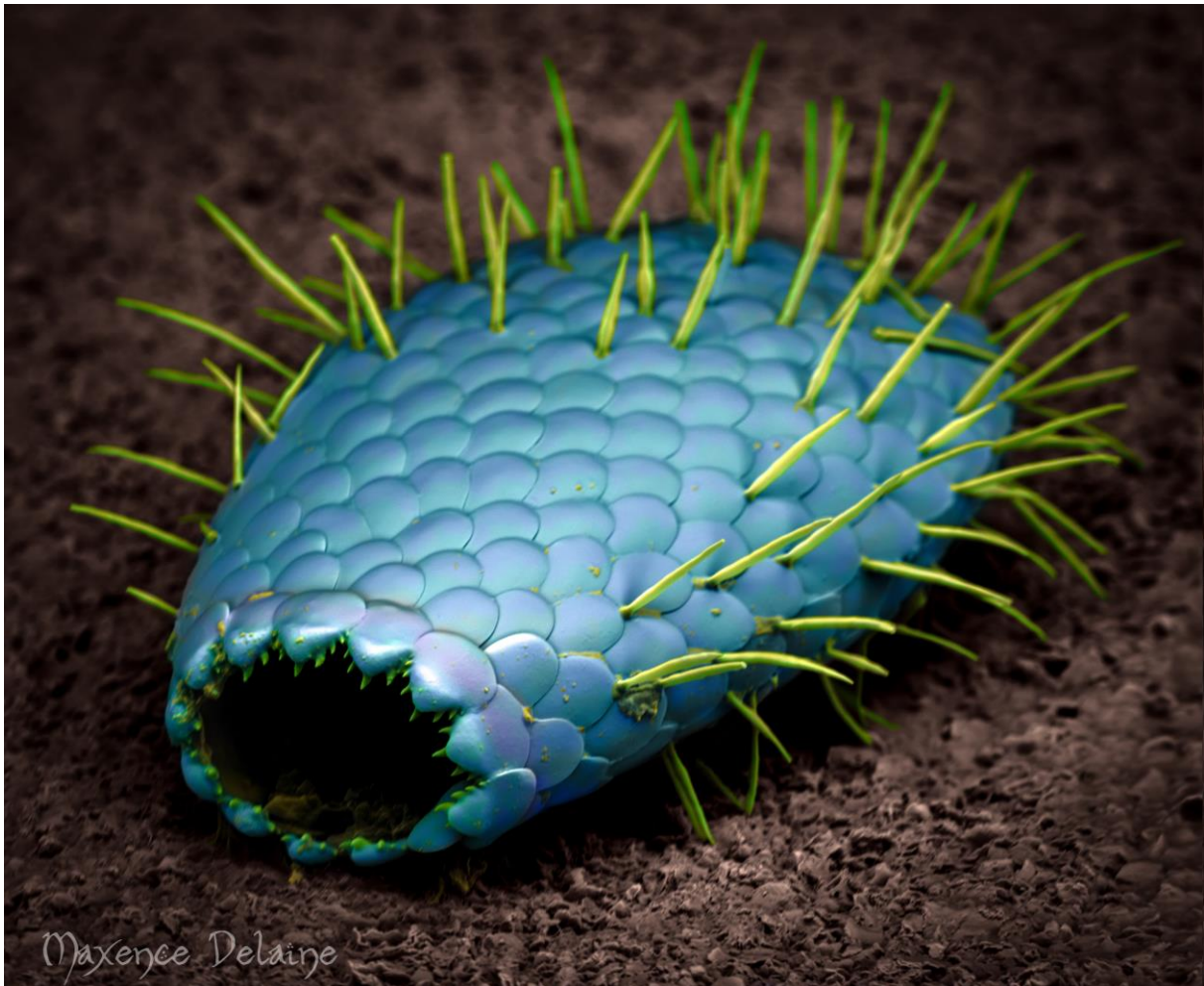


Fig.20 – Distribution granulométrique des grains contenus dans les thèques de 2 individus de *Diffflugia oblonga* (Armynot du Châtelet et al., 2013). La distribution est bi-modale et significativement différente de celle du sédiment, plus grossière et uni-modale. Une sélection des particules en fonction de leur taille est donc effectuée par cette espèce. La taille maximale des particules n'excède pas le diamètre du pseudostome, marqué par la limite notée « αβ ». La taille du pseudostome est donc un facteur limitant dans la construction des thèques.

Chapitre 2 - Solutions analytiques et visuelles développées dans le cadre de l'étude des thèques d'amibes à l'aide de la microscopie électronique à balayage avec spectroscopie élémentaire



1 PRÉAMBULE

L'étude de la composition des thèques d'amibes requiert un outil analytique permettant (1) la visualisation des thèques avec un fort grossissement, et (2) la détermination de la nature des objets visualisés, si possible de manière non invasive. La microscopie électronique à balayage (MEB), couplée à un détecteur EDS (Energy Dispersive Spectrometry), répond parfaitement à ces besoins. En effet, le matériel utilisé dans le cadre des études de cette thèse (FEI Quanta 200) permet l'acquisition d'images d'objets microscopiques de tailles supérieures à 1 μ m. Pour ce grossissement maximal, la netteté de l'image obtenue va dépendre des techniques de préparation (qualité de la fixation de l'objet sur le support et nature de la métallisation), du temps de balayage, de l'intensité et de la finesse du faisceau d'électrons mais également de la nature de l'objet visualisé.

Des images sont alors obtenues à partir du retour simultané de 2 séries d'électrons :

- Des électrons secondaires (SEC) : par leur faible pénétration dans l'objet, ces images vont permettre une visualisation optimale de la surface de l'objet,
- Des électrons rétrodiffusés (BSE) : ces électrons vont interagir un peu plus profondément avec la matière et renseigner sur le « contraste atomique ». Les éléments lourds (e.g. Fe, Ti) vont renvoyer plus d'électrons rétrodiffusés ce qui va entraîner l'apparition de zones plus claires sur l'image obtenue.

Le bombardement d'électrons sur l'objet analysé va également provoquer l'émission de photons X caractéristiques des éléments constituant cet objet. Ces photons X renvoyés vont alors être détectés par la sonde EDS, et permettre l'obtention d'un spectre. Ce dernier, véritable carte d'identité de l'objet analysé, est composé de pics d'intensités variables correspondant aux longueurs d'ondes des photons détectés. Les longueurs d'ondes sont elles-mêmes caractéristiques des différents éléments atomiques. Une fois quantifié, le spectre obtenu donne la composition élémentaire de l'objet, avec les proportions de chaque élément détecté. Les outils logiciels accompagnant le MEB sont capables de créer des cartographies élémentaires, qui vont permettre la visualisation des variations élémentaires de l'objet.

Cette technique a également l'avantage d'être non invasive sur la plupart des thèques d'amibes ; seules les thèques très fines et/ou très organiques supportent mal le vide effectué dans la chambre d'analyse et subissent un affaissement. Le temps d'analyse peut être optimisé par une bonne préparation en amont (placement des objets à analyser sur le support, cartes de la disposition des objets, choix anticipé de la métallisation).

Le présent chapitre est subdivisé en deux parties. La première comprend une version préparatoire d'article décrivant les possibilités qu'offre cette technique pour l'étude des thèques d'amibes. Un arbre décisionnel est notamment développé, afin de répondre au mieux aux besoins du lecteur intéressé par la technique. Le détail des méthodes employées pour préparer et obtenir un maximum d'informations sur les thèques d'amibes (morphologie, composition) à l'aide de cette technique est indiqué. La diffusion et l'attractivité des résultats d'analyses basés sur des techniques d'imagerie sont réalisés en partie de façon visuelle. En conséquence, la description de quelques méthodes améliorant les qualités informatives et esthétiques des images brutes, par le biais de traitements spécifiques, en fait également partie. La deuxième partie de ce chapitre présente des exemples de résultats obtenus à l'aide de cette technique pour illustrer les différents thèmes abordés lors du Chapitre 1 sur la variabilité de composition des thèques d'amibes et leur classement.

2 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY WITH EDS APPLIED TO THE STUDY OF TESTATE AMOEBAE SHELLS

Scanning Electron Microscopy with EDS applied to the study of testate amoebae shells

Maxence Delaine^{a,b*}, Nadine Bernard^{a,c}, Philippe Recourt^b, Eric Armynot du Châtelet^b

^aLaboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

^bUniversité de Lille, UMR LOG 8187 CNRS, ULCO Laboratoire d'Océanologie et Géosciences, Bâtiment SN5, 59655 Villeneuve-d'Ascq, France

^cLaboratoire THÉMA, UMR 6049, CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, 32 rue Mégevand, 25030 Besançon Cedex, France

*Corresponding author, email adress : maxence.delaine@gmx.fr

Keywords: SEM, methods, testate amoebae, shell composition, imaging

2.1 INTRODUCTION

Testate amoebae are a species-rich and polyphyletic group of heterotrophic and mixotrophic microorganisms that belong to two lineages, the Amoebozoa group (containing lobose testate amoebae) and the SAR supergroup (containing filose testate amoebae) (Adl et al., 2012). Such microorganisms proliferate in almost all freshwater and terrestrial biomes of the planet, including extreme environments such as deserts (Robinson et al., 2002; Fernández, 2015), tundra (Mazei & Chernyshov, 2011; Bobrov & al, 2012), arctic freshwater (Beyens et al., 1995; Zapata & Matamala, 1987). They are more abundant and diverse in warm and humid biomes such as tropical and temperate rainforests (Krashevaska et al., 2007; Bamforth, 2010; Fernández et al., 2016). They represent one of the major group of eukaryotic microorganisms in peatlands, which induced multiple studies about their diversity and ecology in these habitats (Bobrov et al., 2002; Qin et al., 2012; Marcisz et al., 2014).

Testate amoebae are known to be sensitive to environmental factors such as pH, climate, hydrology, or nutrient availability (Mitchell and Gilbert, 2004, Opravilova and Hajek, 2006, Jasey et al., 2012), but also to anthropogenic impacts such as lead, copper or mercury pollution (Nguyen-Viet et al., 2008), nitrogen deposition (Gilbert et al., 1998a), atmospheric or phenanthrene pollution (Meyer et al., 2012, 2013). Consequently, testate amoebae communities are more and more used as proxy to evaluate or monitor the quality of the environment.

Testate amoebae are also of interest for paleoenvironmental studies, owing to their ability to create a proteinaceous or agglutinated shell (or test), which surrounds and protects their single-cell bodies. Their shells remain intact in peats and sediments for long periods of time after the death of the organism and can be identified at species level in most cases (Beyens & Meisterfeld, 2001). Indeed, fossils of these microorganisms are abundant in Holocene peats and sediments (Charman, 2001; Swindles et al., 2010; Wall et al., 2010) and are even found in rocks as old as the Neoproterozoic (~750Ma) (Porter & Knoll, 2000; Porter et al., 2003). As a consequence, studies used fossils of testate amoebae to reconstruct ancient sea-levels (Gehrels et al., 2011), estuarine water levels (Ooms et al.,2011) and of isolated basins (Lloyd, 2000), but also in paleo-hydrological studies in peatlands (Elliott et al., 2012F). Again, they have been used as bio-indicators in estuarine sediment infilling reconstructions (Delaine et al., 2014) and to monitor environmental and climate changes in lakes (Wall et al., 2010).

Electron microscopy and spectrometry tools were then used to obtain more detailed description of shells and their content (Moraczewski, 1971; Saucin-Meulenberg et al., 1973; Stout & Walker, 1976; Ogden & Hedley, 1980; Von Karl Rauenbusch, 1987; Ogden, 1988).

Recently, development of analytic tools and increasing of analytic accuracy induced reinvestigation of the characterization of testate amoebae shells. Armynot et al. (2010, 2013, 2015) used environmental scanning electron microscopy (ESEM) coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) to characterize the mineral and grain-size content of lacustrine and peatland testate amoebae. Delaine et al. (2016a) used the same technique, with image processing on EDS composite pictures, to know if testate amoebae shells could be indicators of cryptotephra.

Much remains to be done on understanding testate amoebae shell composition and construction, and their potential use to monitor recent and past environments. The main objective of this paper is to detail how pictures obtained thanks to SEM-EDS method could be treated so as to visualize and characterize shells of testate amoebae. By doing this, our objective is to summarize the imaging technique and lay the methodological groundwork of future studies on testate amoebae shells (or other compatible microfossils such as foraminifera or diatoms) using ESEM-EDS analytic method. Because dissemination and attractiveness of results emerging from imaging techniques are made in a visual way, the description of few methods improving informative and aesthetic qualities of raw pictures is detailed. Along this work in application with testate amoebae, it will be demonstrated how ESEM-EDS technique can be employed to obtain details on (1) the surface of the shells, (2) their mineral and organic content, (3) the chemical nature of this content and (4) the 3D aspect of shells. Finally, a last point will introduce how some shells components can be highlighted thanks to (5) false-colorization process, in order to better illustrate specific details.

2.2 MATERIAL

Testate amoebae shells used within the framework for this work are extracted from *Sphagnum capillifolium* of the Frambouhans-Les Ecorces peatland (Jura Mountains, France, WGS84 coordinates: 47°10'44.66" N, 6°47'23.87" E, Delaine et al., 2016 (in revision)), litter and soil sampled in Puyehue National Park (Chile, WGS84 coordinates: 40°39'42.7" S, 072°9'52.7" W, Delaine et al., 2016) and sediment from Clairmarais pond (France, WGS84 coordinates: 50°46'0.09" N, 2°17'57.71" E).

The identification of the species was based on morphological features of the shell following Ogden and Hedley (1980), Clarke (2003) and Mazei and Tsyganov (2006).

Testate amoebae shells were imaged with an Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) FEI Quanta 200 equipped with an Energy Dispersive X-ray Spectrometer (EDS) Xflash 3001. Similar imaging could be done with a standard SEM, since the "Environmental" functionality of this material was not operated. Pictures were taken using both secondary

(low-energy) electrons (SEC) and back-scattered (high-energy) electrons (BSE) modes. EDS mappings were obtained thanks to Bruker Esprit Imaging v1.8 software.

In this work, the photo editing software Adobe Photoshop Lightroom 5 was used to settle pictures parameters (e.g. exposure, contrast, shadows...) and improve the quality of raw SEM images (SEC and BSE). Creation of 3D anaglyphs, optimization of EDS mappings and false-colorization has been realized with the software Adobe Photoshop CC. Most of the picture edition parameters developed in this document are basic and are available on many photo editing software.

Methods related to samples preparation, analyses, image processing and all their associated figures are summarized in the Table 1.

Table 1: Inventory of preparation and methodological tests developed in this work

SAMPLE PREPARATION		Figures #
Support	Aluminium stub	Figure 2
	Aluminium stub + glass slide	
Aluminium stub + double-sided carbon adhesive		
Aluminium stub + carbon disc		
Coating	Without coating	
	Carbon coating	
	Au/Pd coating	
ANALYSES and IMAGE PROCESSING		
2D imaging	SEC electrons	Figure 3
	BSE electrons	
Chemistry	EDS mappings and composites	Figure 4
	EDS point-chemical analyses	
3D imaging	3D anaglyphs	Figure 5
False-colorization	Step by step method	Figure 6
	Composite method	

MEB-EDS could be used in several ways depending on the objective of the study (Fig.1) based on Imaging, Chemistry or Image processing.

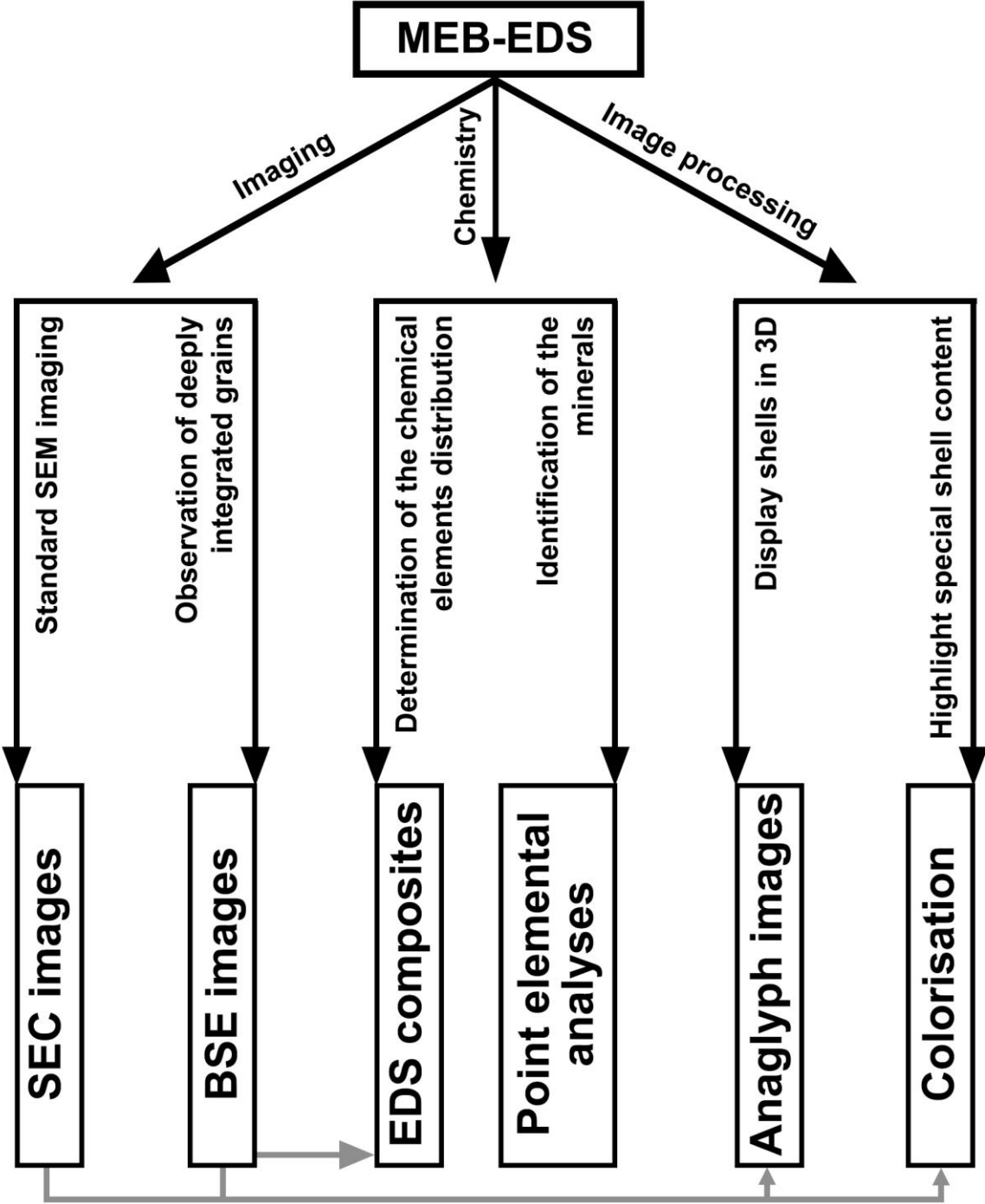


Fig.1 – Decision tree with the different uses of MEB-EDS

2.3 HOW TO PREPARE TESTATE AMOEBAE SHELLS FOR SEM IMAGING?

2.3.1 Overview

Shells were picked and isolated under a stereomicroscope Olympus SZX16 at 115x, thanks to a very fine paintbrush (Golemansky and Ogden, 1980). Depending on the size of the shell to isolate, size of the used paintbrush varies between sizes 6/0 and 0. According to the composition of the sample containing shells, it is sometimes necessary to use a glass micropipette to pre-extract shells from the analysed sample (Ogden, 1983).

Then, extracted shells were positioned and stuck (when needed) with water-soluble glue on aluminium SEM stubs prepared under several configurations: (1) directly on the aluminium stub, (2) on a double-sided carbon adhesive tape (variant adhesive method in Lahr and Lopes, 2006), (3) on a glass slide pasted to the stub (Ogden and Hedley, 1980) and (4) on a carbon disc pasted to the stub (Delaine et al., 2016, Fig.2). Later, shells were directly examined without coating or after coating in two possible ways: either with carbon (Ogden, 1984) or with gold/palladium (Ogden, 1983).

2.3.2 Selection of the support

Many possibilities are available to prepare and optimize SEM pictures acquisition. In this work, we evaluate 4 mounting methods for the shell support preparation and 2 types of coating (Fig.2). Rating of each mount is based on 5 criteria for the type of support: (1) ease of preparation (Pp), (2) quality of the surface (Sf), (3) chemistry impact on BSE/EDS (Ch), (4) ease of shell fixing (Fx) and (5) ease of shell repositioning (Ps). Coating was rated given its usefulness to improve the signal for shell details or EDS chemistry.

Quicker method is to deposit and stick shells with glue directly on the aluminium stub. However, the micro-serrated surface is not optimal for fixing or repositioning the shell. Aluminium nature of the stub is also an important source of disturbance for chemical analyses. Best mount for SEC imaging is the glass slide one. It provides a smooth and clean surface which improves the quality of the image background and helps for cropping process for plate creation. Nonetheless, the silica composing glass, as for aluminium, decrease the accuracy of shell chemical analyses. Fixing and orientation of shells on this kind of support is sometimes complex because of the slippery side of this surface. Double-sided carbon adhesive is appropriate for fast and accurate chemical analyses. The adhesive allows a strong fixing of shells. This method is not perfect because long exposing to the electron beam triggers heating of the adhesive and displacement of the shell. Additionally, using this surface is not recommended for flat shells, and shell repositioning is impossible without shell deterioration. Finally, the best multi-purpose mount is the carbon disc support type. It allows

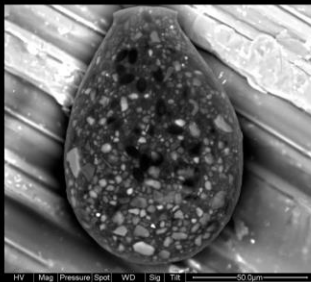
pictures with quite clean background and accurate chemical analyses. The microporous surface facilitates sticking and (re)positioning of shells.

2.3.3 Selection of the coating

Our tests show that carbon coating is recommended for BSE pictures and chemical EDS analyses (Fig.2). Indeed, it increases quality of the BSE and EDS signals. On the contrary, Au-Pd coating is the best for SEC imaging because it increasing the quality of the secondary electrons signal. However, Au-Pd coating eliminates the possibility of BSE imaging and EDS analyses.

Support

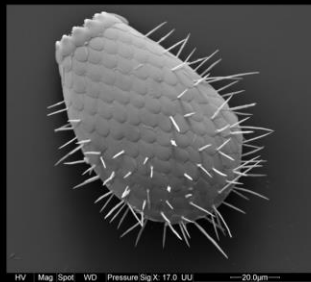
Aluminium stub
only



(e.g. BSE + C coating)

Pp ●●●●●
Sf ●○○○○
Ch ●○○○○
Fx ●●○○○
Ps ●●○○○

Aluminium stub
+ glass slide



(e.g. SEC + Au-Pd coating)

Pp ●●●○○
Sf ●●●●●
Ch ●○○○○
Fx ●●○○○
Ps ●●●○○

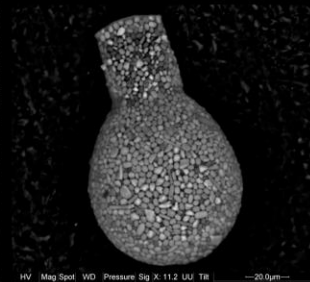
Aluminium stub
+ double-sided
carbon adhesive



(e.g. SEC + Au-Pd coating)

Pp ●●●○○
Sf ●●○○○
Ch ●●●○○
Fx ●●○○○
Ps ●○○○○

Aluminium stub
+ carbon disc



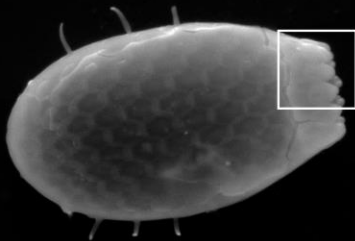
(e.g. BSE + C coating)

Pp ●●●○○
Sf ●●●○○
Ch ●●●●●
Fx ●●●○○
Ps ●●●○○

Coating

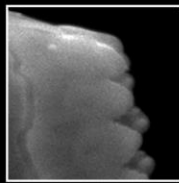
No coating

(SEC, glass slide)



HV | Mag | Pressure | Spot | WD | Sig | Tilt | 20.0µm
20.0 kV | 1471x | -- | 4.2 | 10.5 mm | SE | 0.4

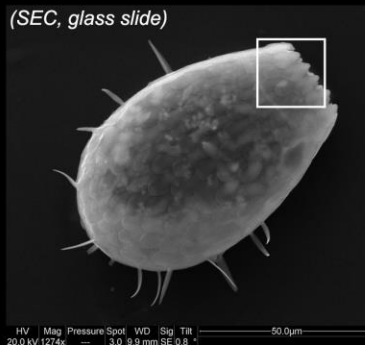
Zoom
20µm x 20µm



Details ●○○○○
Chemistry ●●●○○

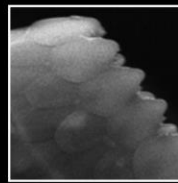
Carbon coating

(SEC, glass slide)



HV | Mag | Pressure | Spot | WD | Sig | Tilt | 50.0µm
20.0 kV | 1274x | -- | 3.0 | 9.9 mm | SE | 0.8

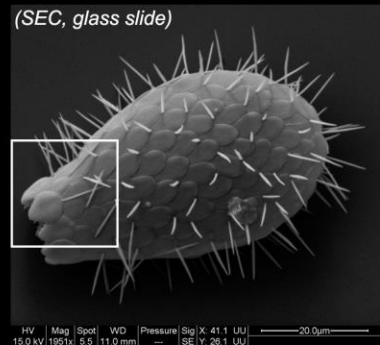
Zoom
20µm x 20µm



Details ●●●○○
Chemistry ●●●●●

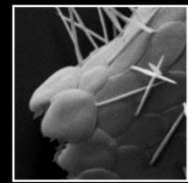
Au-Pd coating

(SEC, glass slide)



HV | Mag | Spot | WD | Pressure | Sig | X | 20.0µm
15.0 kV | 1951x | 5.5 | 11.0 mm | -- | SE | Y | 26.1 UU

Zoom
20µm x 20µm



Details ●●●●●
Chemistry ○○○○○

Best for SEC imaging: glass slide mount + Au-Pd coating
Best for BSE and EDS imaging: carbon disc mount + carbon coating

Fig.2 – Evaluation of the multiple supports on which shells are placed for SEM-EDS analysis (*Pp*: ease of preparation, *Sf*: quality of the surface, *Ch*: chemistry impact on BSE/EDS, *Fx*: ease of shell fixing and *Ps*: ease of shell repositioning) and evaluation of the coating methods.

2.4 HOW TO OBSERVE THE SHELL SURFACE AND SUB-SURFACE?

2.4.1 Characterization of the shell surface with SEC electrons

Secondary electrons signal (SEC) is the most common imaging mode and facilitates the documentation and morphological identification of the species. SEC brings to creation of detailed images which gives information on the shell surface (Fig.3). This method has been used for years for shell morphological characterization (Ogden and Hedley, 1980; Ogden, 1983), because it allows observation of global shape or surface aspect (e.g. roughness, or softness) as well as fine shell details such as pores or ornaments.

2.4.2 Characterization of deeply integrated grains with BSE electrons

Back-scattered electrons signal (BSE) is especially suited to localize areas with high heavy elements content because of their stronger reflectivity in their shell. Then, BSE allows scanning the deep content of shells (e.g. xenosomes, idiosomes) (Fig.3). This method has been successfully used to detect and localize mineral grains in testate amoebae shells from peatlands (Armynot du Châtelet et al., 2015) and from lakes (Armynot du Châtelet et al., 2010), but is also efficient and already used for other microfossils (Lepot et al, 2011; Armynot et al., 2013c, Mancin et al., 2015). This imaging method is of a major interest to complete the knowledge of shells composition.

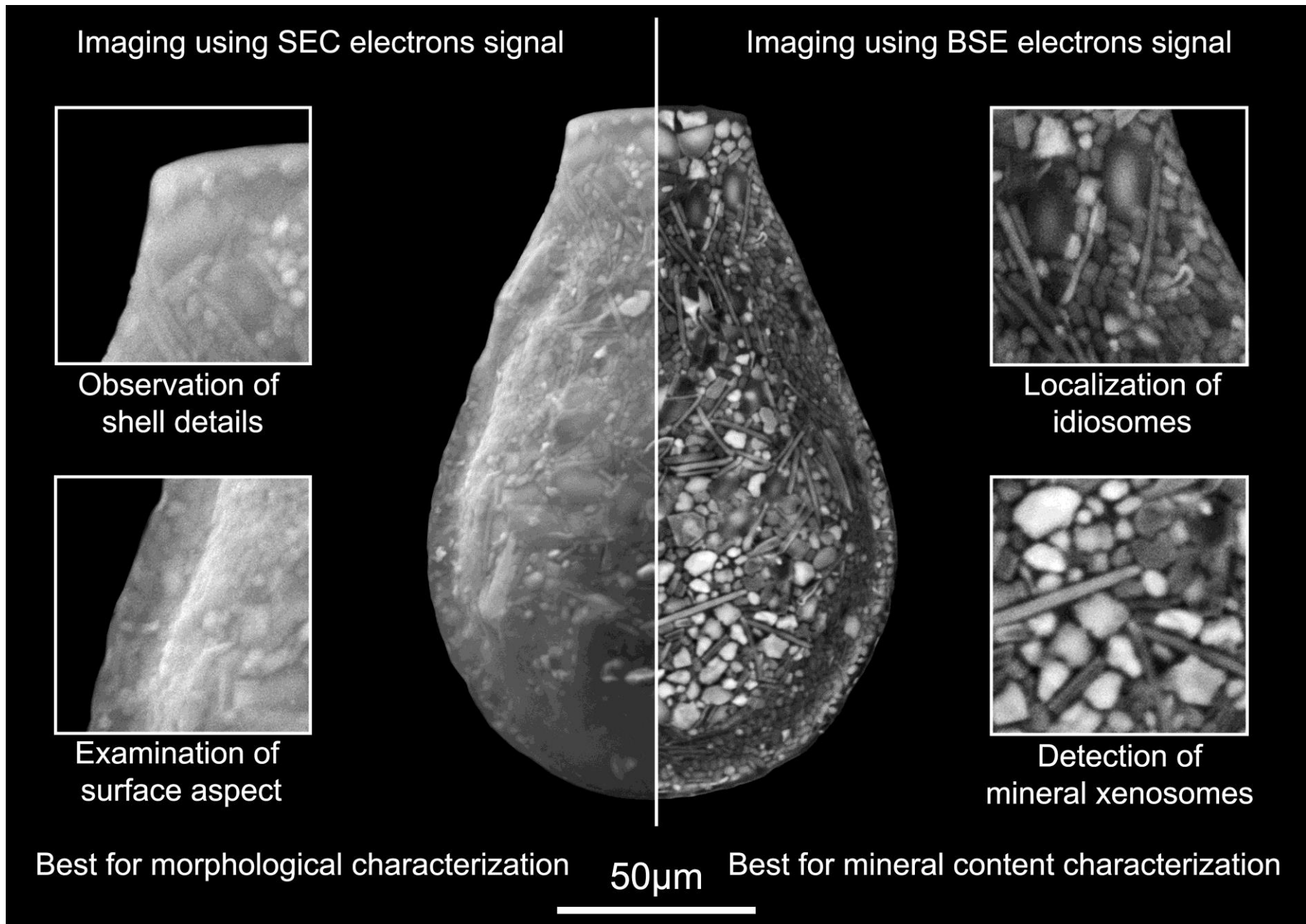


Fig.3 – Comparison between images obtained thanks to SEC and BSE electrons signal and their respective applications

2.5 HOW TO DETERMINE THE ELEMENTAL CHEMISTRY OF SHELL GRAINS?

2.5.1 Detection and distribution of atomic elements with EDS mappings and composite

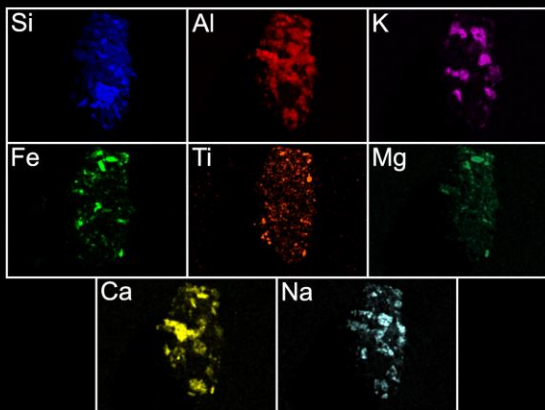
Coupled with SEM, EDS is an efficient instrument to conduct both qualitative and quantitative elemental analyses. These analyses are required to determine the structural formula and then the identity of mineral content composing the testate amoebae shells. The qualitative elemental analysis consists in constructing an elemental map showing the spatial distribution of chemical elements within the shells (Fig.4). All chemical elements could be selected for detection. For testate amoebae, 12 chemical elements usually detected in shells are selected for the analysis: Al, Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Si and Ti. Elemental maps created for each element are produced by progressively rastering the electron beam point by point over the visible surface of shells. A color code is used to display simultaneously each chemical element on a composite elemental map, which is then used as guide for locating mineral particles of different colors and thus with potentially different mineral identities.

2.5.2 Point-chemical analyses and mineral identification

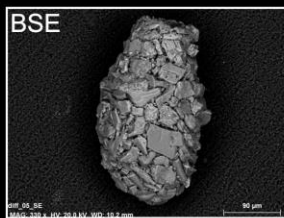
Mineral identification is obtained after quantitative elemental analysis which consists of a point elemental analysis (Fig.4). Rather than rastering over a large surface, a point elemental analysis focuses on a small area of interest (down to an interactive volume of $1\mu\text{m}^3$), allowing an accurate determination of the chemical composition. The last are necessary to quantify the atomic proportions of mineral grains, which are interpreted by comparing analyses results with structural formulas of minerals. This method has been recently used by Armynot du Châtelet et al. (2015) and Delaine et al. (2016a-b) to identify the mineral grains composing xenosomic and idiosomic testate amoebae. The accuracy of point chemical analyses is better on flat surfaces, then pointing lateral grains of shells is not recommended.

EDS imaging using X-ray signal

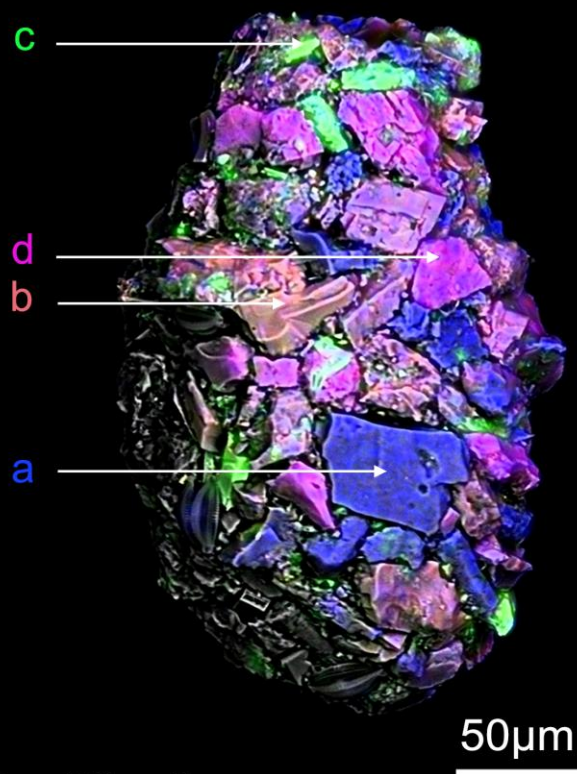
Overlaying of element mappings and BSE



+

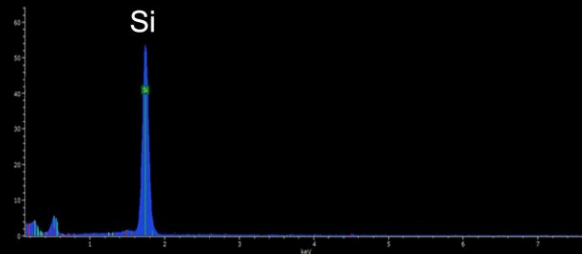


= Composite EDS picture

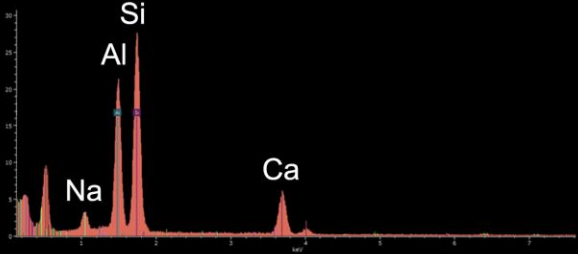


Mineral identification

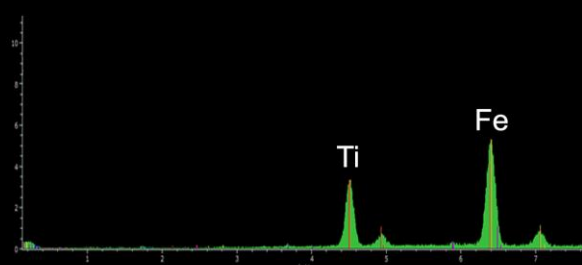
a. Quartz - SiO_2



b. Plagioclase - $(\text{Ca,Na})\text{Al}_{1-2}\text{Si}_{2-3}\text{O}_8$



c. Ilmenite - FeTiO_3



d. Orthoclase - KAlSi_3O_8

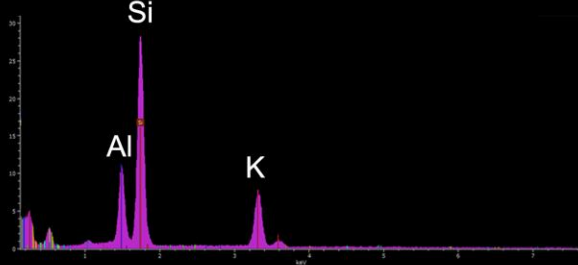


Fig.4 - Example of element mappings showing the spatial distribution of chemical elements (Si, Al, K, Fe, Ti, Mg, Ca, Na) within grains of a xenosomic shell of *Diffugia oblonga* var *bryophila* (top left), with associated EDS composite image (top right). Below, EDS spectra of 4 quantitative point element analyses revealing the atomic composition of the 4 analyzed grains, which allows their mineral identification

2.6 HOW TO REPRESENT AND VISUALIZE SHELLS IN 3D?

Anaglyph images are a cheap and original way to visualize the 3D shape of shells, contrary to 2D standard images on whom the shells relief is hardly observable. In some cases, this last point is a problem given that shells convexity is a morphological trait used for species identification. To apprehend the shells shape, it was required to take multiple images from different views. Creation of anaglyph images is quite easy (Fig.5): 2 pictures of the same object are taken by tilting the stub. Optimal tilting degree fluctuates according to the size of the analyzed object. For testate amoebae shells, the optimal angular suggested tilt is 6 degrees (first picture: +3°, second picture: -3°). Best results are obtained when shells are perpendicularly positioned to the electron beam. Then, these 2 images are processed and chromatic RGB levels are adjusted for each image, so that one image keeps red signal and the other keeps blue and green (cyan) signal. Finally, these red and cyan images are stacked and their position is finely adjusted to minimize chromatic aberrations ('ghost effect') and improve quality of the 3D visual effect (Fig.5). 3D anaglyphs can be made with both SEC and BSE images.

Foraminifera and testate amoebae were imaged using this technique in order to illustrate the observed species diversity (Delaine et al., 2014 and 2016a).

Creation of 3D anaglyphs

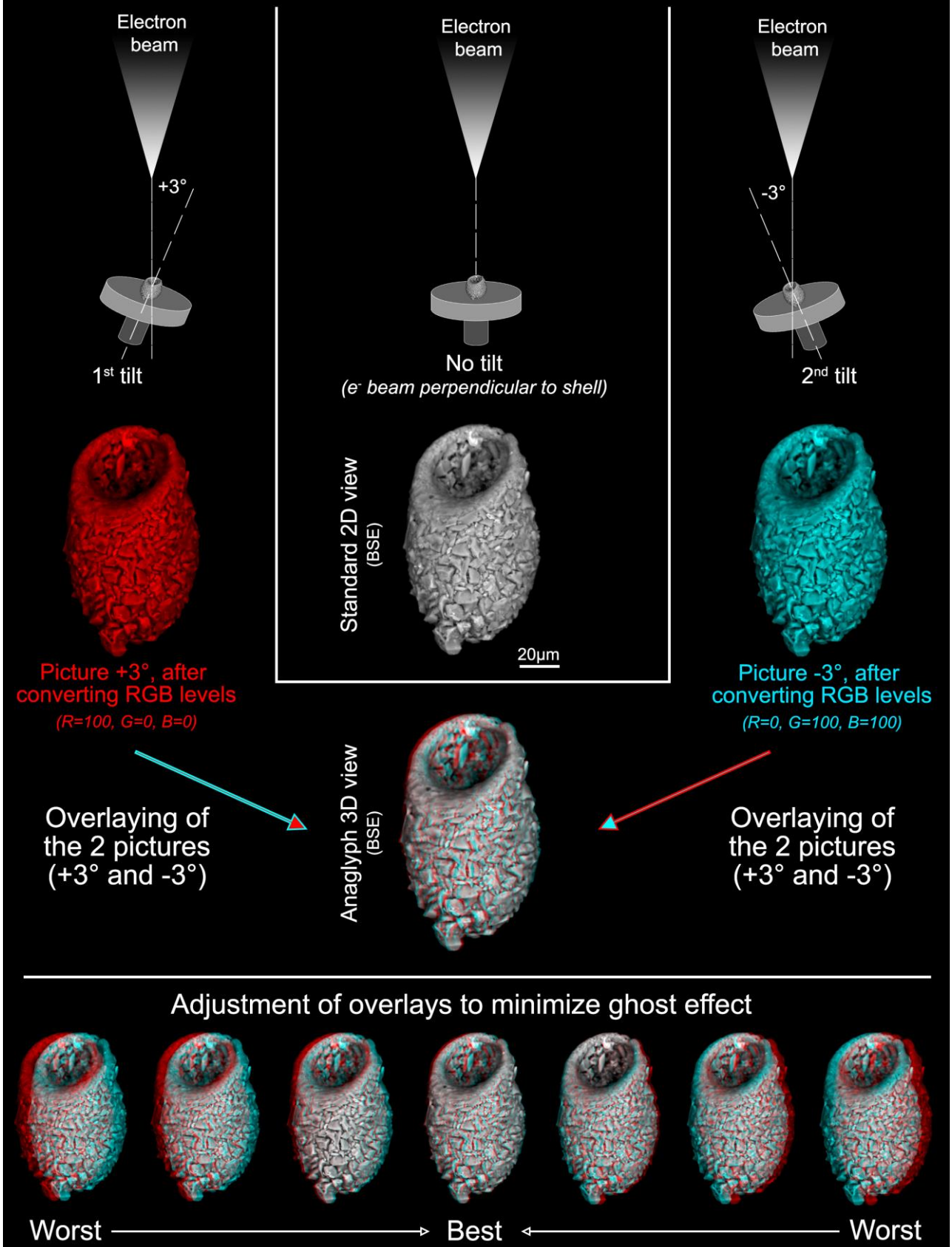


Fig.5 – Step by step presentation of the methodology for anaglyph construction realized on a specimen of *Centropyxis elongata*. Below, overview of the risk of chromatic aberrations ('ghost effect') in case of bad positioning of red and cyan images during overlay process

2.7 HOW TO ENHANCE VISUAL ILLUSTRATION WITH FALSE COLORED SEM IMAGES?

In some situations, highlighting some details on objects is complex, and arrows multiplicity can affect the understanding of a picture. Beyond the esthetic interest of false-colorization which transform a common image into an original one, this method is also an image processing which can improve the scientific message of a picture (Fig.6). False-colorization can be done in numerous steps, depending on the degree of image processing (e.g. levels adjustment, successive stacking of colored layers) but can also be extremely simplified. In the Fig.6 example, stacking BSE image and EDS (Fe) mapping creates a composite 'false-colored' image which demonstrates the Fe presence in the organic matrix of a testate amoebae shell.

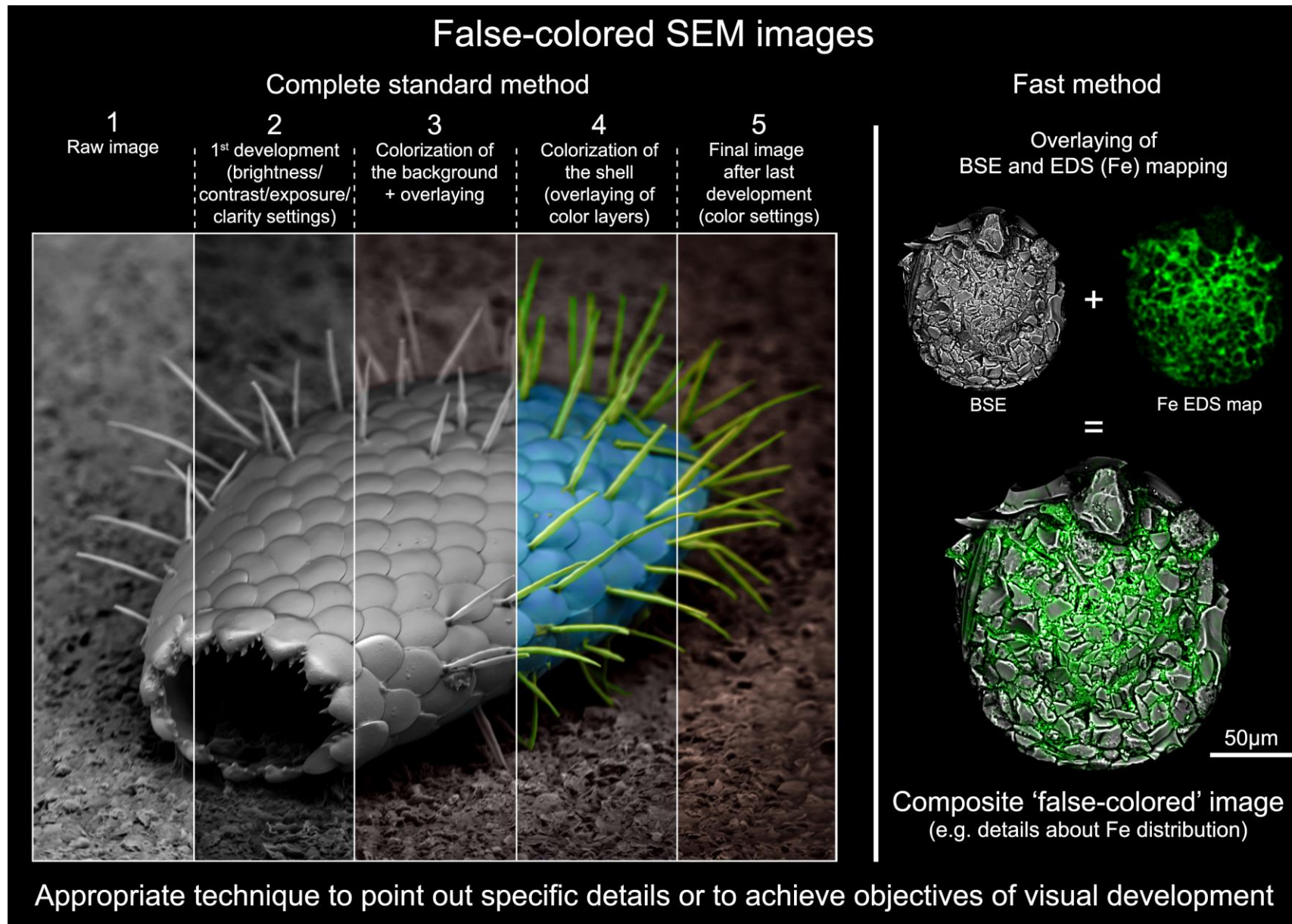


Fig.6 – Exposition of the 2 methods of false-colored SEM images creation. On the left, the complete standard step-by-step method on an individual of *Euglypha strigosa*. On the right, an example of the fast method, which consists in stacking a BSE image with an EDS map of *Centropyxis ecornis*

3 EXEMPLES ILLUSTRANT LES DIFFÉRENTS TYPES DE THÈQUES ET LA VARIABILITÉ DE LEUR COMPOSITION

3.1 LES TYPES DE THÈQUES

Les précédentes études réalisées sur les amibes à thèques classent les thèques en 4 catégories, en se basant sur leur composition générale (Ogden et Hedley, 1980, cf Chapitre 1, paragraphe 2.1). Il existe donc des thèques protéiques (Fig.1), des thèques siliceuses (Fig.2), des thèques agglutinées (Fig.3) et enfin des thèques calciques (Fig.4). Des espèces illustrant ces types de thèques ont été rencontrées au cours des différentes études réalisées dans le cadre de cette thèse. Des exemples sont données et illustrés par les figures suivantes.

3.2 VARIABILITÉ DE LA COMPOSITION DES THÈQUES

Dans les chapitres suivants, je m'emploie à caractériser la variabilité de la composition de nombreuses espèces xénosomiques (*Bullinularia indica* dans des sphaignes des tourbières, 17 espèces provenant de micro-habitats variés du Chili). Des exemples sont donnés et ils concernent 1/la variabilité de la composition des thèques idiosomiques et 2/le contenu en fer de la matrice organique de certaines thèques xénosomiques. Je tiens à préciser que la variabilité de ces éléments complémentaires ne sera pas, contrairement à la variabilité des thèques xénosomiques, développée ultérieurement dans ce rapport.

3.2.1 Variabilité de la nature des idiosomes

Les espèces à thèques idiosomiques peuvent sécréter des idiosomes de taille, forme et nature différentes. La figure 5 montre une comparaison entre une thèque d'une espèce sécrétant es idiosomes siliceux à une autre, sécrétant quant à elle des idiosomes calciques.

3.2.2 Contenu en fer de la matrice organique

Hedley et al. (1976) et Ogden (1988b) ont observé que la matrice organique des structures alvéolaires pouvait contenir du calcium, du phosphore, de chlore et du potassium, mais aussi des éléments métalliques lourds amorphes tels que le manganèse et le fer chez les genres *Diffflugia* et *Centropyxis*. La présence de ces éléments s'accroîtrait avec l'âge des thèques et ils contribueraient à la renforcer tout en provoquant son assombrissement. Ces observations ont également été constatées dans des travaux personnels (non publiés) chez des *Arcella* provenant de tourbières franc-comtoises et des *Centropyxis* provenant du Chili (Fig.6).

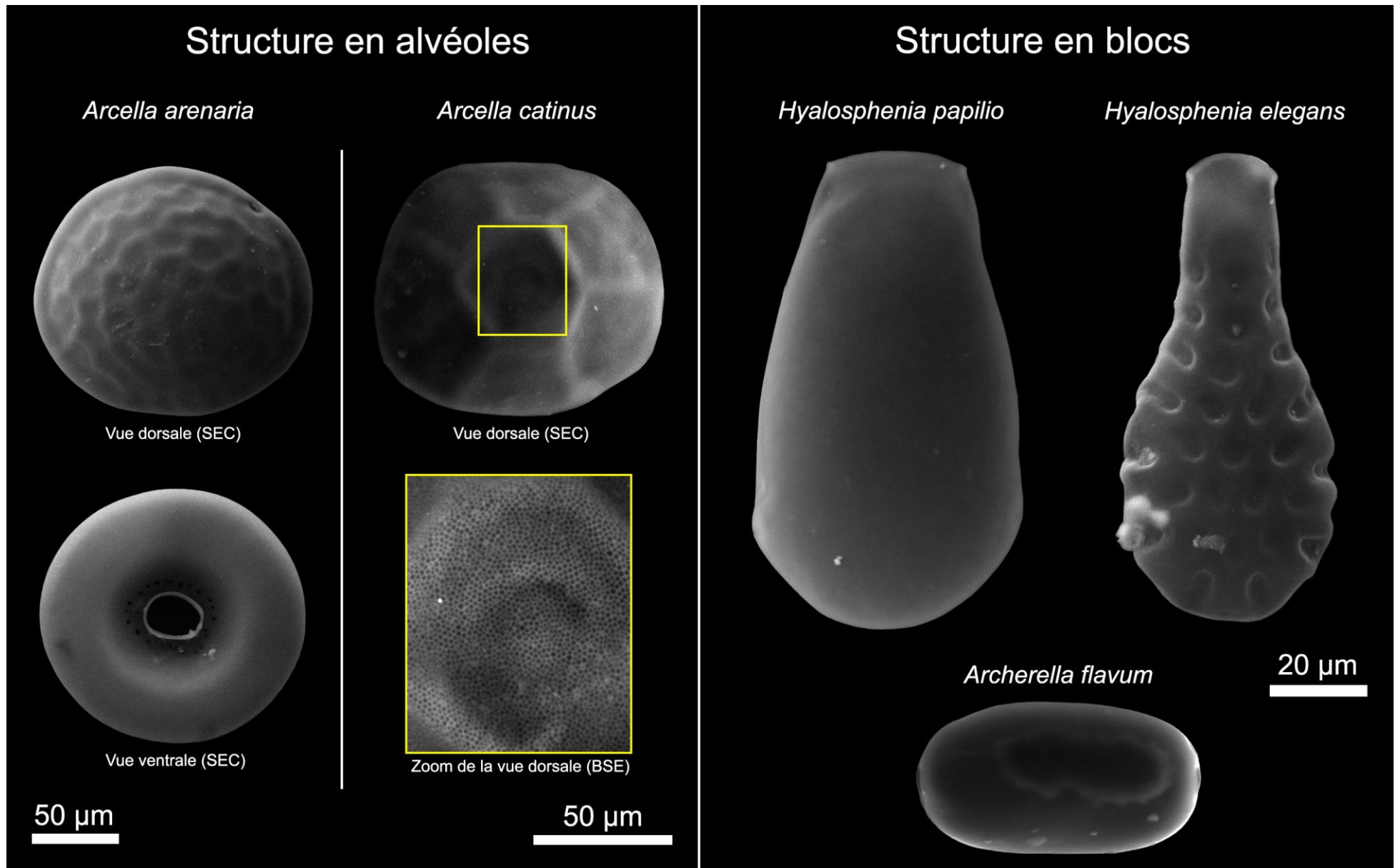


Fig.1 - Images obtenues en microscopie électronique à balayage (MEB) de quelques espèces qui construisent des thèques protéiques et dont la matrice organique a une structure en alvéoles (à gauche) ou une structure en blocs (à droite)

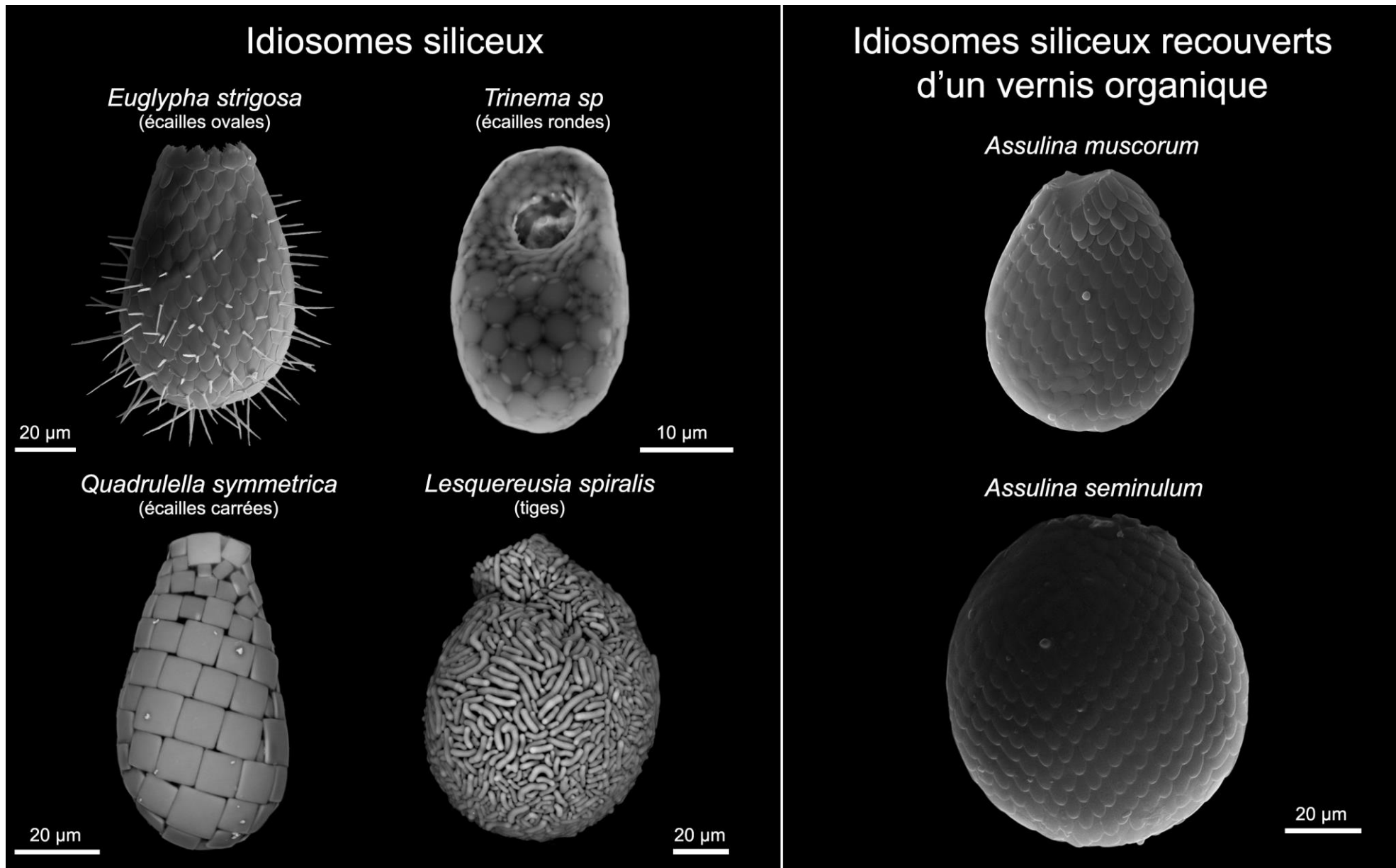
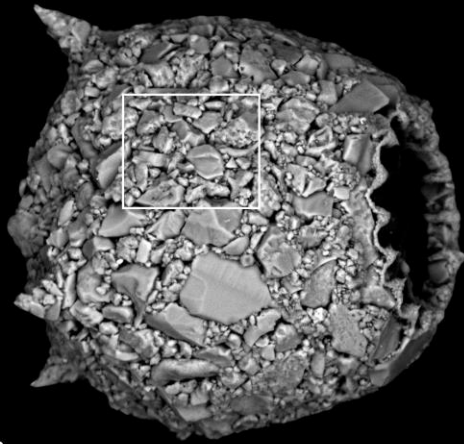
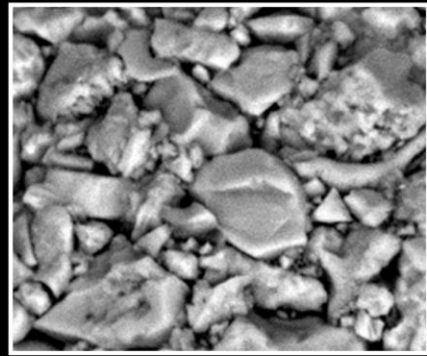


Fig.2 – Images MEB montrant les multiples formes des idiosomes par le biais de plusieurs espèces du groupe des thèques siliceuses (à gauche), et 2 espèces du genre *Assulina*, qui font partie du groupe de thécamœbiens qui sécrètent des écailles siliceuses et les recouvrent d'un vernis organique (à droite)

Recyclage de xénosomes (e.g. *Diffugia corona*)

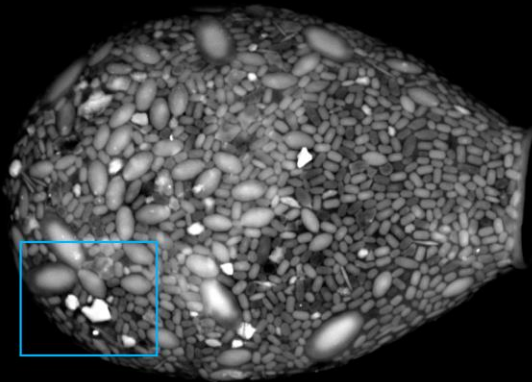


50 μm

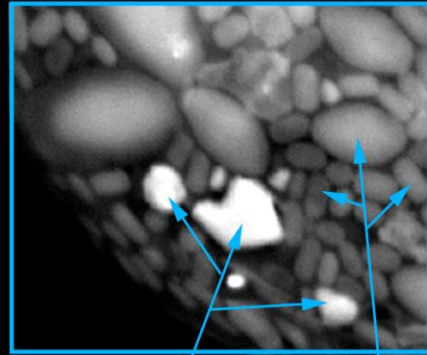


Zoom sur les xénosomes (BSE)

Recyclage de xénosomes et d'idiosomes (e.g. *Nebela aliciae*)



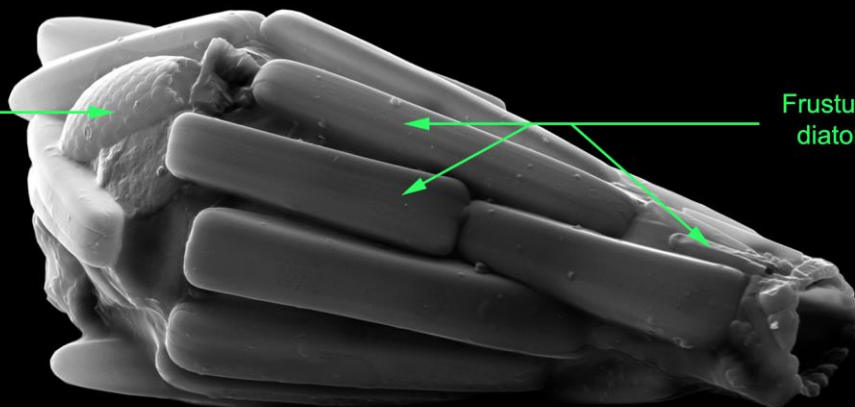
20 μm



Zoom sur les xénosomes et les idiosomes (BSE)

Recyclage de micro-squelettes (e.g. *Diffugia bacillifera*)

Petites
thèques
siliceuses
(*Euglypha* sp)



Frustules de
diatomées

50 μm

Fig.3 - Images MEB de quelques espèces qui recyclent les xénosomes (*Diffugia corona*), à la fois xénosomes et idiosomes (*Nebela aliciae*) ou des micro-squelettes (*Diffugia bacillifera*) pour construire leur thèque

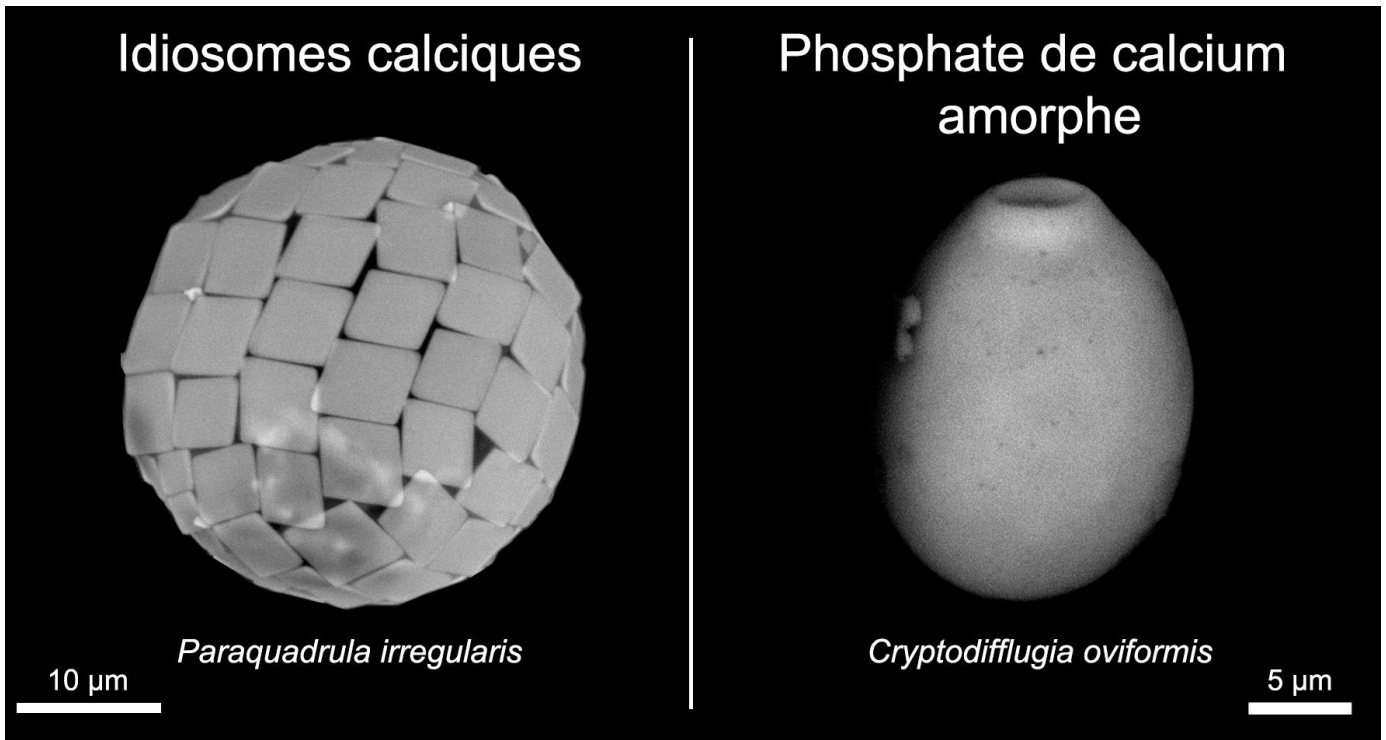


Fig.4 – Images MEB (BSE) de 2 espèces à thèques calciques : *Paraquadrula irregularis*, qui sécrète des idiosomes calciques et *Cryptodifflugia oviformis*, qui sécrète une épaisse couche de phosphate de calcium amorphe et la recouvre d'un vernis organique

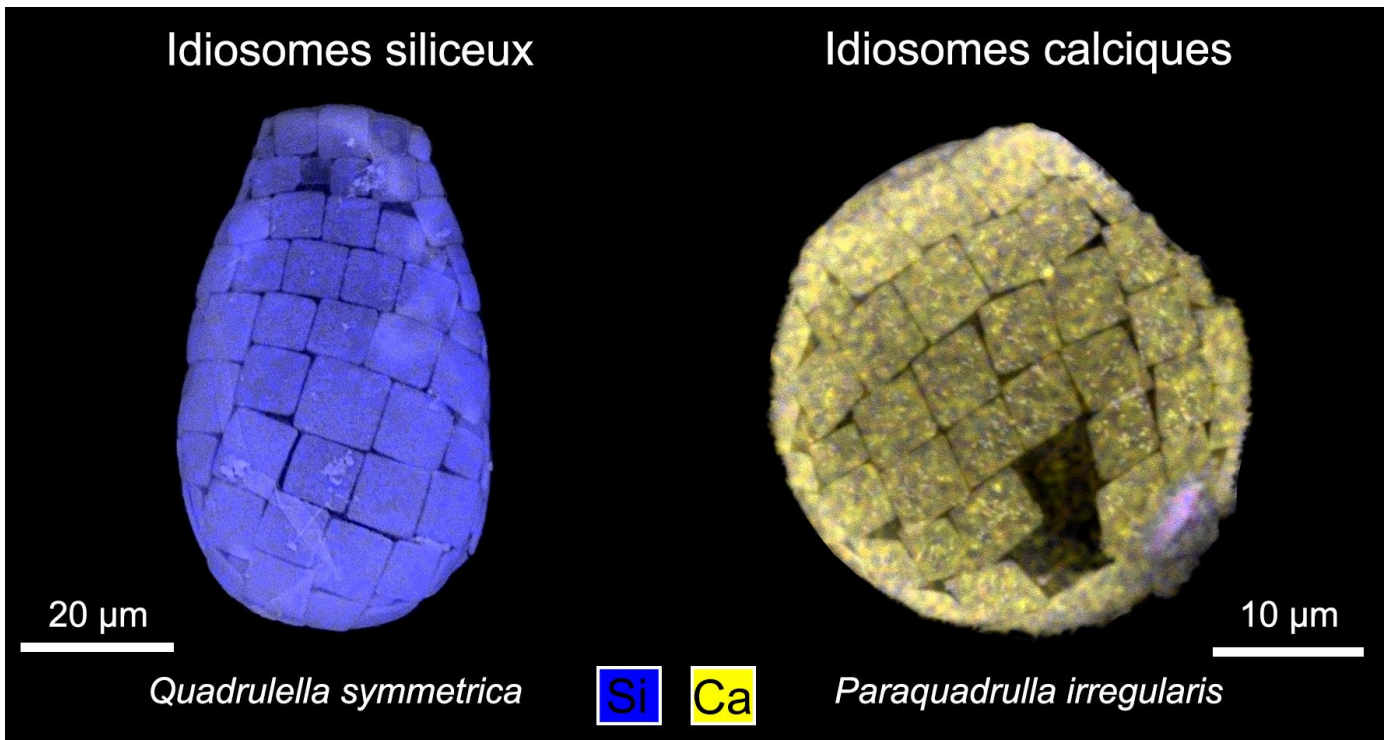


Fig.5 – Images EDS composites de 2 espèces à thèques idiosomiques : *Quadrulella symmetrica*, qui sécrète des idiosomes siliceux, et *Paraquadrulla irregularis*, qui sécrète des idiosomes calciques

Exemples d'individus dont les matrices organiques ont une teneur en fer (Fe) anormalement élevée

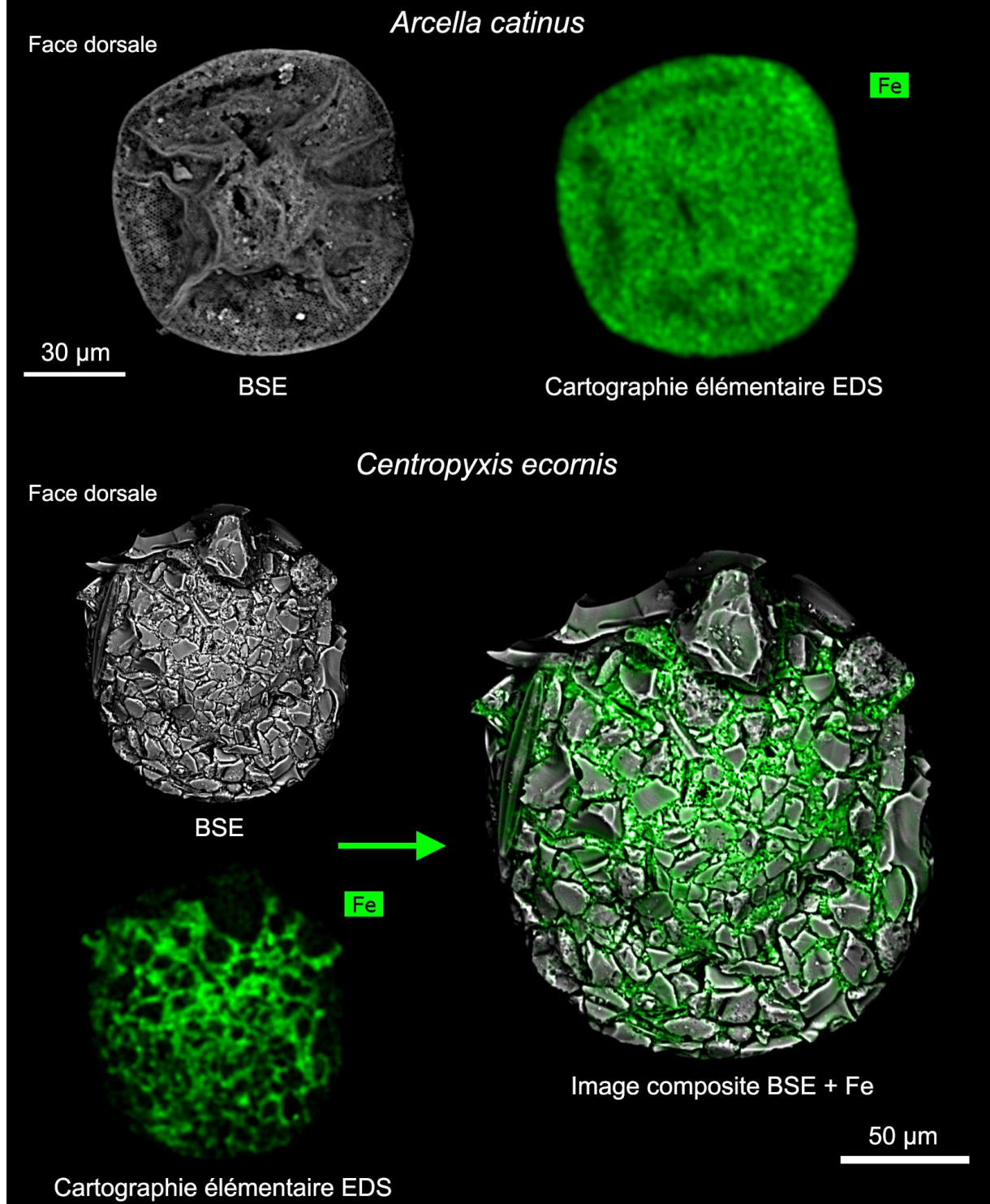


Fig.6 – Images MEB et cartographies élémentaires montrant la détection de fer dans la matrice organique d’*Arcella catinus* et de *Centropyxis ecornis*. Pour ce second individu, les variations de détection du fer entre les grains minéraux (verre volcanique) et la matrice organique qui lie ces grains sont clairement visibles.

**Chapitre 3 – Diversité de la
composition des thèques d'amibes :
Exemple de *Bullinularia indica*
vivant dans les tapis de *Sphagnum*
*capillifolium***



1 PRÉAMBULE

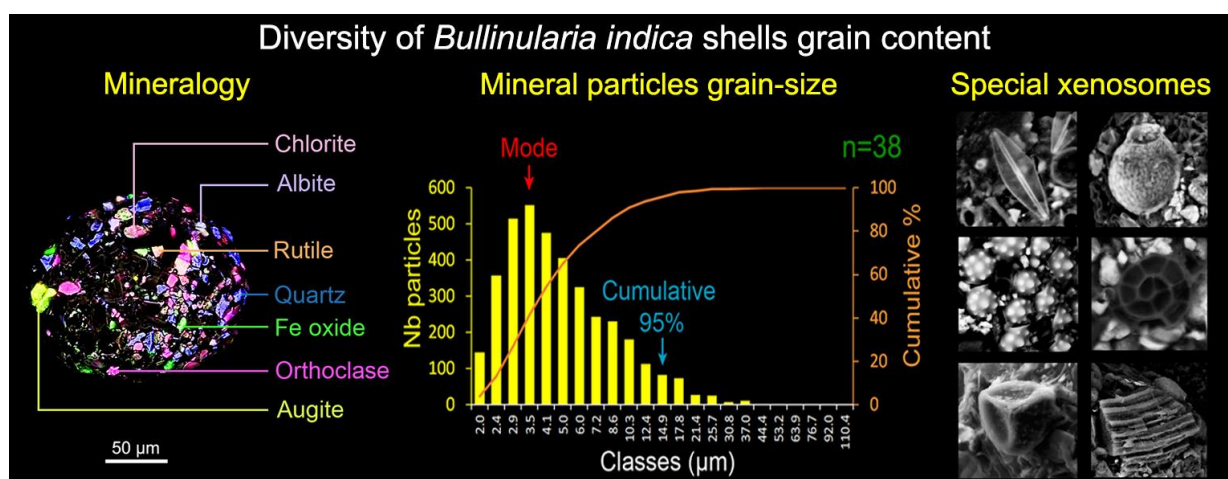
Les thèques d'amibes xénosomiques contiennent des grains provenant de leur environnement. Ils sont recyclés par ces micro-organismes pour la construction de leur thèque (Ogden et Hedley, 1980). A ce jour, une seule étude in situ a dévoilé en partie la diversité minérale de plusieurs espèces d'amibes à thèques vivant dans les tourbières à sphaignes (Armynot du Châtelet et al., 2015). A ma connaissance, aucune étude n'a été entreprise pour révéler la variabilité intra-spécifique de la diversité des grains minéraux, organiques et biologiques.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est de déterminer la diversité de taille, de nature et de forme des grains d'origine minérale, organique et biologique qui constituent les thèques d'une espèce d'amibe xénosomique : *Bullinularia indica*. Celle-ci a été sélectionnée en raison du contenu riche et varié de sa thèque en grains minéraux, et du faible risque de confusion taxonomique (Meisterfeld, 2008). Le lieu d'étude choisi est une tourbière à sphaignes non perturbée et peu soumise aux influences anthropiques où *Bullinularia indica* est présente dans les tapis de *Sphagnum capillifolium*.

Les résultats obtenus mettent en évidence que les thèques de *B. indica* sont construites à l'aide de grains minéraux, organiques et les biominéraux disponibles dans les sphaignes. Ces observations confirment le mécanisme de recyclage des xénosomes par l'amibe. L'absence de grains grossiers dans la thèque, bien que présents dans l'environnement, suggère qu'une sélection des grains en fonction de leur taille est effectuée par *B.indica*. L'assemblage minéralogique et la taille des particules utilisées par *B. indica* sont proches de ceux des particules constituant les dépôts particulaires atmosphériques. Cette étude fournit des informations nouvelles sur la diversité minéralogique et la taille des grains utilisées par une amibe xénosomique pour construire sa thèque. La diversité des grains minéraux, organiques et biologiques est le reflet de son environnement proche.

2 DIVERSITY OF TESTATE AMOEBAE SHELL CONTENT: EXAMPLE OF *BULLINULARIA INDICA* LIVING IN *SPHAGNUM CAPILLIFOLIUM* CARPET

Abstract figure :



Maxence Delaine^{a,b*}, Nadine Bernard^{a,c}, Daniel Gilbert^a, Philippe Recourt^b, Eric Armynot du Châtelet^b

^aLaboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

^bUniversité de Lille, UMR LOG 8187 CNRS, ULCO Laboratoire d'Océanologie et Géosciences, Bâtiment SN5, 59655 Villeneuve-d'Ascq, France

^cLaboratoire THÉMA, UMR 6049, CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, 32 rue Mégevand, 25030 Besançon Cedex, France

*Corresponding author, email adress : maxence.delaine@gmx.fr

Keywords: Arcellinida, shell composition, atmospheric particle deposits, testate amoebae, sphagnum peat bog, bioindication.

2.1 ABSTRACT

Testate amoebae are free-living shelled protists that build a wide range of shells with various sizes, shapes, and compositions. Recent studies showed that xenosomic shells of testate amoebae could be indicators of atmospheric particulate matter (PM) deposition. However, no study has been yet conducted to reveal the intra-specific mineral, organic, and biologic grain diversity of a single xenosomic species in a natural undisturbed environment. This study aims at providing new information about grain selection to develop the potential use of xenosomic testate amoebae shells as bioindicators of the multiple-origin mineral/organic diversity of their proximal environment. To fulfil these objectives, we analysed the shell content of 38 individuals of *Bullinularia indica*, a single xenosomic species of testate amoebae living in *Sphagnum capillifolium* carpet, by scanning electron microscope (SEM) coupled with X-ray spectroscopy. Shells exhibit high diversities of mineral, organic, and biomineral grains, which confirms their capability of xenosome recycling. Mineral grain diversity and size of *B. indica* match those of the atmospheric natural mineral PM deposited in the peatbog. Calculation of grain-size sorting reveals a discrete selection of grains agglutinated by *B. indica*. These results are a first step to understanding the mechanisms of particle selection by xenosomic testate amoebae in natural conditions.

2.2 INTRODUCTION

Testate amoebae are abundant and diverse heterotrophic and mixotrophic microorganisms that belong to Amoebozoa (lobose testate amoebae) and the supergroup containing Stramenopiles, Alveolates, and Rhizaria (SAR; filose testate amoebae; Adl et al., 2012). These microorganisms are common in various freshwater and terrestrial habitats, such as soils, lakes, mosses, or peatlands (Charman, 1997; Fernandez et al., 2015; Hedley, 1980; Ogden and Qin et al., 2011; Patterson et al., 2015). They represent one of the most diverse and abundant groups of free-living terrestrial protists; therefore, their diversity and ecology have been well studied, especially in peatlands (Mitchell et al., 2008). Moreover, studies have demonstrated that they are a key group living in bryophytes (Koenig et al., 2015; Meyer et al., 2012; Mitchell et al., 2004). Indeed, testate amoebae are sensitive to multiple environmental factors, such as pH, hydrology, or nutrient availability (Jassey et al., 2012; Mitchell and Gilbert, 2004; Nguyen-Viet et al., 2008; Opravilova and Hajek, 2006). Testate amoebae communities are already used for monitoring recent (Meyer et al., 2012; Turner and Swindles, 2012; Valentine et al., 2013) and past environments (Charman, 2001; Delaine et al., 2014; Swindles et al., 2010; Wall et al., 2010) owing to their shell, which is produced by the organism itself to surround and protect its single-cell body. This shell remains intact in peats and sediments for a long period after the death of the organism (Beyens and

Meisterfeld, 2001). The nature of these shells are highly variable and can be distributed in four categories: (1) endogenous 'naked' proteinaceous shells, totally organic (e.g., *Archerella flavum*), (2) endogenous idiosomic shells composed of amorphous silica grains with possible organic coating (e.g., *Assulina muscorum* with organic coating and *Euglypha strigosa* without organic coating), (3) exogenous xenosomic shells composed of recycled grains (e.g., *Diffflugia pyriformis*), and (4) endogenous calcareous shells (e.g., *Cryptodiffflugia oviformis*) (Mitchell et al., 2008; Ogden and Hedley, 1980).

Xenosomic shells could be indicators of atmospheric particulate matter (PM) deposition, including extreme atmospheric dust deposition (Fiałkiewicz-Kozieł et al., 2015) or cryptotephra occurrence under the influence of volcanogenic dust deposits (Delaine et al., 2016). To be used as bioindicators, understanding grain content variability is mandatory. However, only one *in-situ* study has attempted to reveal the mineral diversity of multiple testate amoebae species living in *Sphagnum* peatlands (Armynot du Châtelet et al., 2015). Moreover, no study has been yet conducted to reveal the intra-specific mineral, organic, and biologic grain diversity and variability for a single xenosomic species in a natural undisturbed environment.

The objective of the study is to characterise the diversity, size, nature, and shape of mineral, organic, and biologic grains constituting shells of a testate amoebae xenosomic species. We selected a species inhabiting the *Sphagnum capillifolium* carpet in an ombrotrophic peatbog isolated from watershed input (Diaz et al., 2016; Meyer et al., 2015). In this specific ecosystem, we selected *Bullinularia indica*, a xenosomic species with a rich and various grain shell content and with little possible taxonomic confusion (Meisterfeld, 2008). This study aims to provide new information about grain selection and to raise the question of the potential use of xenosomic testate amoebae shells as bioindicators of the mineral/organic diversity of their proximal environment.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Study Site and Sampling

The study was carried out at Frambouhans-Les Ecorces, a 27 ha wide peatland, located in the Jura Mountains (NE France, WGS84 coordinates: 47°10'44.66" N, 6°47'23.87" E, altitude 867 m). The geological landscape around the study area is predominantly composed of Jurassic carbonate rocks (-203 to -145 Ma; Guillemot et al., 1965; Fig. 1). This peatland was selected according to its ombrotrophic nature, the presence of macroscopic lawns of *Sphagnum capillifolium* (an ectohydric species), and its distance to atmospheric pollution sources. This peatland is in a rural area, far from (> 25 km) any anthropogenically-disturbed

system (cities, small industries, and roads) that might complicate the natural development of the studied material (Artz et al., 2008; Bortoluzzi et al., 2006).

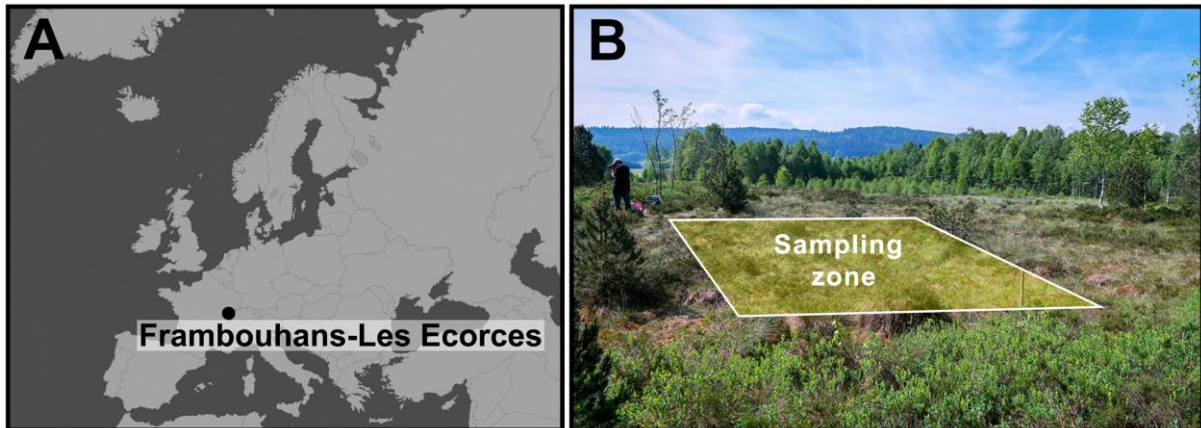


Fig.1: A. Geographical localisation of the Frambouhans-Les Ecorces peatbog in the Jura Mountains, France. B. Photograph of the peatbog showing its openness to atmospheric particle deposits, with the 100 m² Sphagnum sampling zone and the Jura Mountains in the background.

To characterise the shell grain content, in April 2014, an area of 100 m² was selected in a homogeneous *S. capillifolium* dominated carpet. Eight stems, including capitula (0-3 cm), corresponding to the living part of *S. capillifolium* were spatially and randomly sampled over the area. To characterise the atmospheric particle flux, a monthly collector of atmospheric PM deposits was set up in this open area of the peatland. Due to theft and deterioration of collectors, only three samples of the atmospheric PM deposits were collected at 2 months ($T+2$), 3 months ($T+3$), and 6 months ($T+6$) after the establishment. To characterise mineral grains composing the peatland background, three randomly selected replicates of peaty substratum were sampled by scrapping the non-vegetative surface and were pooled to avoid micro-spatial variability.

2.3.2 Stems, Shells, and PM Deposit Treatment

The *S. capillifolium* stems were washed three times with deionised water (3 x 300 mL) and squeezed by hand in order to release testate amoebae. Water containing testate amoebae shells was filtered with a 315 μm sieve in order to separate testate amoebae and organic remains (e.g., debris and big particles), and then testate amoebae were concentrated by decanting. Shells of *B. indica* were visualised and identified under light stereomicroscope Olympus SZX16 (115x magnification). Over the eight samples, a total of 38 shells of *B. indica* (three to five specimens per sample) have been picked up using a very fine paintbrush

and were positioned on SEM stubs using double-sided adhesive carbon tabs. Shells were oriented so that the back side, opposite to the pseudostome, which is richer in grains (Supplementary material 1), faced the electron beam. The SEM stubs were coated with carbon. The identification of *B. indica* shells was based on morphological features of the shell following the work by Ogden and Hedley (1980), Clarke (2003), and Mazei and Tsyganov (2006).

The mineral grains of the atmospheric PM deposits ($n = 3$) and the peat (three sub-samples pooled, $n = 1$) samples were concentrated by removing the organic remains using loss on ignition at 450°C. The mineral grains were then fixed in epoxy resin and polished in order to obtain a flat surface appropriate for chemical analysis and determination of their nature. Finally, as testate amoebae shells, the four polished resins were carbon coated before scanning electron microscope (SEM)-energy dispersive X-ray spectrometer (EDS) analyses.

2.3.3 Shell and PM Deposit Analysis

The *B. indica* specimens and mineral particles within the resin were imaged with an environmental SEM (ESEM; FEI Quanta 200) equipped with an EDS. Both devices are collectively called SEM-EDS hereafter, given that the Environmental functionality of the SEM was not used in this study. Pictures were taken using both secondary electrons (SEC) and back-scattered electrons (BSE). In order to evaluate the morphological variability of the shells, the length and width were measured on SEM pictures with ImageJ software (v 1.49o, <http://imagej.nih.gov/ij>).

2.3.4 Total and Relative Mineral Composition of Shells and PM Deposits

The SEM-EDS was used to conduct both qualitative and quantitative elemental analyses to identify the mineral particles composing the shells and PM deposits (see detailed procedure by Armynot du Châtelet et al., 2013b). For qualitative elemental analysis, the following 12 elements were mapped: Al, Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Si, and Ti. A colour code was used for simultaneous display of each chemical element on a composite elemental map. Moreover, 354 quantitative point elemental analyses were carried out: 149 on mineral grains from all shells, 157 on PM ($n = 60$ for $T+2$, $n = 55$ for $T+3$, and $n = 42$ for $T+6$), and 48 on peat grains. The total mineral grain composition was estimated after the measurement was carried out on only one side of the shell. The dominating grains were grouped into one mineral and three groups of minerals, respectively, quartz, oxides, feldspars-micas-clays (FMC), and carbonates. These groups are based on colour similarities induced by the colour code used to display each chemical element. For each group, mineral particles were selected and cropped due to composite EDS pictures with Photoshop CS6 (see detailed procedure in the work of Delaine et al., 2016). At last, by image analysis, the total mineral

area (TMA) after cropping and the relative areas for each mineral group were estimated. Thus, area proportions of each mineral group were calculated for the shells, PM deposits, and peat. The grains that appear with infrequent atomic composition (i.e., with infrequent colour) are all quantified and determined with EDS point elemental analyses.

2.3.5 Grain Size of Mineral Particles Composing Shells and PM Deposits

The mineral grain size was determined on *B. indica* shells, peat, and PM deposits. The procedure is the same as that followed and described by Armynot du Châtelet et al. (2013a, in 'Supplementary data S2'). For each mineral grain, an ellipse was adjusted to model the grain, and the major and minor axes were estimated. Because the minor axis induced a background noise for thin particles, the major axis was the only parameter used for grain-size distribution estimation. Mode, sorting, and skewness were used as parameters characterising grain-size distribution. Sorting and skewness are expressed in Phi (Φ) units; their calculation and interpretation are based on Folk (1968). The SEM picture precision did not allow discrimination of particles less than 2 μm in length. Therefore, the particle distribution evaluation was performed from this size.

2.4 RESULTS

2.4.1 Characterisation of *B. Indica* Shells: Morphology and Content Diversity

On the 38 analysed shells, length ranged between 137 μm and 213 μm and width ranged from 122 μm to 171 μm (Fig. 2, Table 1). Our analysis shows that the size of grains attached to the surface of the shells triggers bigger measures of length and width. Here, two groups of individuals, Type 1 ($n = 33$) and Type 2 ($n = 5$), have been identified (Fig. 2). Individuals belonging to the Type 2 group have bigger external volume of shells. On the five individuals composing the Type 2 group, four are from the same sample (S34, Fig. 2).

The surface occupied by mineral grains (TMA/Analysed Area of Shell) ranges from 2% to 33% of the analysed surface (Fig. 3A, Table 1). Three kinds of agglutinated content are observed on the shells: mineral grains (Fig. 3A), biominerals (Fig. 3B), and organic grains (Fig. 3B).

Mineral grains – The proportions of Si, Al, Ca, K, Fe, and Na vary between shells. This heterogeneity is consecutive to a high mineral diversity (18 different minerals, Table 2). The EDS composite of an individual showing a high mineral diversity is presented in Fig. 4A. The most frequent are quartz (46% of the TMA of the 38 shells, Fig. 4B), then aluminosilicates (31% of TMA, grouped in FMC (e.g., feldspar plagioclase group and phengite) and oxides

(23% of TMA, under the form of Fe-oxides (e.g., hematite), and Ti oxides (e.g., rutile)). Augite, titanite, and garnet minerals are rarer (<1/500 particles).

Biominerals – The *B. indica* can use biominerals (amorphous silica skeletons of microorganisms). These are diatom frustules (central and pennate), filose amoebae, such as species belonging to the genera *Euglypha*, *Corythion*, or *Trinema*, and siliceous scales, which are probably recycled from Chrysophytes or species of the class Imbricatea (Fig. 3B).

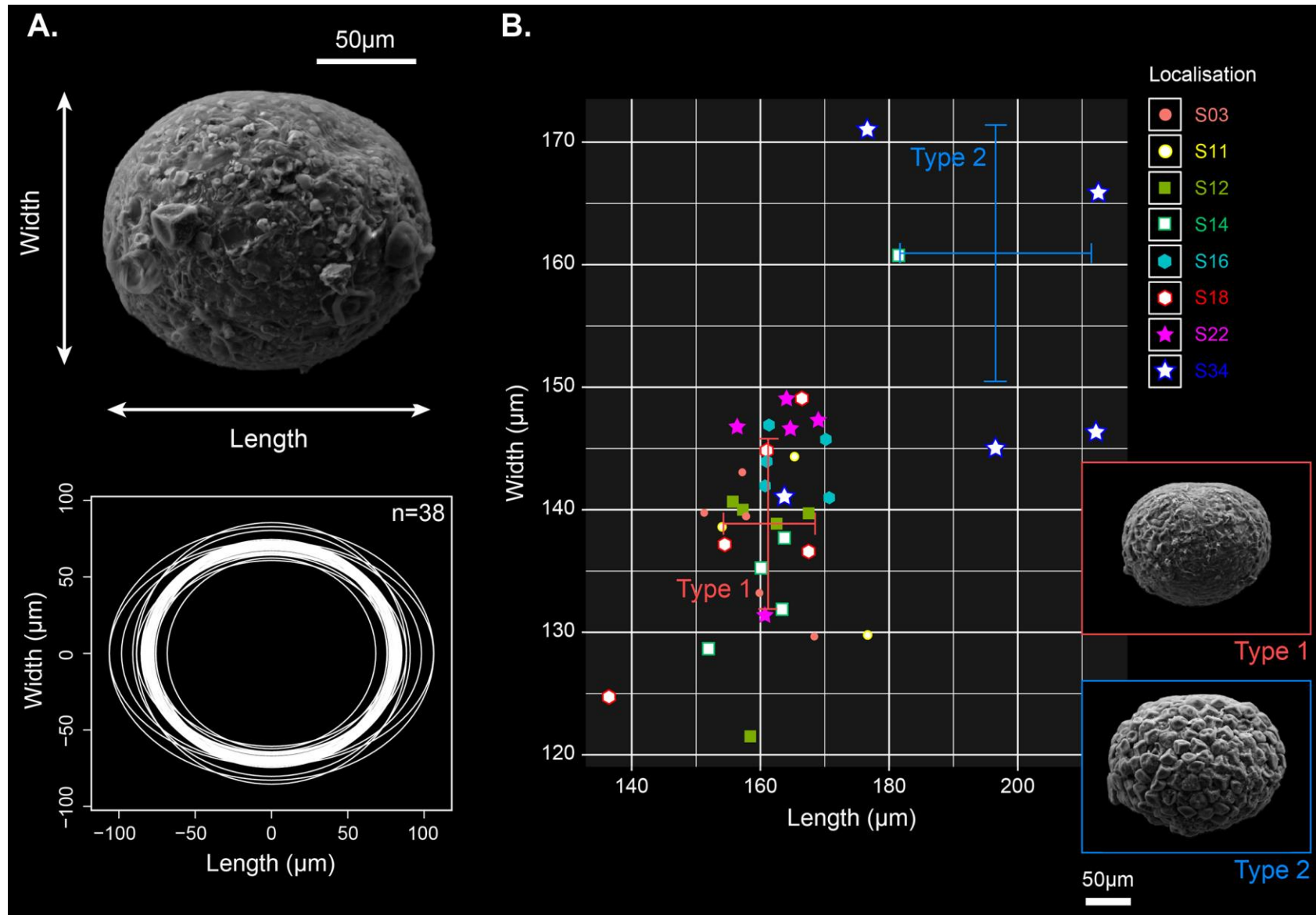


Fig. 2: A. Example of the analysed grain-rich side of an individual *B. indica* shell as observed by SEM and secondary electrons (SEC). Superposition of the 38 mean ellipses (one for each shell) mimicking the specimen shape (bottom left). B. Width and length of the 38 specimens depicting two groups Type 1 (n = 33) and Type 2 (n = 5) with bigger shells with the number of *Sphagnum* spores agglutinated on their surface.

Table 1: Morphological measurement, mineral grain content, and mineral composition (estimated areas and proportions) of the 38 *B. indica* shells. Total mineral composition is the sum of the three mineral (quartz, oxides, and FMC minerals) group proportions.

Label	Sample	Major (length, μm)	Minor (width, μm)	Nb grains	Analyzed Area Shell (μm ²)	Area Quartz (μm ²)	Area Oxides (μm ²)	Area FMC (μm ²)	Total Mineral Area (TMA, μm ²)	TMA /Analyzed Area Shell (%)	%Quartz	%Oxides	%FMC
03-001	S3	160	133	58	16727.8	334.7	262.8	259.5	857.0	5.1	39.1	30.7	30.3
03-002	S3	158	140	107	17309.4	1541.0	627.7	812.8	2981.6	17.2	51.7	21.1	27.3
03-003	S3	157	143	153	17673.9	1717.7	586.0	533.7	2837.4	16.1	60.5	20.7	18.8
03-004	S3	169	130	111	17162.2	1111.5	461.1	500.8	2073.3	12.1	53.6	22.2	24.2
03-005	S3	151	140	77	16612.9	708.3	230.2	258.6	1197.2	7.2	59.2	19.2	21.6
11-001	S11	166	144	34	18763.9	106.9	67.4	416.5	590.7	3.1	18.1	11.4	70.5
11-002	S11	154	139	76	16784.0	643.1	405.8	219.3	1268.2	7.6	50.7	32.0	17.3
11-003	S11	177	130	136	18017.0	756.0	599.2	572.3	1927.4	10.7	39.2	31.1	29.7
12-001	S12	156	141	131	17255.8	400.6	561.1	678.0	1639.8	9.5	24.4	34.2	41.4
12-002	S12	163	139	10	17749.7	425.6	44.4	0.0	469.9	2.6	90.6	9.4	0.0
12-003	S12	159	122	117	15141.4	596.9	581.1	364.9	1542.9	10.2	38.7	37.7	23.6
12-004	S12	158	139	180	17311.5	338.2	651.3	560.3	1549.7	9.0	21.8	42.0	36.2
12-005	S12	168	140	86	18407.2	394.5	202.6	83.3	680.4	3.7	58.0	29.8	12.2
14-001	S14	164	132	131	16931.8	489.9	249.4	265.7	1005.0	5.9	48.7	24.8	26.4
14-002	S14	160	135	98	17039.4	621.5	241.1	1274.0	2136.5	12.5	29.1	11.3	59.6
14-003	S14	152	129	74	15366.0	341.8	359.5	187.2	888.4	5.8	38.5	40.5	21.1
14-004	S14	182	161	82	22958.7	634.4	653.1	530.5	1818.0	7.9	34.9	35.9	29.2
14-005	S14	164	138	81	17724.8	326.2	338.3	486.5	1151.0	6.5	28.3	29.4	42.3
16-001	S16	161	147	97	18642.1	259.8	336.1	469.2	1065.2	5.7	24.4	31.6	44.1
16-002	S16	171	141	116	18916.7	403.8	427.6	208.6	1040.0	5.5	38.8	41.1	20.1
16-003	S16	161	142	32	17946.0	274.4	84.4	134.0	492.8	2.7	55.7	17.1	27.2
16-004	S16	161	144	67	18214.9	1049.4	315.8	329.6	1694.8	9.3	61.9	18.6	19.4
16-005	S16	170	146	103	19517.5	1270.8	758.2	1004.6	3033.5	15.5	41.9	25.0	33.1
18-001	S18	167	149	172	19509.2	3135.5	455.0	413.5	4003.9	20.5	78.3	11.4	10.3
18-002	S18	168	137	19	17996.8	206.6	67.2	75.8	349.6	1.9	59.1	19.2	21.7
18-003	S18	161	145	142	18335.1	795.6	198.6	340.1	1334.4	7.3	59.6	14.9	25.5
18-004	S18	155	137	78	16668.3	1006.9	362.0	332.3	1701.1	10.2	59.2	21.3	19.5
18-005	S18	137	125	30	13384.6	267.8	91.9	152.6	512.3	3.8	52.3	17.9	29.8
22-001	S22	165	147	38	18968.4	239.1	37.2	284.5	560.8	3.0	42.6	6.6	50.7
22-002	S22	169	147	153	19565.3	1735.5	776.4	1856.6	4368.6	22.3	39.7	17.8	42.5
22-003	S22	157	147	182	18045.6	2620.3	1269.2	1998.0	5887.5	32.6	44.5	21.6	33.9
22-004	S22	161	131	92	16589.8	815.3	327.6	626.3	1769.1	10.7	46.1	18.5	35.4
22-005	S22	164	149	145	19234.8	2239.0	1125.7	1766.0	5130.7	26.7	43.6	21.9	34.4
34-001	S34	164	141	149	18170.2	1066.9	254.7	526.7	1848.2	10.2	57.7	13.8	28.5
34-002	S34	197	145	177	22393.7	1644.4	764.8	1790.5	4199.6	18.8	39.2	18.2	42.6
34-003	S34	177	171	144	23775.3	797.0	365.7	840.1	2002.8	8.4	39.8	18.3	41.9
34-004	S34	212	146	89	24397.8	673.1	518.5	424.3	1616.0	6.6	41.7	32.1	26.3
34-005	S34	213	166	12	27698.3	511.2	131.9	0.0	643.1	2.3	79.5	20.5	0.0
		Major (length, μm)	Minor (width, μm)	Nb grains	Analyzed area Shell (μm ²)	Area Quartz (μm ²)	Area Oxides (μm ²)	Area FMC (μm ²)	Total Mineral Area (TMA, μm ²)	TMA /Analyzed Area Shell (%)	%Quartz	%Oxides	%FMC
ALL SHELLS	ALL SAMPLES												
	MIN	136.7	121.5	10.0	13384.6	106.9	37.2	0.0	349.6	1.9	18.1	6.6	0.0
	MAX	212.7	171.0	182.0	27698.3	3135.5	1269.2	1998.0	5887.5	32.6	90.6	42.0	70.5
	AVERAGE	166.0	141.4	99.4	18497.6	855.3	415.5	567.8	1838.6	9.9	47.1	23.4	29.4
	SD	14.5	9.8	48.2	2636.9	688.5	279.9	513.3	1327.8	6.9	15.6	9.2	14.0

Organic grains – These organic remains are spores (mainly from *Sphagnum*), fungal hyphae and hardly identifiable small debris of various sizes and forms. Note that the bigger individuals are those completely covered with *Sphagnum* spores (Fig. 3B).

The grain sizes are from sub-micrometric (analytical precision does not allow accurate measurements less than 2 μm) to 47 μm (Fig. 4C). Further, 95% of the particles within the shells are less than 14.9 μm in length. Mineral grains have one mode at 3.5 μm . The group of particles constituting shells is moderately well sorted (calculated sorting = 0.83 Φ). Particle distribution is asymmetric towards coarse particles (calculated skewness = -0.27 Φ).

2.4.2 Characterisation of the Surrounding Environment

Mineral grain diversity in PM deposits and peat is high, with 19 different minerals (Table 2). Most of them are silicates: quartz, feldspars (e.g., albite, andesine, and orthoclase; Fig. 4A) or muscovite (Table 2). The Fe and Ti oxides are also identified (e.g., ilmenite and rutile). Both peat and PM deposits have a similar mineral diversity, except for calcic minerals, such as calcite, epidote, or apatite that are identified in the atmospheric PM deposits and not in the peat (Fig. 4B). The PM deposits showed their mineral variations over time. The quartz proportion ranges from 46% to 66%. The FMC proportion is between 19% and 32%, and Fe-Ti oxide proportions range between 3% and 22% (Fig. 4B). Moreover, 13% of carbonates only appear in one PM deposit sample (Fig. 4B).

Grain size of peat and atmospheric PM deposits are nearly similar with peat particles slightly coarser than PM deposits (Fig. 4C). For both, the grain-size distribution is unimodal with a mode at 4.1 μm . The PM originated from atmospheric compartment and peat grains are both poorly sorted (respective calculated sorting = 1.02 and 1.06 Φ), and their grain distributions are asymmetric towards coarse particles, with calculated skewness of -0.16 and -0.19 Φ , respectively. In addition, 95% of particles are less than 21.4 μm for peat and 17.8 μm for PM deposits. Generally, the peat particles are slightly coarser than those of the PM deposits.

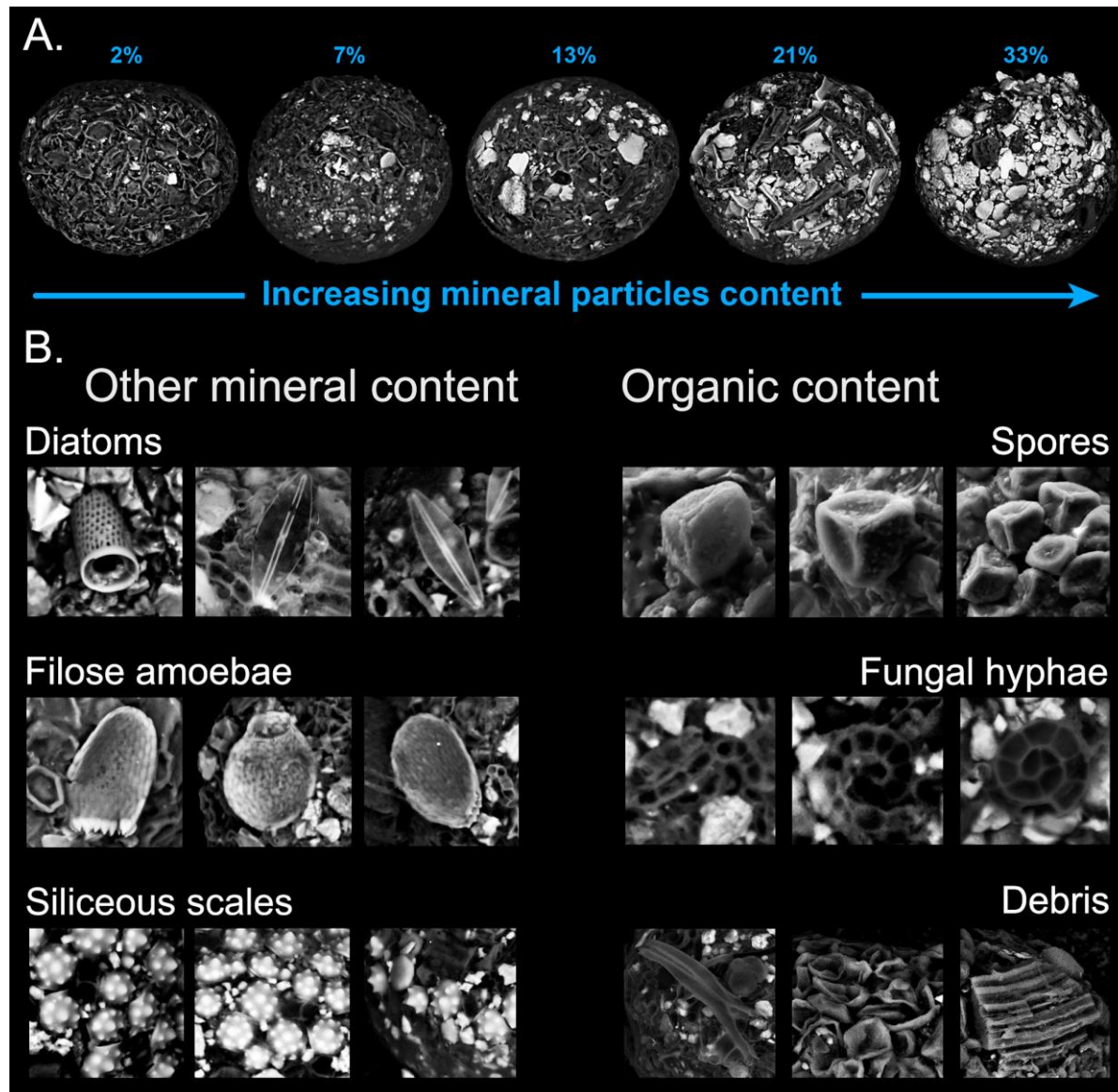


Figure 3: A. Succession of BSE pictures of five *B. indica* shells showing the increase of the mineral particle content in shells, as seen with bright reflectance.
B. SEC and BSE pictures with biominerals (diatoms, filose amoebae shells, and siliceous scales) and organic grains (spores, fungal hyphae, and various debris) that are agglutinated on *B. indica* shells.

Table 2: Mineral diversity of particles composing atmospheric deposits, peat, and *B. indica* shells. Results are given in atomic per cent of each detected element (Si, Ti, Al, Fe, Mn, Mg, Ca, Na, K, P, S, Cl, Cr, Ni, Cu, As, and Zr). An example of point elemental analysis has been selected (among 149 realised on testate amoebae, 157 on atmospheric PM, and 48 on peat grains) for each crystallised mineral identified.

MINERAL DIVERSITY OF ATMOSPHERIC DEPOSITS AND PEAT		Si	Ti	Al	Fe	Mn	Mg	Ca	Na	K	P	S	Cl	Cr	Ni	Cu	As	Zr	W
Atomic percent (%)																			
QUARTZ	Quartz (SiO ₂)	98.3	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FELDSPARS	Albite NaAlSi ₃ O ₈	59.1	0.1	19.9	0.2	0.2	0.0	0.2	19.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.0
	Oligoclase Na(0.7-0.9)Ca(0.1-0.3)Al(1.1-1.3)Si(2.7-2.9)O ₈	56.5	0.1	22.2	0.3	0.2	0.0	3.1	16.3	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.0	0.0
	Andesine Na(0.5-0.7)Ca(0.3-0.5)Al(1.3-1.5)Si(2.5-2.7)O ₈	52.2	0.1	26.9	0.2	0.1	0.2	6.9	12.7	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sanidine (Na,K)AlSi ₃ O ₈	58.8	0.1	19.6	0.7	0.2	0.2	0.4	9.0	10.5	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Orthoclase KAlSi ₃ O ₈	57.8	0.2	20.2	0.3	0.2	0.2	0.5	0.7	19.6	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHYLLOSILICATES	Kaolinite Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	47.3	0.5	45.7	1.7	0.4	0.8	0.2	0.5	2.2	0.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Pyrophyllite Al ₂ Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂ *	64.6	0.3	30.3	0.4	0.2	0.2	0.6	1.6	1.3	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Muscovite KAl ₂ (AlSi ₃ O ₁₀)(OH,F) ₂	42.1	0.2	37.0	2.6	0.2	0.3	0.6	0.4	13.7	0.2	0.1	0.6	0.1	0.3	0.4	1.0	0.2	0.0
	Chlorite (Fe,Mg,Al) ₆ (Si,Al) ₄ O ₁₀ (OH) ₈	24.6	0.1	26.5	26.0	1.2	20.2	0.2	0.5	0.4	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OXIDES	Fe oxide (e.g. Hematite Fe ₂ O ₃)	0.9	0.2	0.1	95.8	0.2	0.1	0.3	0.4	0.3	0.0	0.1	0.0	0.1	0.3	0.3	0.5	0.1	0.0
	Ilmenite FeTiO ₃	0.3	50.0	0.0	45.3	3.2	0.3	0.2	0.0	0.4	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Rutile TiO ₂	0.4	96.6	0.3	0.5	0.2	0.4	0.2	0.5	0.2	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OTHER	Carbonate (e.g. Calcite CaCO ₃)*	0.6	0.3	0.5	0.5	0.3	1.2	92.9	2.5	0.4	0.5	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Augite ((Si,Al) ₂ O ₆)(Ca,Mg,Fe,Ti,Al) ₂	47.4	0.4	4.8	7.4	0.4	14.4	18.0	1.1	0.9	0.6	0.9	1.9	0.1	0.3	0.2	0.8	0.4	0.0
	Epidote Ca ₂ Al ₂ Fe(O,OH,SiO ₄)Si ₂ O ₇	35.3	0.3	26.4	9.4	0.2	0.2	26.7	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4	0.1	0.0
	Zircon ZrSiO ₄ *	36.6	0.3	3.2	0.6	0.5	2.8	0.2	3.5	0.1	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.8	0.0
	Apatite Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH,Cl,F)*	0.4	0.1	0.4	1.6	0.9	6.9	48.1	4.4	0.8	35.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
*not found in peat																			
MINERAL DIVERSITY OF <i>BULLINULARIA INDICA</i> SHELLS (n=38)		Si	Ti	Al	Fe	Mn	Mg	Ca	Na	K	P	S	Cl	Cr	Ni	Cu	As	Zr	W
Atomic percent (%)																			
QUARTZ	Quartz (SiO ₂)	98.7	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.1	0.0	0.3	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FELDSPARS	Albite NaAlSi ₃ O ₈	60.2	0.0	19.2	0.0	0.0	0.0	0.5	19.5	0.1	0.2	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Oligoclase Na(0.7-0.9)Ca(0.1-0.3)Al(1.1-1.3)Si(2.7-2.9)O ₈	56.7	0.0	22.0	0.2	0.0	0.1	5.0	14.4	0.3	0.9	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Andesine Na(0.5-0.7)Ca(0.3-0.5)Al(1.3-1.5)Si(2.5-2.7)O ₈	55.2	0.0	24.3	0.1	0.0	0.0	7.0	12.4	0.2	0.6	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sanidine (Na,K)AlSi ₃ O ₈	62.2	0.1	18.5	0.3	0.0	0.0	0.5	10.0	7.5	0.6	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Orthoclase KAlSi ₃ O ₈	60.7	0.0	18.0	0.2	0.0	0.0	0.2	0.0	20.2	0.3	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHYLLOSILICATES	Kaolinite Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	56.2	0.1	43.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Muscovite KAl ₂ (AlSi ₃ O ₁₀)(OH,F) ₂	47.2	0.3	33.7	1.0	0.0	1.0	0.4	0.8	13.8	0.7	0.6	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Phengite K(Al,Mg) ₂ (OH) ₂ (Si,Al) ₄ O ₁₀	53.0	0.3	22.2	1.1	0.0	7.4	0.4	0.1	14.0	0.7	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Chlorite (Fe,Mg,Al) ₆ (Si,Al) ₄ O ₁₀ (OH) ₈	30.5	4.8	28.9	28.1	0.0	0.0	1.7	0.8	5.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OXIDES	Fe oxide (e.g. Hematite Fe ₂ O ₃)	1.5	0.1	1.3	90.9	0.0	2.1	0.0	3.1	0.1	0.5	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ilmenite FeTiO ₃	2.6	54.2	1.5	39.2	0.0	0.3	0.6	0.7	0.5	0.1	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Rutile TiO ₂	3.9	92.0	2.7	0.3	0.0	0.3	0.0	0.4	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Altered pyrite (FeS ₂)	7.6	0.0	4.5	60.2	0.0	0.7	1.4	1.2	1.8	0.0	22.2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OTHER	Augite ((Si,Al) ₂ O ₆)(Ca,Mg,Fe,Ti,Al) ₂	49.8	0.2	2.4	6.3	0.0	23.5	16.6	0.5	0.1	0.4	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Titanite CaTiSiO ₅	32.9	29.8	1.9	0.6	0.0	0.7	32.4	1.1	0.0	0.5	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Garnet - Pyrope Mg ₃ Al ₂ (SiO ₄) ₃	30.0	0.1	24.7	12.0	0.0	32.3	0.0	0.2	0.0	0.4	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Garnet - cf Almandine Fe ₃ Al ₂ (SiO ₄) ₃	29.6	0.0	24.5	28.4	0.0	11.5	0.8	1.0	1.9	0.9	0.9	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Garnet - Grossular Ca ₃ Al ₂ (SiO ₄) ₃	37.1	0.1	25.2	9.6	0.0	0.0	28.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

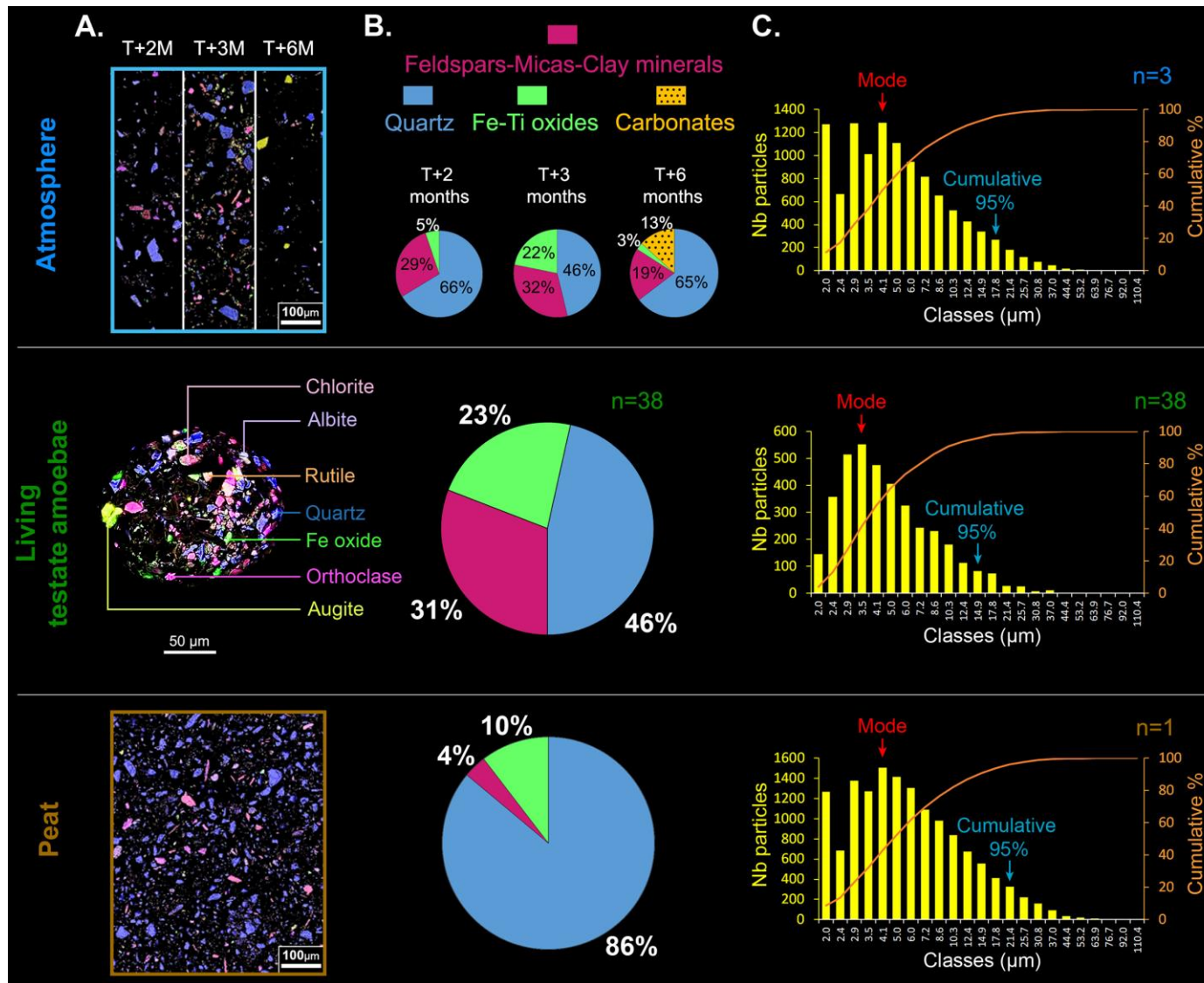


Fig.4: Mineral composition and grain-size distribution of mineral PM deposits (T+2 months, T+3 months, and T+6 months), *B. indica* shells (n = 38) and peat. A. EDS coloured composites of polished resins (atmospheric mineral deposits (n = 3) and peat) and an example of a shell, illustrating the chemical elements (i.e., mineral diversity). B. Pie charts describing the proportions of the four established mineral groups: (1) quartz, (2) FMC minerals, (3) Fe-Ti oxides, and (4) carbonates. C. Bar plots showing the grain-size distribution, with indication of the mode and cumulative 95% values.

2.5 DISCUSSION

2.5.1 Comparing *B. Indica* Shell Content with the Surrounding Environment

The *B. indica* shells contain variable proportions of xenosomes in the form of (1) mineral grains, (2) organic grains, and (3) complete or fragmented siliceous shells of other microorganisms, such as filose testate amoebae or diatoms. These organisms are commonly found in *Sphagnum* peat bogs (Gilbert et al., 2000). The heterogeneity of the PM deposits over time suggests that the nature of mineral particles that deposit in *Sphagnum* depends on the meteorological conditions (intensity and direction of wind and humidity), which bring particles from multiple local or distant sources (Diaz et al., 2014).

Contrary to atmospheric particles, shells and peat do not contain any carbonates, which are the major minerals of peatland surrounding Jurassic rocks (Guillemot et al., 1965). The low pH condition of the peatland, which may trigger carbonate dissolution, is the best hypothesis that explains this inconsistency between the close geologic environment and the samples. The higher resistance of quartz in low pH conditions could explain the relatively poor mineral diversity of the peat, which is mainly composed of quartz. All identified minerals are common, and their small size enables their dissemination over long distances. Determining the origin of particles and their transport distance is thus difficult to precisely define.

Little is known about the duration for shell construction, especially in an *in-situ* context. Schönborn (1992) observed that testate amoebae could make 10 to 100 new generations per year, depending on the environmental parameters (temperature, nutrient availability, and population density). The present study is *in-situ*, which means that the testate amoebae renewal and timeframe of shell construction cannot be controlled. Consequently, to minimise variations of shell grain quantity (between individuals) due to immature shell sampling, all particles analysed in shells were pooled, and proportions were calculated on the overall (38) shells. Our results demonstrate that, from a mineral point of view and on an average of 38 individuals, *B. indica* shells are more similar to atmospheric PM deposits than peat substrate.

2.5.2 *Bullinularia Indica* Grain Selection

It is known that some species of agglutinated foraminifera that recycle mineral grains to construct their shells, such as xenosomic testate amoebae, are able to select grains according to their nature (Armynot du Châtelet et al., 2013a; Makled and Langer, 2010; Mancin et al., 2015) and their size (Armynot du Châtelet et al., 2013a). It is therefore possible that testate amoebae, as foraminifera, developed the ability of grain selection. Our results suggest that *B. indica* are using mainly mineral particles coming from the atmosphere, together with organic material and skeletons of microorganisms found in the close

Sphagnum microhabitat. Moreover, calculated mineral grain sorting is slightly different between testate amoebae and both PM deposits and peat but is better sorted in *B. indica* shells. It suggests a discrete grain-size selection process by *B. indica*. Coarser particles appear not to be selected by *B. indica*, which echoes the observations by Armynot du Châtelet et al. (2013) on *Diffflugia oblonga*, which does not select particles that are coarser than its pseudostome diameter. Then, these coarse particles settle into the peat. This is confirmed by the peat grain size, whose coarse particle proportions are high (5% of particles are bigger than 21.4 μm , in contrast to 14.9 μm in shells). Absence of carbonates could also be explained by a selection process of *B. indica*.

2.5.3 Xenosomic Testate Amoebae Shell Potential as Mineral Background Bioindicator

Delaine et al. (2016a) demonstrated that testate amoebae shells should be an indicator of the presence or absence of cryptotephra, given their ability to use tephra particles to build their shells. In the present study, it appears that *B. indica* can also reflect the mineral background, by using and agglutinating PM deposit particles and organic and/or mineral objects within its reach. Moreover, the sorting values suggest that *B. indica* operates a discrete grain-size selection process when building its shell. Our results also confirm the observations of Armynot du Châtelet et al. (2015), which showed that testate amoebae select particles according to their size from those available within their immediate environment.

In our study site, located far away from atmospheric pollution sources, no particles clearly originating from anthropogenic pollution were found in the analysed testate amoebae shells. In contrast, Fiałkiewicz-Kozieł et al. (2015), in a very polluted area, observed a recycling of some polluted particles resulting from brown coal combustion in testate amoebae shells. As a consequence, this supports the fact that the bog of Frambouhans-Les Ecorces is located in a zone that is not or is only slightly affected by air pollution. Results brought by this study highlight the close relation between xenogenous testate amoebae and their natural atmospheric influences. This is a key point, which is necessary to understand to accurately interpret shell content under heavy anthropogenic influences.

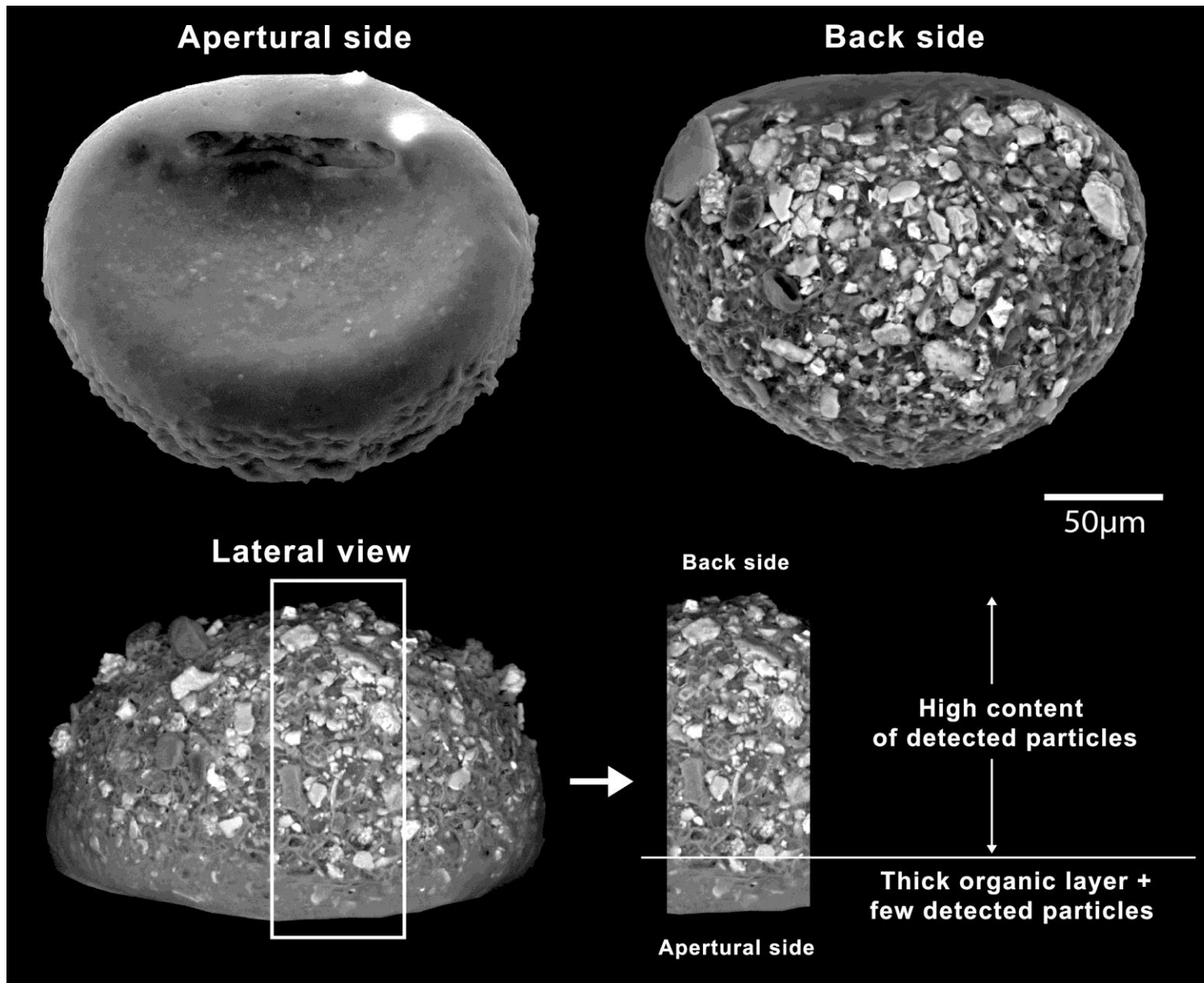
2.6 CONCLUSION

The present study demonstrates that in *Sphagnum*, *B. indica* shell content is highly diversified with multiple mineral, organic, and biologic grain natures. Additionally, there are similarities between mineral diversity and grain size of atmospheric PM deposits and *B. indica* shells. Indeed, we observed that (1) shells of *B. indica* are built from recycled mineral and organic grains available in *Sphagnum* (which confirms their mechanism of xenosome

recycling), (2) mineral diversity and the size of the particles used by *B. indica* match those of mineral PM deposits, and (3) a discrete selection of particles depending on grain size is operated by *B. indica*, whose shell particles are better sorted. The peat substratum is mineralogically different from the shells and PM deposits, probably because of low pH conditions, which contribute to reducing the mineral diversity. These conclusions bring additional insight for using testate amoebae shells as bioindicators of environmental conditions. However, little is known about particle selection processes operated by testate amoebae, and this must be investigated before attempting accurate environmental reconstructions based on testate amoebae shell content analyses.

2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

This research is a contribution to the μ POL-AIR project and Université de Franche-Comté PhD grant. The μ POL-AIR project is supported by the PRIMEQUAL programme (supported by the French Ministry of Environment and ADEME (2010-Q-3-Chorus2100082984)). We also thank François Guillot for his technical help and Espace Naturel Comtois for having facilitated field work on the bog in Frambouhans-Les Ecorces.



Supplementary Material 1: SEC and BSE pictures describing the significance of the position of the back side of the shell (richer in detectable grains) that face the electron beam.

**Chapitre 4 - Incorporation de
particules minérales allochtones
dans les thèques de *Bullinularia
indica***



1 PRÉAMBULE

Les résultats du chapitre 3 ont mis en évidence que l'espèce xénosomique *Bullinularia indica* construit sa thèque à l'aide d'une grande variété de grains minéraux, organiques et biologiques. De plus, les grains minéraux incorporés aux thèques ont une taille et une nature proche des dépôts particuliers atmosphériques.

L'objectif général de ce présent chapitre est de tester l'effet d'un apport de différents grains minéraux non présents initialement dans une tourbière à sphaignes sur la composition des thèques de *B. indica*. Il s'agit en particulier 1/ de déterminer si les amibes utilisent préférentiellement certains types de particules minérales pour construire leur thèque et 2/ d'évaluer la dynamique d'intégration dans les thèques des différents types de particules au cours du temps en fonction de deux concentrations en particules.

Les résultats de cette expérience menée *in situ* indiquent que *Bullinularia indica* est capable d'intégrer des particules minérales allochtones issues de dépôts artificiels. Cette espèce sélectionne préférentiellement les minéraux riches en silice, tels que le talc, l'anthophyllite et la trémolite, au détriment des chlorites et des chloritoides. Elle n'utilise pas de phlogopite, minéral contenant simultanément des proportions significatives de potassium et de magnésium. La quantité de particules minérales déposées artificiellement influence grandement la dynamique d'intégration. La proportion de thèques utilisant ces particules allochtones peut atteindre 92% dans le cas de forts apports de particules minérales pour lesquels *B. indica* présente une affinité (e.g. talc). Cette démonstration des capacités de sélection de particules minérales par *B. indica* ouvre un champ de réflexion sur les mécanismes de tactisme permettant cette sélection (e.g. chimiotactisme), mais permet aussi d'entrevoir le potentiel de bio-indication des thèques d'amibes xénosomiques, notamment dans le cadre d'études en paléoécologie.

2 CASSE-TÊTE MINÉRAL CHEZ LES AMIBES À THÈQUE XÉNOSOMIQUES : ANALYSE DE LA CAPACITÉ DES AMIBES À SÉLECTIONNER LA NATURE DES GRAINS MINÉRAUX POUR CONSTRUIRE LEUR THÈQUE EN UTILISANT DES APPORTS DE DIFFÉRENTS TYPES DE PARTICULES ALLOCHTONES

Maxence Delaine^{a,b*}, Nadine Bernard^{a,c}, Daniel Gilbert^a, François Guillot^b, Philippe Recourt^b, Eric Armynot du Châtelet^b

^aLaboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

^bUniversité de Lille, UMR LOG 8187 CNRS, ULCO Laboratoire d'Océanologie et Géosciences, Bâtiment SN5, 59655 Villeneuve-d'Ascq, France

^cLaboratoire THÉMA, UMR 6049, CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, 32 rue Mégevand, 25030 Besançon Cedex, France

*Auteur correspondant, adresse e-mail : maxence.delaine@gmx.fr

Mots-clés : Arcellinida, composition des thèques, sélection des particules, amibes à thèques, tourbières à sphaignes

2.1 RÉSUMÉ

Les résultats de Delaine et al. (2016 (in revision)) posent la question de la sélection préférentielle des grains par *B. indica* en fonction de leur constitution chimique. L'objectif général de cette étude est de tester l'effet d'un apport de différents grains minéraux non présents initialement dans une tourbière à sphaignes (Delaine et al., 2016 (in revision)) sur la composition des thèques de *B. indica*. Le but de cette expérience est de déterminer si les amibes utilisent préférentiellement certains types de particules minérales pour construire leur thèque et d'évaluer la dynamique d'intégration dans les thèques des différents types de particules au cours du temps en fonction de deux concentrations en particules. Les résultats de la présente étude mettent en évidence que non seulement *Bullinularia indica* est capable d'intégrer des particules minérales déposées de manière artificielle dans son écosystème, mais aussi qu'elle est capable d'effectuer une sélection parmi les grains minéraux mis à sa disposition, en fonction de leur nature minéralogique. Elle utilise plus fréquemment les minéraux riches en silice. La quantité de particules déposées artificiellement et mises à la disposition des individus de *B. indica* a une incidence sur leur dynamique d'intégration, et donc sur la composition minéralogique des thèques. Dans des conditions de forts apports de particules allochtones, jusqu'à 92% des thèques analysées contiennent des particules provenant des dépôts artificiels. Les conclusions de l'étude ouvrent un champ de réflexion sur les mécanismes de tactisme permettant cette sélection (e.g. chimiotactisme), mais permettent aussi d'entrevoir le potentiel de bio-indication des thèques d'amibes xénosomiques, notamment dans le cadre d'études en paléoécologie.

2.2 INTRODUCTION

Les amibes à thèque sont des micro-organismes unicellulaires ubiquistes qui se développent dans l'ensemble des milieux terrestres humides, tels que les sols, les sédiments lacustres ou les mousses (Wall et al., 2010 ; Patterson et al., 2015 ; Fernandez et al., 2016). Elles représentent également le groupe de prédateurs dominant parmi les communautés de micro-organismes des sphaignes (Charman 1997 ; Bobrov et al., 2002 ; Mitchell et al., 2008). Leur caractéristique principale est leur capacité à construire une coquille qui va servir d'enveloppe protectrice à la cellule. Ces enveloppes, appelées thèques, ont des formes, des tailles et des compositions très variées. Si certaines amibes synthétisent leur thèque, d'autres espèces dites « xénosomiques », la construisent en agglutinant des particules minérales, organiques ou biominérales prélevées dans leur environnement immédiat (Ogden and Hedley, 1980 ; Meisterfeld, 2002 ; Armynot et al., 2015 ; Delaine et al., 2016 (in revision)).

Depuis quelques années, la nature et la taille des particules minérales utilisés par ces amibes sont de plus en plus étudiées, l'un des objectifs étant à terme de pouvoir estimer le potentiel de bio-indication de la qualité des milieux en utilisant les thèques d'amibes comme proxy (Armynot et al., 2010 ; 2013c, 2015 ; Delaine et al., 2016). Ces études montrent notamment que la diversité minérale des grains utilisés a été largement sous-estimée. Il apparaît que la nature des grains semble relativement variable et qu'elle est liée aux apports particuliers atmosphériques et au contexte géologique local (Armynot et al., 2015, Delaine et al., 2016). La taille des grains minéraux utilisés étant plus difficile à estimer, peu d'études ont été consacrées à ce sujet. Armynot du Châtelet et al. (2010) en milieu lacustre, et Delaine et al. (2016 (in revision)) en tourbière, ont cependant pu montrer que les grains utilisés sont, pour l'essentiel, de petite taille (entre 1 et 15 μm). De plus, ces études ont mis en évidence que, quelle que soit la nature des grains, recyclés ou sécrétés, leur taille est le facteur qui influence le plus leur distribution dans les différentes parties de la thèque (Armynot du Châtelet et al., 2013c ; Chatelain et al., 2013).

Dans une tourbière à sphaignes, Delaine et al. (2016 (in revision)), ont montré que l'espèce xénosomique *Bullinularia indica* construit sa thèque en recyclant des grains minéraux, organiques et des biominéraux piégés dans la partie supérieure de *Sphagnum capillifolium*, et que la large diversité minérale déterminée dans les thèques se rapproche principalement de celle provenant du dépôt de particules d'origine atmosphérique. En revanche, la composition minérale de la thèque est différente de celle que l'on retrouve dans la tourbe. Par ailleurs, certains minéraux comme les carbonates, pourtant présents dans les dépôts atmosphériques, n'ont pas été détectés dans les thèques. Ce dernier résultat pose la question de la sélection préférentielle des grains par *B. indica* en fonction de leur constitution chimique.

Dans ce contexte, l'objectif général de cette étude est de tester l'effet d'un apport de différents grains minéraux non présents initialement dans une tourbière à sphaignes (Delaine et al., 2016 (in revision)) sur la composition des thèques de *B. indica*. Il s'agit en particulier 1/ de déterminer si les amibes utilisent préférentiellement certains types de particules minérales pour construire leur thèque et 2/ d'évaluer la dynamique d'intégration dans les thèques des différents types de particules au cours du temps en fonction de deux concentrations en particules.

2.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.3.1 Site de l'étude

L'étude a été menée dans la tourbière à sphaignes de Frambouhans-Les Ecorces, située dans les montagnes du Jura (Nord-Est de la France, coordonnées WGS84 : 47°10'44.66"N, 6°47'23.87"E, altitude de 867m). Cette tourbière, d'une surface de 27 hectares, est située dans un environnement géologique composé de roches carbonatées d'âge Jurassique (-203 à -145Ma, Guillemot et al., 1965). Cette tourbière a été sélectionnée en raison de sa nature ombrotrophe, de la présence de tapis de *Sphagnum capillifolium* (une espèce ectohydrique), et de son éloignement des sources fixes et mobiles de pollution particulaire atmosphérique. Il s'agit d'un milieu naturel situé en zone rurale, éloigné (>25km) des systèmes fortement anthropisés (villes, petites industries et axes routiers) qui peuvent affecter le développement naturel du matériel étudié (Bortoluzzi et al., 2006 ; Artz et al., 2008).

2.3.2 Choix des minéraux et préparation des particules minérales

Le choix des minéraux, pour confectionner les lots de particules minérales à apporter, a reposé sur leur absence i/ dans l'environnement de ce site d'étude lors d'observations préalables, ii/ et dans les thèques de *B. indica* provenant de cette tourbière (Delaine et al., 2016 (in revision)). La préparation des particules minérales a consisté en un microbroyage suivi d'une filtration en voie humide pour éliminer les particules minérales de plus grande taille. Le diamètre final recherché devait être inférieur à 15 µm, c'est-à-dire de la taille la plus proche possible de celle des particules incorporées naturellement par les amibes (Delaine et al. 2016 (in revision)). Une analyse de contrôle au granulomètre laser a validé qu'au moins 50% des particules minérales étaient effectivement composées d'éléments inférieurs à 15µm (Matériel supplémentaire 1).

2.3.3 Apports artificiels de particules et prélèvements de sphaigne

En Avril 2014, une surface de 300m² a été choisie dans une zone riche en tapis homogènes de *S. capillifolium*. Trente-six anneaux de 137cm² ont été mis en place sur des buttes de *S. capillifolium* (Matériel supplémentaire 2). Des apports successifs par voie humide en pulvérisant une solution d'eau distillée contenant les particules minérales ont été réalisés à l'intérieur de chacun de ces anneaux. Les particules minérales déposés artificiellement étaient constituées de différents minéraux (Matériel supplémentaire 3) : du clinocllore, une variété de chlorite magnésienne et des chloritoides de type « sismondine » (riche en magnésium, lot n°1), du talc (lot n°2), de la phlogopite (lot n°3), de l'anthophyllite, de la trémolite, du talc et de la vermiculite (lot n°4) et d'un mélange de particules composé des 4 lots de minéraux précédents en proportion égale (4x25%, lot n°5). Trois répliques pour chaque concentration et pour chaque lot (n=3x2) ont été apportés : une faible concentration (1.14mg

soit l'équivalent d' $1\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{an}^{-1}$) et une forte concentration de particules (11.4mg soit l'équivalent de $10\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{an}^{-1}$). Le choix des deux concentrations de particules apportées dans le cadre de cette expérience est basé sur les travaux de Le Roux et al. (2012), qui ont évalué que le dépôt particulaire atmosphérique de l'étang de la Gruère (Suisse, situé à moins de 20km de la tourbière de Frambouhans-Les Ecorces) varie entre $0.1\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{an}^{-1}$ et $5\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{an}^{-1}$. Les particules minérales provenant de ces différents lots et retrouvées dans les thèques sont appelées « particules traçantes » dans les résultats. Les dépôts de particules ont été effectués le premier jour de l'expérience (T0), puis à 27 jours (T+1 mois), 58 jours (T+2 mois) et 125 jours (T+4 mois). Six anneaux n'ont reçu aucun apport particulaire artificiel pour pouvoir disposer de répliques témoins. Chacun des anneaux a été affecté de façon aléatoire à l'un ou l'autre des traitements et des concentrations. Des prélèvements de capitula (0-3 cm) de *S. capillifolium* contenant des individus de *Bullinularia indica* ont été effectués avant chaque dépôt de particules le jour du début de l'expérience, puis à T+1 mois, T+2 mois, T+4 mois, 182 jours (T+6 mois) et 466 jours (T+15 mois). Les capitula et les amibes associées ont ensuite été fixés dans une solution à 2,5% de glutaraldéhyde immédiatement après le prélèvement.

2.3.4 Traitement des sphaignes et des thèques

Les brins de *Sphagnum capillifolium* ont été lavés 3 fois à l'eau distillée (3x300mL) et pressés à la main pour en extraire les amibes à thèque. L'eau chargée en thèques d'amibes a été filtrée avec un tamis de maille $315\mu\text{m}$ pour séparer les thèques des résidus organiques (e.g. débris et particules grossières). Le résidu a ensuite été concentré par décantation. Pour chaque échantillon, 5 individus de *Bullinularia indica* ont été identifiés à l'aide d'un microscope stéréoscopique Olympus SZX16 (grossissement maximal de x115). L'identification de *B. indica* est basée sur les caractéristiques morphologiques de la thèque, détaillées dans Ogden et Hedley (1980), Clarke (2003) et Meisterfeld (2008). Certains échantillons comportaient moins de 5 individus de *B. indica* (de 0 à 4), dans ce cas tous les individus disponibles ont été utilisés. Sur les 36 prélèvements effectués 6 fois au cours des 15 mois d'expérience (soit 36×6 prélèvements = 216 prélèvements), un total de 840 thèques (entre 149 et 174 thèques extraites par campagne de prélèvement, Matériel supplémentaire 4) de *B.indica* a été extrait à l'aide d'un pinceau très fin, et positionné sur des plots supports pour microscope électronique à balayage (MEB) recouverts d'une pastille de carbone. Trente-huit thèques témoins des conditions de pré-expérience ont été prélevées à T0, avant dépôts artificiels de particules. Les thèques ont été positionnées de telle sorte que la face dorsale de *B.indica*, plus riche en particules, soit exposée au faisceau d'électrons du MEB (cf 'Supplementary material 1' dans Delaine et al 2016 (in revision)).

2.3.5 Analyse des thèques

Les images des 840 thèques de *Bullinularia indica* ont été obtenues à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) FEI Quanta 200 équipé d'un détecteur EDX (Energy Dispersive X-Ray Spectrometer, ou EDS). Plusieurs types d'images ont été employés, en utilisant soit le signal en électrons secondaires (SEC) soit le signal en électrons rétrodiffusés (BSE).

2.3.6 Analyse des particules minérales et traçage des particules déposées

Le MEB-EDS est utilisé pour effectuer des analyses élémentaires qualitatives et quantitatives afin d'identifier les minéraux composant les thèques (détail de la procédure dans Armynot du Châtelet et al., 2013b). Pour l'analyse élémentaire qualitative, 15 éléments sont recherchés : Al, Ca, Cl, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, S, Si, et Ti. Un code couleur est utilisé pour afficher simultanément chaque élément chimique sur une cartographie élémentaire composite. Chaque minéral composant les lots de minéraux a été identifié à l'aide d'un total de 44 points d'analyse EDS. Pour chaque minéral composant les particules déposées, une composition élémentaire moyenne (n=1 à 15 selon le nombre de points d'analyses disponibles par minéral) a été calculée afin de servir de référence utilisée pour le traçage des particules (Matériel supplémentaire 3). Pour la recherche des minéraux « traçants » (minéraux référencés présents dans les poudres et absents de l'environnement naturel) dans les thèques, un total de 3682 points d'analyse EDS ont été réalisés au cours de cette expérience. Pour chaque thèque, la totalité des points correspondant aux grains minéraux potentiellement traçants ont été analysés. Ces minéraux sont ceux dont la couleur virtuelle (i.e. la chimie élémentaire, cf. code couleur attribué sur les images composites) se rapproche des couleurs virtuelles observées pour les minéraux traçants recherchés. Ces particules minérales traçantes ont différentes formes qui peuvent elles aussi aider à leur reconnaissance. Ainsi, les particules de clinocllore et de chloritoides ont une forme pseudo-sphérique, tandis que le talc et l'anthophyllite ont un habitus lamellaire et que la trémolite se présente sous la forme de bâtonnets.

2.4 RÉSULTATS

2.4.1 Capacité de *B. indica* à intégrer des particules minérales allochtones

Les particules minérales des lots n°1, 2, 3 et 4 possèdent une composition minéralogique et des formes variées (Fig.1A). Parmi ces premiers 4 lots pulvérisés sur les sphaignes, des particules minérales provenant des lots n°1, 2 et 4 ont été observées dans les thèques de *B. indica* (Fig.1B). Ces particules observées dans les thèques sont reconnues grâce à leur

signature chimique mais aussi à leur forme (Fig.1A-B), similaire à celle des particules apportées artificiellement.

Parmi un total de 840 thèques analysées, 167 contiennent des particules traçantes provenant des lots déposés. Le nombre total de particules traçantes observées (tous lots confondus) dans ces thèques est de 585 (Matériel supplémentaire 4). Le nombre de particules traçantes contenues par thèque augmente durant les 6 premiers mois de l'expérience pour atteindre un maximum de 43 particules par thèque (Matériel supplémentaire 4), puis diminue à 29 particules après 15 mois d'expérience et donc 11 mois après la dernière pulvérisation.

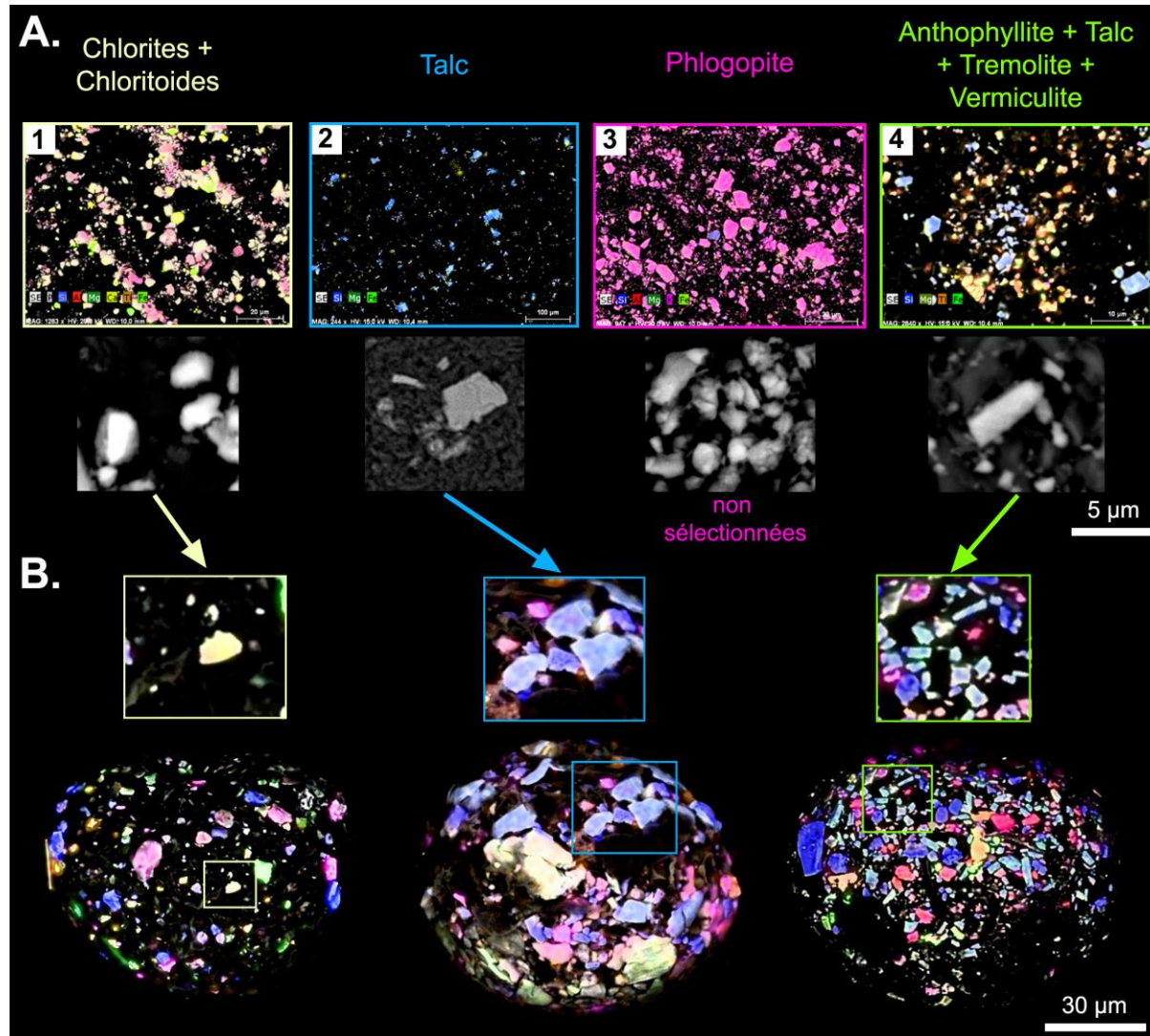


Fig.1 – Correspondance entre les minéraux traçants contenus dans les poudres et ceux intégrés dans les thèques de *Bullinularia indica*. A. Images composites EDS des lots de particules n°1, 2, 3 et 4 et illustrations des aspects morphologiques des minéraux dominants : après préparation par micro-broyage, les chlorites et chloritoides (A1) ont une forme pseudo-sphérique, le talc (A2) et la phlogopite (A3) se présentent en paillettes et la trémolite (A4) se présente sous la forme de bâtonnets. B. Images composites EDS de 3 thèques d'individus de *Bullinularia indica* ayant intégré des minéraux traçants. La phlogopite du lot n°3 n'est pas utilisée.

2.4.2 Variation de l'intégration des particules minérales en fonction de leur nature

Le lot n°5, correspondant au mélange équivalent des lots n°1, 2, 3 et 4 (i.e. de la totalité des minéraux traçants), a été utilisé pour évaluer les variations d'intégration en fonction de la nature des particules (Fig.2).

Sous influence artificielle d'apports particuliers en faible concentration (Fig.2A), le talc est le minéral traçant observé le plus fréquemment dans les thèques. Il constitue à lui seul 45% des minéraux traçants observés dans *B. indica*. Puis, c'est l'anthophyllite qui est le minéral le plus utilisé. La trémolite, le clinochlore et les chloritoides sont moins fréquemment utilisés dans les thèques. Aucune particule de phlogopite ou de vermiculite n'a été retrouvée dans les thèques soumises aux faibles apports particuliers artificiels (Fig.2A).

Les résultats obtenus avec les apports de particules en forte concentration sont proches de ceux observés pour les faibles concentrations (Fig.2B). Le talc constitue 59% des particules traçantes observées, puis c'est l'anthophyllite et la trémolite, (respectivement 21% et 9%). En revanche, les particules traçantes de chloritoides et de clinochlore sont encore moins représentées qu'en condition de dépôts en faible concentration, avec respectivement à 6% et 5% des particules traçantes observées. Comme pour les dépôts particuliers artificiels en faible concentration, la phlogopite et la vermiculite ne sont pas observées dans les thèques analysées.

2.4.3 Influence de la quantité de particules minérales déposées sur leur dynamique d'intégration dans les thèques

Les concentrations des dépôts des particules minérales des lots n°1, 2, 4 et 5, influencent leur dynamique d'intégration par *B. indica* (Fig.3).

Dans le cas du dépôt du lot n°1 (chloritoides et clinochlore), le nombre de particules traçantes détectées dans les thèques est toujours supérieur pour les amibes soumises à la forte concentration particulière (Fig.3A). En moyenne, 28% des thèques comportent au moins une particule traçante avec des apports à forte concentration, contre 9% de thèques pour les apports en faible concentration. Jusqu'à 12 particules traçantes sont retrouvées dans les thèques analysées à T+4 mois, contre un maximum de 4 particules traçantes retrouvées dans les thèques soumises à une faible concentration, à T+15 mois (Fig.3A, Matériel supplémentaire 4). La proportion d'amibes ayant incorporé des particules traçantes varie entre 15% (T+15 mois) et 47% (T+4 mois) pour les amibes avec des apports à forte concentration, contre un maximum de 20% (T+15 mois) pour des apports en faibles concentration.

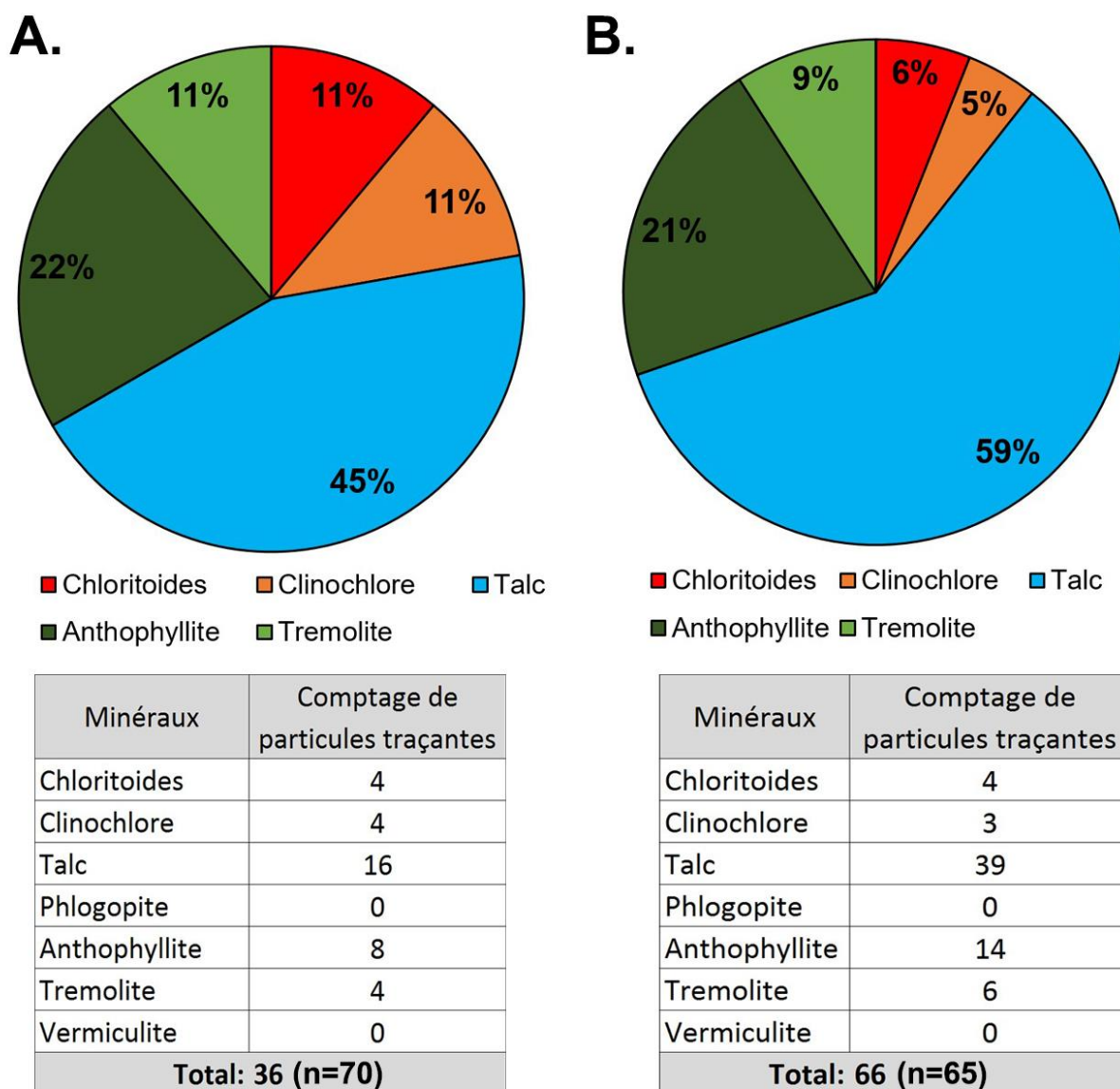


Fig.2 – Diagrammes en secteurs des proportions de minéraux traçants comptés et analysés dans les thèques soumises à un dépôt de particules allochtones du lot n°5 (mélange des 4 lots 1, 2, 3 et 4) avec une faible concentration de particules (diagramme A) et une forte concentration de particules (diagramme B). Le nombre de grains par minéraux et le nombre de thèques contenant des particules traçantes "n" est précisé pour chaque concentration.

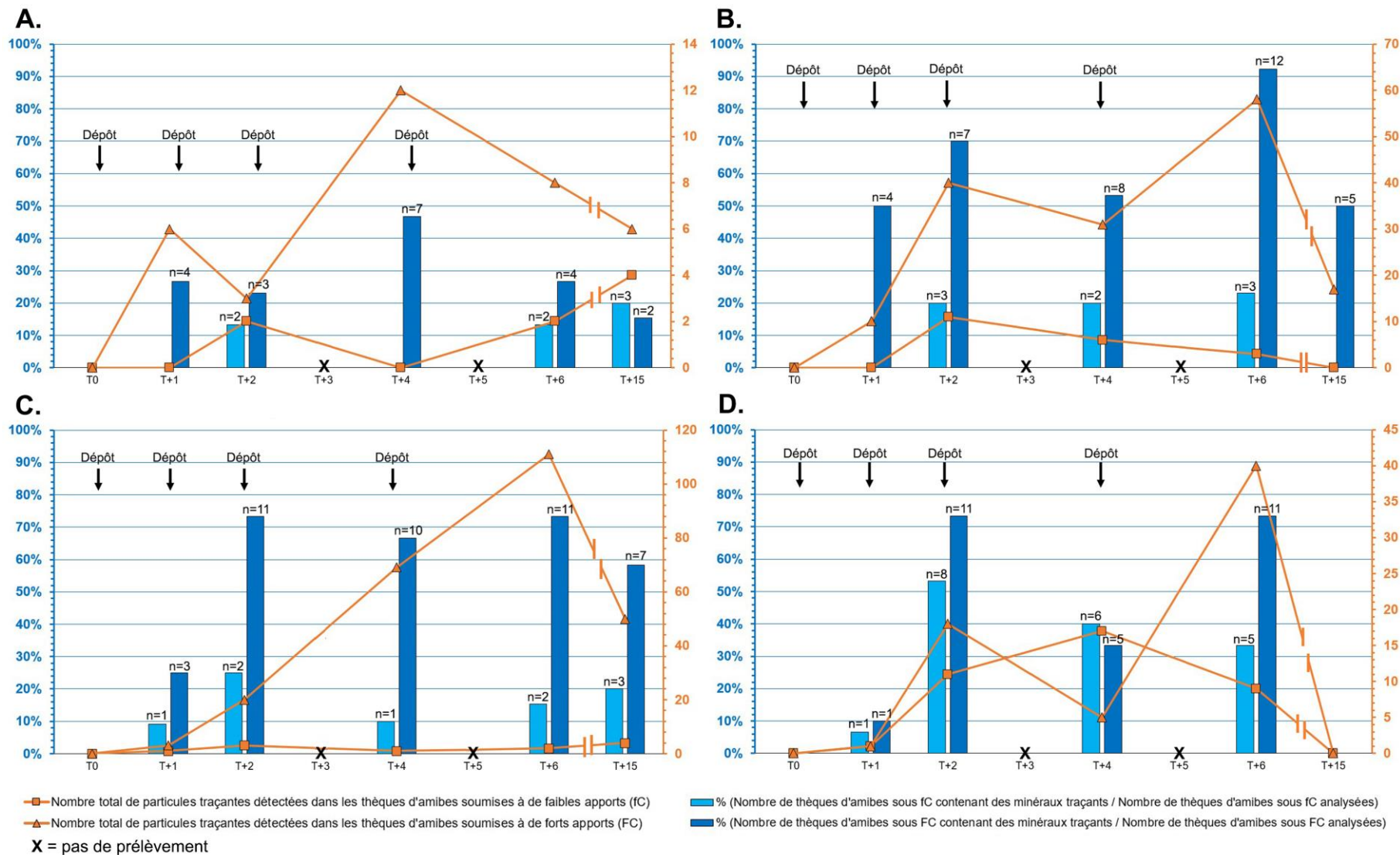


Fig.3 – Evolution au cours de l'expérience i/ du nombre total de particules traçantes observées dans les thèques soumises à de faibles apports allochtones de particules (carrés oranges) et forts apports allochtones de particules (triangles oranges) et ii/ de la proportion du nombre de thèques contenant des minéraux traçants par rapport au nombre total de thèques analysées (histogrammes en bleu clair : amibes soumises à de faibles apports; histogrammes en bleu foncé : amibes soumises à de forts apports). A, B C et D présentent les résultats pour les apports des lots n°1, 2, 4 et 5 respectivement.

Pour le dépôt lot n°2 (talc), la proportion d'amibes ayant incorporé des particules traçantes varie entre 50 et 92% pour les amibes soumises à des apports en forte concentration, contre 0 à 23% pour les apports en faible concentration. En moyenne, ces valeurs sont 5 fois plus élevées pour les apports en forte concentration.

Les résultats obtenus pour les dépôts du lot n°4 sont similaires avec en moyenne 3,7 fois plus de particules traçantes intégrées par les amibes soumises à des apports en forte concentration (59% contre 16%). De plus, le nombre de particules traçantes trouvées dans les thèques soumis à des apports en forte concentration est très nettement plus élevé (jusqu'à 111 particules contre 1 et 4 particules, Fig.3C, Matériel supplémentaire 4).

En revanche, les différences observées entre les deux niveaux d'apports de particules sont beaucoup moins marquées pour les échantillons du lot n°5 dont les apports sont constitués d'un mélange des particules des autres lots. Ainsi, en moyenne 38% (contre 27%) des amibes ont intégré des particules traçantes avec des apports en forte concentration. (Fig.3D).

2.5 DISCUSSION

2.5.1 Hétérogénéité de la composition minéralogique des lots

Contrairement aux lots n° 2 et 3, les lots n°1 et 4 contiennent plusieurs phases minérales. Cette hétérogénéité était initialement non prévue, mais a été observée à la suite du microbroyage des particules grossières de trémolite et de chloritoides, qui avait été préalablement triées à l'aide d'un séparateur magnétique (Frantz Isodynamic Magnetic Separator). Les particules grossières, de plusieurs centaines de μm , ont révélé leur hétérogénéité minérale après le microbroyage, qui a fait apparaître la présence de minéraux secondaires tels que l'anthophyllite, le talc, la vermiculite et le clinocllore. Les chloritoides et la trémolite, minéraux formés par l'altération des pyroxènes (La Tour et al., 1980, Delvigne, 1983), sont fréquemment associés à ces minéraux secondaires (Jayaraman, 1940 ; Paulick et al., 2001). Une paragenèse entre la trémolite, l'anthophyllite et le talc est donc envisageable. Réduites à une taille micrométrique, la purification par séparation magnétique des lots n°1 et 4 était trop complexe à mettre en œuvre. Cependant, comme l'ensemble de ces minéraux n'étaient pas présents dans les thèques en conditions naturelles, et qu'ils pouvaient donc constituer de bons traceurs, il a été décidé de conserver ces lots.

2.5.2 Absence d'intégration de phlogopite

Pendant les six premiers mois de l'expérience, la phlogopite a été apportée en grande quantité (au total l'équivalent d'un apport de $40\text{g/m}^2/\text{an}$), soit 8 fois la quantité particulière

totale maximale mesurée par Le Roux et al. (2012) dans le proche étang de la Gruère (Suisse). Le mode opératoire pour tous les lots de particules minérales étant identique, il est peu probable que ces apports consécutifs de milliers de particules n'aient pas, comme pour les autres minéraux, rendu possible leur mise en contact avec les amibes. Trois hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette absence d'utilisation de phlogopite : (1) la plus probable reste la détection chimique de la nature de la particule par chimiotactisme entraînant la non-sélection de la particule. Cette hypothèse fait écho aux observations de Delaine et al. (2016 (in revision)), qui, parmi la diversité minérale observée dans les thèques à l'état naturel, montre qu'aucun minéral contenant une association de potassium et de magnésium (comme la phlogopite ou la biotite) n'est présent dans les thèques de *B. indica*. (2) La seconde hypothèse, repose sur le comportement métastable de la phlogopite dans un milieu soumis à l'altération, comme les tourbières acides (Lin & Clemency, 1981). Cependant, cette hypothèse peut difficilement être retenue car il faudrait placer le minéral à une température de 50 à 100°C dans de l'acide chlorhydrique pour dissoudre complètement la phlogopite en 20 à 30 jours (Kuwahara & Aoki, 1995), ce qui est très éloigné des conditions du milieu d'étude. (3) Une faible altération de la surface pourrait être un facteur limitant pour l'utilisation du grain minéral comme cela a déjà pu l'être constaté avec les carbonates chez des amibes à thèque lacustres (Armynot du Châtelet et al., 2010).

2.5.3 Affinité pour les minéraux riches en silice et tactisme

Le talc, l'anthophyllite et la trémolite sont des silicates riches en silice et en magnésium (Matériel supplémentaire 3). Or, on sait que les minéraux dominants dans les amibes à thèques xénosomiques sont les silicates cristallisés (Armynot du Châtelet et al., 2010, 2015 ; Delaine et al., 2016 (in revision)), ou amorphes comme des verres volcaniques (Delaine et al., 2016). La récurrence du choix de particules à teneur en silice élevée et l'absence d'utilisation de certains minéraux comme la phlogopite (contenant à la fois du potassium et du magnésium) renforce l'hypothèse d'une possible capacité des amibes à identifier la nature des grains minéraux par chimiotactisme. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que les particules de phlogopite et de talc ont une forme très similaire.

2.5.4 Influence de la quantité de l'apport particulaire artificiel sur la dynamique d'intégration des particules

Dans les conditions *in-situ*, l'apport particulaire artificiel s'ajoute à l'apport particulaire de l'environnement. Celui-ci reste cependant difficile à évaluer tant quantitativement que qualitativement (Le Roux et al., 2012). Cette difficulté pour cerner l'amplitude maximale des dépôts particulaires naturels nous a amené à choisir un écart de concentrations important.

Les résultats obtenus montrent que la quantité de particules déposées artificiellement influence la composition des thèques nouvellement formées. Cependant, l'utilisation de solutions fortement enrichies en particules ne se traduit pas par une augmentation proportionnelle des particules intégrées. De plus, des différences importantes sont observées entre particules de différentes natures. Ainsi, l'apport de 10 fois plus de particules se traduit par une augmentation de 1,5 à 5 du nombre de thèque comportant des particules traçantes, en fonction des particules utilisées. Ces différences pourraient s'expliquer par des variations de disponibilité du minéral dans la matrice de sphaignes. Par exemple, un minéral moins adhérent aux sphaignes sera plus sensible au lessivage par les eaux pluviales. Cette hypothèse pourrait également être une raison expliquant l'intégration plus importante par les amibes des particules de talc, dont la forme en paillette, avec une grande surface de contact, pourrait favoriser une meilleure adhésion aux tissus des sphaignes.

2.5.5 Implications dans l'usage de la composition des thèques en bio-indication

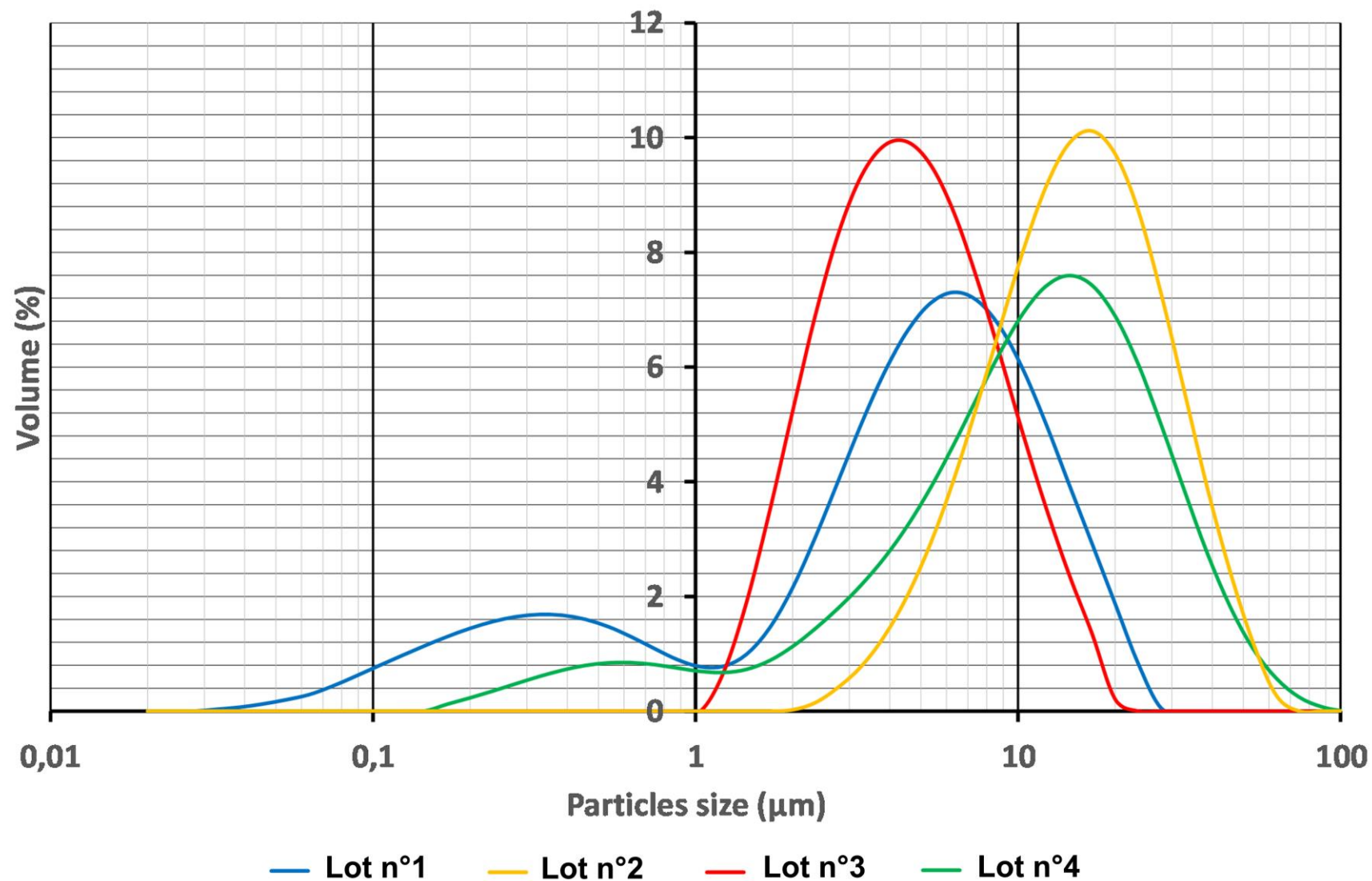
Les résultats de cette étude mettent en évidence que l'espèce xénosomique *Bullinularia indica* est capable de sélectionner les particules minérales qu'elle utilise pour la construction de sa thèque en fonction de leur nature. Cette sélection avait déjà été envisagée, sans pouvoir la confirmer, dans de précédentes études (Armynot du Châtelet et al., 2010 ; Delaine et al., 2016 & 2016 (in revision)). Des travaux récents ont également montré que la composition des thèques pouvait être utilisée comme des bio-indicateur de l'apport minéral naturel (Armynot et al., 2015, Delaine et al., 2016 (in revision)) ou plus exceptionnel (Delaine et al., 2016) influençant la composition particulaire du milieu de vie des amibes à thèques. Les proportions élevées d'amibes ayant intégré des particules traçantes dans les conditions de forte concentration (jusqu'à 92%), montrent que sous l'effet une pluie particulaire continue, les amibes intègrent rapidement les particules, dans des proportions variables selon leur nature. Ces observations soulignent la capacité des amibes à thèques xénosomiques à intégrer les particules minérales d'origine atmosphérique, et leur intérêt potentiel dans le suivi des flux particulaires. Cependant, les résultats obtenus montrent que ce potentiel de bio-indication est plus ou moins pertinent en fonction de la nature des particules apportés à la surface de la tourbière.

2.6 CONCLUSION

1. *Bullinularia indica*, une amibe à thèque xénosomique, est capable d'intégrer des particules minérales déposées de manière artificielle dans son écosystème.
2. *Bullinularia indica* est capable d'effectuer une sélection parmi les grains minéraux mis à sa disposition, en fonction de leur nature minéralogique.

3. Parmi les minéraux (naturellement absents dans son environnement) testés, elle utilise plus fréquemment des minéraux riches en silice tels que le talc et l'anthophyllite, mais également de la trémolite. Dans une moindre mesure, elle utilise des chlorites et des chloritoides. En revanche, elle n'utilise pas de phlogopite, un minéral contenant des proportions significatives de potassium et de magnésium.
4. La quantité de particules déposées artificiellement et mises à la disposition des individus de *B. indica* a une incidence sur leur dynamique d'intégration, et donc sur la composition minéralogique des thèques.
5. Dans des conditions de forts apports de particules allochtones, les proportions d'amibes contenant des particules traçantes sont élevées, et peuvent aller jusqu'à 92% des thèques d'amibes analysées.

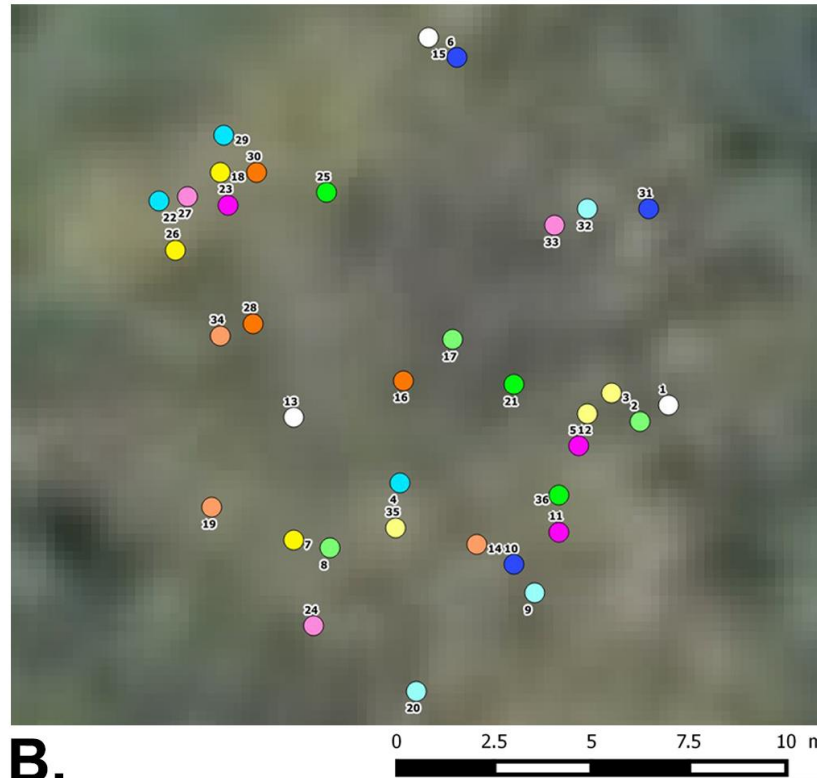
Cette démonstration des capacités de sélection de particules minérales par *B. indica* ouvre à la fois un champ de réflexion sur les mécanismes de tactisme permettant cette sélection (e.g. chimiotactisme), mais permet aussi d'entrevoir le potentiel de bio-indication des thèques d'amibes xénosomiques, notamment dans le cadre d'études en paléoécologie.



Matériel supplémentaire 1 – Distributions granulométriques de la proportion de particules (axe Y) en fonction de leur taille (axe X, échelle log), pour chaque lot (1 en bleu, 2 en jaune, 3 en rouge et 4 en vert). Chaque lot contient au moins 50% de particules inférieures à 15µm. Le lot contenant les particules les plus grossières est le lot n°2, composé de particules de talc.



A.



B.

- ● Témoins
- Lot n°1 - faible concentration
- Lot n°1 - forte concentration
- Lot n°2 - faible concentration
- Lot n°2 - forte concentration
- Lot n°3 - faible concentration
- Lot n°3 - forte concentration
- Lot n°4 - faible concentration
- Lot n°4 - forte concentration
- Lot n°5 - faible concentration
- Lot n°5 - forte concentration

Matériel supplémentaire 2 – A. Photo d'un des 36 anneaux de 137cm² délimitant une zone d'expérimentation (prélèvement et dépôt artificiel de particules allochtones) du tapis à *Sphagnum capillifolium*. B. Répartition des différents anneaux sur les 300m² de la zone d'étude, avec pour chacun leurs lots et leurs concentrations respectives faible ou forte.

Minéraux	Poids d'oxydes									Formule structurale
	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	FeO	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	
CHLORITOIDE	29.5	0.1	38.9	21.9	0.0	9.2	0.1	0.3	0.1	(Fe ²⁺ ,Mg,Mn) ₂ (Al,Fe ³⁺)(OH) ₄ Al ₃ O ₂ (SiO ₄) ₂
CLINOCHLORE	32.8	0.1	22.2	20.1	0.0	24.4	0.0	0.2	0.0	(Mg) ₁₀ Al ₂ (Al ₂ Si ₆ O ₂₀)(OH) ₁₆
TALC	60.8	0.9	0.7	8.9	0.7	27.6	0.0	0.1	0.2	Mg ₆ (Si ₈ O ₂₀)(OH) ₄
PHLOGOPITE	40.4	1.4	16.9	4.8	0.1	24.9	0.2	0.4	10.8	K ₂ Mg ₆ (Al ₂ Si ₆ O ₂₀)(OH) ₄
TALC	58.6	0.0	0.8	9.6	0.0	29.3	0.1	0.0	1.5	Mg ₆ (Si ₈ O ₂₀)(OH) ₄
TREMOLITE	57.5	0.1	0.4	11.4	0.6	18.7	11.1	0.2	0.0	Ca ₂ (Mg,Fe ²⁺) ₅ (Si ₈ O ₂₂)(OH,F) ₂
ANTHOPHYLLITE	59.2	0.1	0.7	8.2	0.1	30.4	1.1	0.2	0.0	(Mg,Fe ²⁺) ₇ (Si ₈ O ₂₂)(OH) ₃
VERMICULITE	39.9	0.1	18.6	4.1	0.1	36.3	0.1	0.8	0.0	(Mg,Fe ³⁺ ,Al) ₃ (Si,Al) ₄ O ₁₀ (OH) ₂ ·4H ₂ O

Matériel supplémentaire 3 – Liste des minéraux traçants composant chaque lot avec les poids d'oxydes mesurés (SiO₂, TiO₂, Al₂O₃, FeO, MnO, MgO, CaO, Na₂O, K₂O).

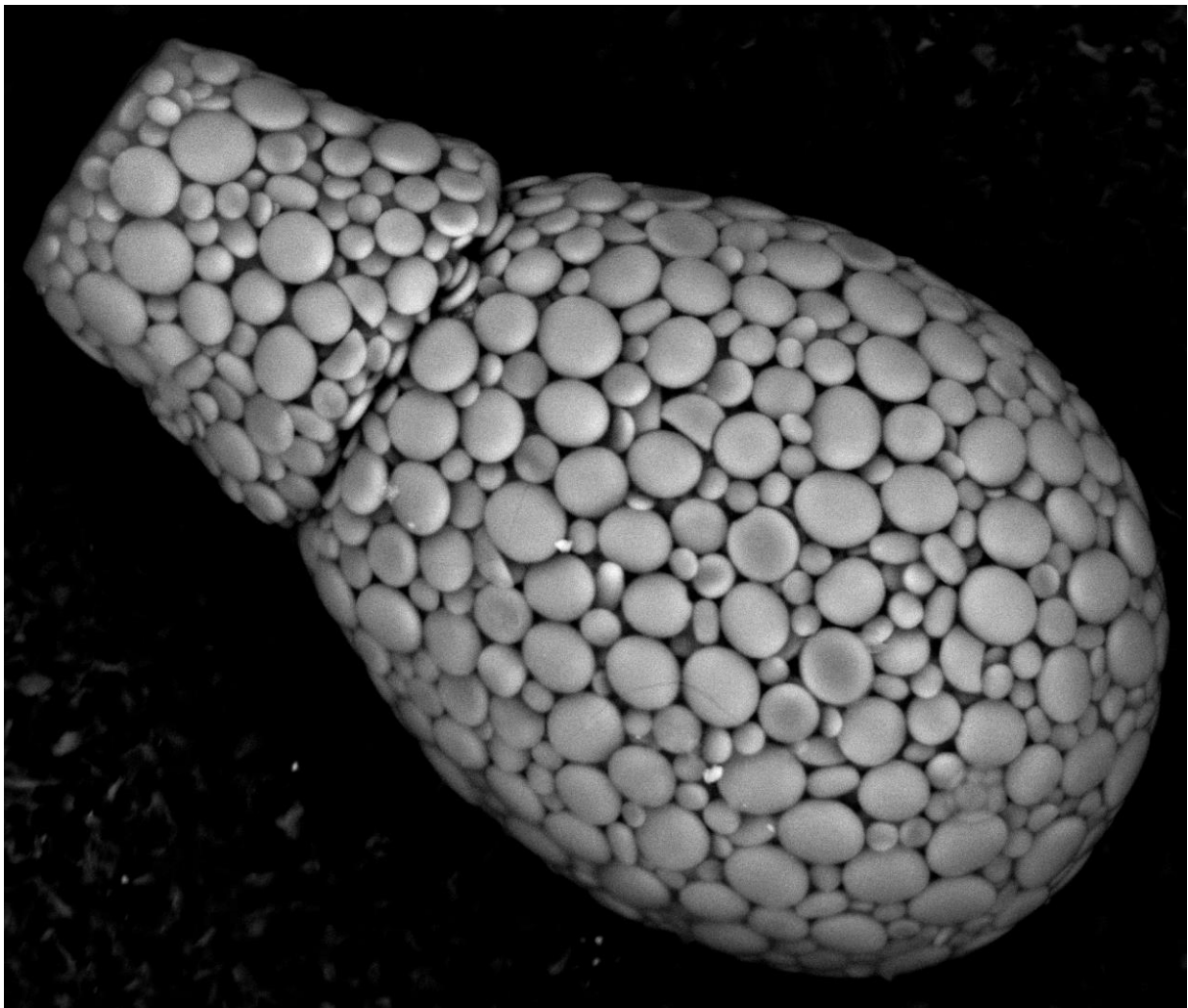
Temps T (mois)	T0	T+1	T+2	T+4	T+6	T+15	Total
Durée de l'expérience (jours)	0	27	58	125	182	466	
Nombre total de thèques analysées	38	150	161	168	174	149	840
Nombre total de thèques contenant des particules traçantes	0	14	44	39	50	20	167
Nombre de thèques analysées / Nombre de thèques contenant des particules traçantes = "REUSSITE"	0	0.09	0.27	0.23	0.29	0.13	
Nombre total de particules intégrées	0	22	108	141	233	81	585
Nombre minimum de particules traçantes observées par thèque contenant des particules traçantes	0	1	1	1	1	1	
Nombre maximum de particules traçantes observées par thèque contenant des particules traçantes	0	6	16	16	43	29	
Nombre moyen de particules traçantes observées par thèque contenant des particules traçantes	0	1.6	2.45	3.62	4.66	4.05	
Nombre total de particules traçantes dans les amibes sous faibles apports (fC)	0	2	27	24	16	8	77
Nombre total de particules traçantes dans les amibes sous forts apports (FC)	0	20	81	117	217	73	508
Reussite_total_fC	0	0	0.19	0.14	0.17	0.08	
Reussite_total_FC	0	0.2	0.46	0.4	0.51	0.33	
Lot n°1	T0	T+1	T+2	T+4	T+6	T+15	Total
Nombre total de particules intégrées	0	6	5	12	10	10	43
Nombre de particules_Chloritoides	0	3	4	7	10	1	25
Nombre de particules_Chlorites	0	3	1	5	0	9	18
Nombre de thèques analysées_total	0	30	28	30	30	28	146
Nombre de thèques analysées_fC	0	15	15	15	15	15	75
Nombre de thèques analysées_FC	0	15	13	15	15	13	71
Nombre de thèques contenant des particules traçantes	0	4	5	7	6	5	27
Nombre de thèques contenant des particules traçantes_fC	0	0	2	0	2	3	7
Nombre de thèques contenant des particules traçantes_FC	0	4	3	7	4	2	20
Cumul du nombre total de particules traçantes observées	0	6	11	23	33	43	
Nombre de particules traçantes dans des thèques d'amibes sous fC	0	0	2	0	2	4	8
Nombre de particules traçantes dans des thèques d'amibes sous FC	0	6	3	12	8	6	35
Reussite_total	0	0.13	0.18	0.23	0.20	0.18	
Reussite_fC	0	0.00	0.13	0.00	0.13	0.20	
Reussite_FC	0	0.27	0.23	0.47	0.27	0.15	
Lot n°2	T0	T+1	T+2	T+4	T+6	T+15	Total
Nombre total de particules intégrées = Particules_Talc	0	10	51	37	61	17	176
Nombre de thèques analysées_total	0	18	25	25	26	23	117
Nombre de thèques analysées_fC	0	10	15	10	13	13	61
Nombre de thèques analysées_FC	0	8	10	15	13	10	56
Nombre de thèques contenant des particules traçantes	0	4	10	10	15	5	44
Nombre de thèques contenant des particules traçantes_fC	0	0	3	2	3	0	8
Nombre de thèques contenant des particules traçantes_FC	0	4	7	8	12	5	36
Cumul du nombre total de particules traçantes observées	0	10	61	98	159	176	
Nombre de particules traçantes dans des thèques d'amibes sous fC	0	0	11	6	3	0	20
Nombre de particules traçantes dans des thèques d'amibes sous FC	0	10	40	31	58	17	156
Reussite_total	0	0.2	0.4	0.4	0.54	0.22	
Reussite_fC	0	0.00	0.20	0.20	0.23	0.00	
Reussite_FC	0	0.50	0.70	0.53	0.92	0.50	

Matériel supplémentaire 4 (1/2) – Données de comptage des différents paramètres analysés pour chacun des prélèvements à T0, T+1, T+2, T+4, T+6 et T+15. Les données sont présentées par lots de particules minérales, et additionnées.

Lot n°3	T0	T+1	T+2	T+4	T+6	T+15	Total
Nombre total de particules intégrées = Nombre de particules_Phlogopite	0	0	0	0	0	0	0
Nombre de thèques analysées_total	0	26	25	28	30	21	130
Nombre de thèques analysées_fc	0	15	15	13	15	11	69
Nombre de thèques analysées_FC	0	11	10	15	15	10	61
Nombre de thèques contenant des particules traçantes	0	0	0	0	0	0	0
Lot n°4	T0	T+1	T+2	T+4	T+6	T+15	Total
Nombre total de particules intégrées	0	4	23	70	113	54	264
Nombre de particules_Anthophyllite fc	0	1	0	1	0	4	6
Nombre de particules_Anthophyllite FC	0	3	2	48	38	36	127
Nombre de particules_Tremolite fc	0	0	2	0	0	0	2
Nombre de particules_Tremolite FC	0	0	13	18	19	14	64
Nombre de particules_Vermiculite fc	0	0	0	0	1	0	1
Nombre de particules_Vermiculite FC	0	0	1	0	2	0	3
Nombre de particules_Talc_fc	0	0	1	0	1	0	2
Nombre de particules_Talc_FC	0	0	4	3	52	0	59
Nombre de thèques analysées_total	0	23	23	25	28	27	126
Nombre de thèques analysées_fc	0	11	8	10	13	15	57
Nombre de thèques analysées_FC	0	12	15	15	15	12	69
Nombre de thèques contenant des particules traçantes	0	4	13	11	13	10	51
Nombre de thèques contenant des particules traçantes_fc	0	1	2	1	2	3	9
Nombre de thèques contenant des particules traçantes_FC	0	3	11	10	11	7	42
Cumul du nombre total de particules traçantes observées	0	4	27	97	210	264	
Nombre de particules traçantes dans des thèques d'amibes sous fc	0	1	3	1	2	4	11
Nombre de particules traçantes dans des thèques d'amibes sous FC	0	3	20	69	111	50	253
Reussite_total	0	0.17	0.52	0.44	0.46	0.37	
Reussite_fc	0	0.09	0.25	0.10	0.15	0.20	
Reussite_FC	0	0.25	0.73	0.67	0.73	0.58	
Lot n°5	T0	T+1	T+2	T+4	T+6	T+15	Total
Nombre total de particules intégrées	0	2	29	22	49	0	102
Nombre de particules_Chloritoides fc	0	0	4	0	0	4	8
Nombre de particules_Chloritoides FC	0	0	0	0	4	0	4
Nombre de particules_Clinochlore fc	0	0	0	2	2	4	8
Nombre de particules_Clinochlore FC	0	0	0	0	3	0	3
Nombre de particules_Talc_fc	0	1	5	7	3	0	16
Nombre de particules_Talc_FC	0	1	16	0	22	0	39
Nombre de particules_Phlogopite fc	0	0	0	0	0	0	0
Nombre de particules_Phlogopite FC	0	0	0	0	0	0	0
Nombre de particules_Anthophyllite fc	0	0	1	5	2	0	8
Nombre de particules_Anthophyllite FC	0	0	1	4	9	0	14
Nombre de particules_Tremolite fc	0	0	1	1	2	0	4
Nombre de particules_Tremolite FC	0	0	1	3	2	0	6
Nombre de particules_Vermiculite Fc	0	0	0	0	0	0	0
Nombre de particules_Vermiculite FC	0	0	0	0	0	0	0
Nombre de thèques analysées_total	0	25	30	30	30	20	135
Nombre de thèques analysées_fc	0	15	15	15	15	10	70
Nombre de thèques analysées_FC	0	10	15	15	15	10	65
Nombre de thèques contenant des particules traçantes	0	2	17	11	16	0	46
Nombre de thèques contenant des particules traçantes_fc	0	1	8	6	5	0	20
Nombre de thèques contenant des particules traçantes_FC	0	1	11	5	11	0	28
Nombre de particules traçantes dans des thèques d'amibes sous fc	0	1	11	17	9	0	38
Nombre de particules traçantes dans des thèques d'amibes sous FC	0	1	18	5	40	0	64
Reussite_total	0	0.1	0.57	0.37	0.53	0	
Reussite_fc	0	0.1	0.53	0.4	0.33	0	
Reussite_FC	0	0.1	0.73	0.33	0.73	0	

Matériel supplémentaire 4 (2/2) – Données de comptage des différents paramètres analysés pour chacun des prélèvements à T0, T+1, T+2, T+4, T+6 et T+15. Les données sont présentées par lots de particules minérales, et additionnées.

**Chapitre 5 - Intégration de
cryptotephras issus de l'éruption
récente du volcan Puyehue au Chili
dans les thèques d'amibes
xénosomiques**



1 PRÉAMBULE

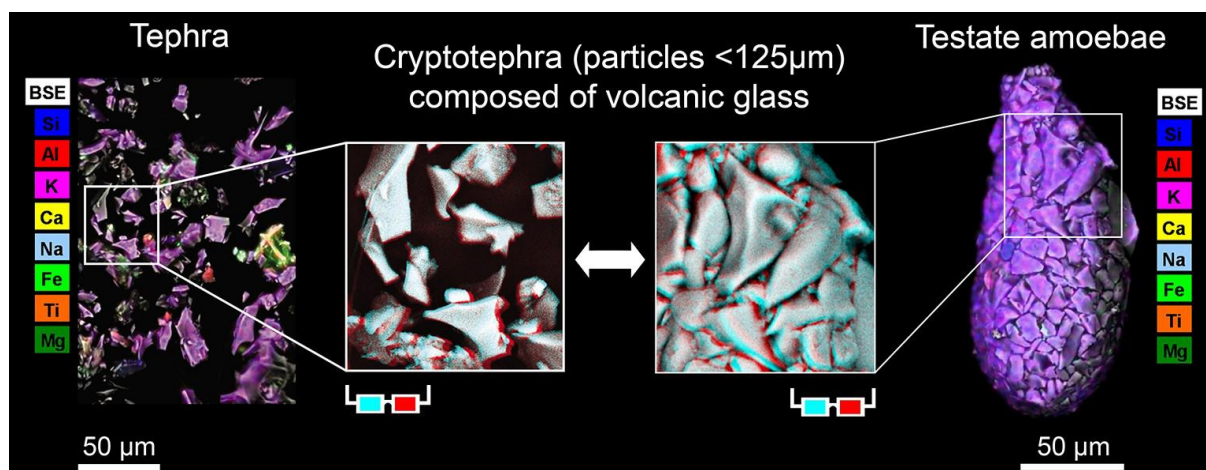
Les éruptions volcaniques contemporaines ont des impacts négatifs sur l'économie et les sociétés. Les retombées de cendres volcaniques (tephras) affectent l'agriculture, les systèmes de distribution en eau, les transports, et ont des conséquences majeures dans les secteurs du tourisme et de l'élevage (Collini et al., 2013 ; Folch et al., 2008). Pour ces raisons, le suivi constant des volcans et la détermination des fréquences, durées et effets des éruptions récentes ou passées est devenue une priorité dans les régions comportant des volcans actifs (Buteler et al., 2011, Lavallée et al., 2008). L'analyse des dépôts de tephras permet de déduire des informations à propos des retombées de cendres volcaniques et leur fréquence (Lane et al., 2014 ; Watson et al., 2015). Des études paléo-environnementales récentes utilisent les horizons de cendres composés de « cryptotephras », qui sont des cendres volcaniques invisibles à l'œil nu car inférieures à 125µm (Blockley et al., 2012 ; Lane et al., 2014). Les niveaux sédimentaires riches en cryptotephras sont difficiles à repérer, et l'extraction de ces particules est complexe. L'utilisation d'indicateurs complémentaires comme les thèques d'amibes xénosomiques pourrait répondre à ces contraintes techniques.

L'objectif de ce chapitre est de déterminer si les amibes xénosomiques sont capables d'intégrer les cryptotephras. Ainsi, la composition minérale des thèques de plusieurs espèces d'amibes xénosomiques affectées par l'éruption récente du volcan Puyehue (Chili) a été comparée à celle des tephras récemment déposés.

Les résultats de cette étude démontrent que, sous l'influence de retombées de cendres volcaniques, les 17 espèces d'amibes à thèque xénosomiques analysées ont utilisé des cryptotephras pour construire leurs thèques. Ainsi, l'utilisation des thèques d'amibes xénosomiques pourrait être un proxy efficace de la fréquence et de l'étendue des éruptions volcaniques actuelles ou anciennes, seules ou en complément d'autres approches. Les conclusions de cette étude mettent en évidence que l'analyse des thèques d'amibes xénosomiques peuvent faciliter l'identification de la présence de cryptotephras et leur extraction du sédiment.

2 CINDERELLA'S HELPING PIGEONS OF THE MICROBIAL WORLD: THE POTENTIAL OF TESTATE AMOEBAE FOR IDENTIFYING CRYPTOTEPHRA

Abstract figure:



Maxence Delaine^{a,b*†}, Leonardo D. Fernández^{c,d*†}, Eric Armynot du Châtelet^b, Philippe Recourt^b, Jean-Luc Potdevin^b, Edward A.D. Mitchell^{c,e}, Nadine Bernard^{a,f}

^aLaboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

^bUniversité de Lille, UMR LOG 8187 CNRS, ULCO Laboratoire d'Océanologie et Géosciences, Bâtiment SN5, 59655 Villeneuve-d'Ascq, France

^cLaboratory of Soil Biodiversity, Institute of Biology, University of Neuchâtel, Rue Emile Argand 11, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland

^dLaboratorio de Ecología Evolutiva y Filoinformática, Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Barrio Universitario s/n, Casilla 160-C, Concepción, Chile

^eBotanical Garden of Neuchâtel, Chemin du Perthuis-du-Sault 58, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland

^fLaboratoire THÉMA, UMR 6049, CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, 32 rue Mégevand, 25030 Besançon Cedex, France

*Corresponding authors at: Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249, Université de Bourgogne Franche-Comté, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France (M. Delaine) and Laboratory of Soil Biodiversity, Institute of Biology, University of Neuchâtel, Rue Emile Argand 11, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland (L.D. Fernández).

† Both authors are co-first authors and contributed equally to the paper.

Email addresses: maxence.delaine@gmx.fr (M. Delaine) and limnoleo@gmail.com (L.D. Fernández).

Keywords: Arcellinida, cryptotephra, elemental analyzes, free-living unicellular eukaryotes, Puyehue-Cordon Caulle volcanic complex, shell composition.

2.1 ABSTRACT

Cryptotephra (particles <125 µm) is a key record for monitoring past and current volcanic activity. However, its extraction from the host sediment and analysis is often long and difficult because of its small size. Finding a simple method to extract cryptotephra from environmental samples would therefore make its analysis much easier. We hypothesized that arcellinid testate amoebae may hold such a potential. These free-living shelled protists are among the earliest microorganisms to colonize volcanic tephra, and build their shell by agglutinating minerals from their environment. We analyzed by X-ray Spectrometry the mineral signature of tephra from the 2011 Puyehue-Cordon Caulle Volcanic Complex (Chile) eruption ash fallout and compared it to that of the shells of 51 individual testate amoebae (three individuals from each of 17 species) from 13 samples collected at different distances from the active vent. The mineral composition of particles within shells closely matched that of similar size class particles from their environment. The capacity of testate amoebae to randomly use mineral grains from their environment makes it possible to use their shells to assess the mineral composition of cryptotephra from soil, peat or sediment samples. Testate amoebae therefore represent the microbial world's version of Cinderella's helping pigeons.

2.2 INTRODUCTION

In Jacob and Wilhelm Grimm's version of the Cinderella the fairy tale (Grimm brothers, 1812) pigeons help Cinderella sort out lentils, seeds and peas, thus allowing her first to see her evil stepsisters dance at the ball and then to attend the ball herself (with additionally magical tricks of course). This is of course a fairy tale, but have all scientists not dreamt having magical helping hands to speed-up impossible chores? Here we present such a case from the analysis of cryptotephra from terrestrial habitats in which testate amoebae, a group of microorganisms may indeed play the role of a miniature version of Cinderella's pigeons.

Testate amoebae are a species-rich and polyphyletic group of heterotrophic and mixotrophic microorganisms that belong to two deep and distantly related lineages, i.e. Amoebozoa (lobose testate amoebae) and the supergroup SAR (filose testate amoebae) (Adl et al. 2012). These organisms occur in almost all freshwater and terrestrial biomes of the planet, including those as extreme as deserts (Fernández 2015), tundra (Mazei and Chernyshov,

2011) and polar freshwater (Zapata and Matamala 1987); though they are always more diverse in biomes dominated by high yearly precipitation and warm temperatures such as tropical and temperate rainforests (Krashevskaya et al. 2007; Bamforth 2010; Fernández et al. 2012). They also represent one of the most diverse and abundant groups of eukaryotic microorganisms in peatlands, and therefore, their diversity and ecology have been best studied in these habitats (e.g. Charman 1997; Bobrov et al. 2002; Fernández and Zapata 2011; Qin et al. 2012; Marcisz et al. 2014; Fournier et al. 2016).

One of the most conspicuous morphological features of testate amoebae is their proteinaceous or agglutinated shell, or test, which surrounds and protects their single-cell bodies. Proteinaceous shells are produced by the organism itself and can be flexible, rigid or areolated (Meisterfeld, 2002a). By contrast, agglutinated shells are constructed by attaching either self-produced building units (idiosomes) that resemble scales, plates or rods (i.e. idiosomic testate amoebae) or foreign building units (xenosomes) such as mineral particles and/or idiosomes from other testate amoebae (i.e. xenosomic testate amoebae) (Meisterfeld 2002a, 2002b).

The shells of these protists (especially those built by xenosomic testate amoebae) remain intact in peats and sediments for long periods of time after the death of the organism and can be identified to species level in most cases (Beyens and Meisterfeld 2001). Indeed, sub-fossils of these organisms are abundant in Holocene peats and sediments (Charman 2001; Swindles et al. 2010; Wall et al. 2010) and fossils have been identified from sediments and amber as old as the Triassic (220-230 Ma, Schönborn et al. 1999) and even the Neoproterozoic (~750 Ma, Porter et al. 2003).

Testate amoeba communities are known to vary along environmental gradients (Beyens and Meisterfeld 2001; Marcisz et al. 2014; Fernández et al. 2016). This feature coupled with the good preservation of their shell has led to their use as proxies for monitoring changes in present (Meyer et al. 2012; Turner and Swindles 2012; Valentine et al. 2013) and past (Mitchell et al. 2008; Delaine et al. 2014; Marcisz et al. 2015) environmental conditions. More recently, their usefulness as proxies of volcanic impacts on peatland microbial communities have also been shown (Payne 2012), opening a new and so far little explored practical application for these microorganisms.

Volcanic eruptions are one of the most impressive natural disturbances on Earth. Many volcanic eruptions have occurred throughout Earth's history, with important consequences on the environment and biodiversity (Johansen et al. 1981; Marske et al. 2007; Schoene et al. 2015). Contemporaneous volcanic eruptions have negative impacts on the economy and societies. Volcanic ash fallout (tephra) affects agriculture, livestock, water distribution

systems and ground and air transportation network, with major consequences on the farming and tourism sectors (Folch et al. 2008; Collini et al. 2013). Because of this, the constant monitoring of volcanoes and the determination of the frequency, duration and effect of past and current volcanic eruptions have become priority issues in regions where active volcanoes occur (Folch et al. 2008; Lavallée et al. 2008; Buteler et al. 2011; Caneiro et al. 2011; Collini et al. 2013).

The analysis of tephra layers in conjunction with proximal records of volcanic activity is commonly used to deduce information about volcanic ash cloud fallout and frequency (Lane et al. 2014; Watson et al. 2015). More recently, paleoenvironmental studies have also demonstrated the potential of extending the use of visible tephra layers by looking for non-visible volcanic ash horizons known as cryptotephra, i.e. the tephra fraction with a grain size below 125 μm (Blockley et al. 2007; Lane et al. 2014). Unlike visible tephra, cryptotephra layers can be found more than 1,000 km from their source. Therefore, cryptotephra analysis allows increasing the area in which tephra layers can be used to date and correlate paleoenvironmental archives (reviewed in Lane et al. 2014).

A problem with using tephra layers for practical purposes is that they may be potentially modified or removed by taphonomic processes (Payne et al. 2005), resulting in an uneven record for these time synchronous marker horizons (i.e. isochrones) (Blockley et al. 2007; Lane et al. 2014). Furthermore, as cryptotephra is composed of microscopic mineral particles, its extraction from the host sediment can be a tiresome and laborious task (Lane et al. 2014). In these cases, the use of complementary proxies could be very useful in facilitating the analysis of visible tephra and filling records gaps by allowing the study of non-visible tephra.

Xenosomic testate amoebae represent potentially useful proxies to fulfill this task. Qualitative and quantitative analyzes have shown that testate amoebae incorporate into their shell only the mineral particles available in their immediate environment (Štěpánek 1952; Armynot du Châtelet et al. 2010, 2015). They are also among the earliest protists to appear in the microbial succession occurring in volcanic tephra (Smith 1985), and their subfossil and contemporary communities are evenly found in soil and peat tephra deposits (Smith 1974, 1985; Payne 2012). This background led us to hypothesize that xenosomic testate amoebae use tephra to build their shell in sites recently affected by volcanic eruptions. If true, this could lead to establishing xenosomic testate amoebae as reliable proxies of the frequency and extent of past and present-day volcanic eruptions, either alone or as a complement of other approaches. To test that hypothesis, in this study, we conducted elemental and multivariate analyzes to determine and compare the mineral composition of tephra and

xenosomic testate amoeba shells in a site affected by the recent eruption of the Puyehue-Cordón Caulle volcanic complex, southern Chile.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Geographical setting

Chile is a narrow and long country situated in the southeastern Pacific coast. This country has nearly 90 active volcanoes, one of which is the so-called Puyehue-Cordón Caulle volcanic complex (PCCVC) (SERNAGEOMIN 2015a). This volcanic complex is situated within the limits of the Puyehue National Park, a protected area that includes part of the Andes and pristine temperate evergreen rainforests in southern Chile (ca. 40°5' S, 72°2' W). The PCCVC is composed of four different volcanoes that are aligned in a northwest-southeast axis, oblique to the main volcanic front of the Southern Volcanic Zone of the Chilean Andes (Lara et al. 2006). After decades of quiescence, the PCCVC erupted on June 2011 from a new vent located 7 km from the Puyehue stratovolcano. The initial explosive phase of the eruption spanned for more than two weeks and was characterized by eruption columns that oscillated between 7 and 15 km of altitude (Collini et al. 2013 and references therein). The eruption caused abundant ash fallout not only in the surroundings but also all around the southern hemisphere (Collini et al. 2013). Currently, the volcano shows a state of quiescence, but wind, rainfall and snowmelt continuously move tephra deposits into nearby basins (SERNAGEOMIN 2015b).

2.3.2 Sampling

In January 2014, we randomly sampled a wide array of microhabitats including litter, decaying wood, topsoil layer and soil mosses in the Puyehue National Park. These microhabitats were selected because they exhibit high levels of testate amoeba species richness in the region (Fernández et al. 2015) and thus their exploration frequently allows having a good representation of the group. A total of 14 samples were collected at different altitudes and distances from the active vent of the PCCVC (Table 1 and Fig.1). All samples come from sites of the park that were severely impacted by the ash cloud fallout. Notably, samples collected always contained tephra, even when they were collected in very lush and protected sites of the forest. One of the samples collected, unusually rich in volcanic ash (hereafter, the tephra sample), was selected to analyze and characterize the mineral composition of tephra (Table 1).

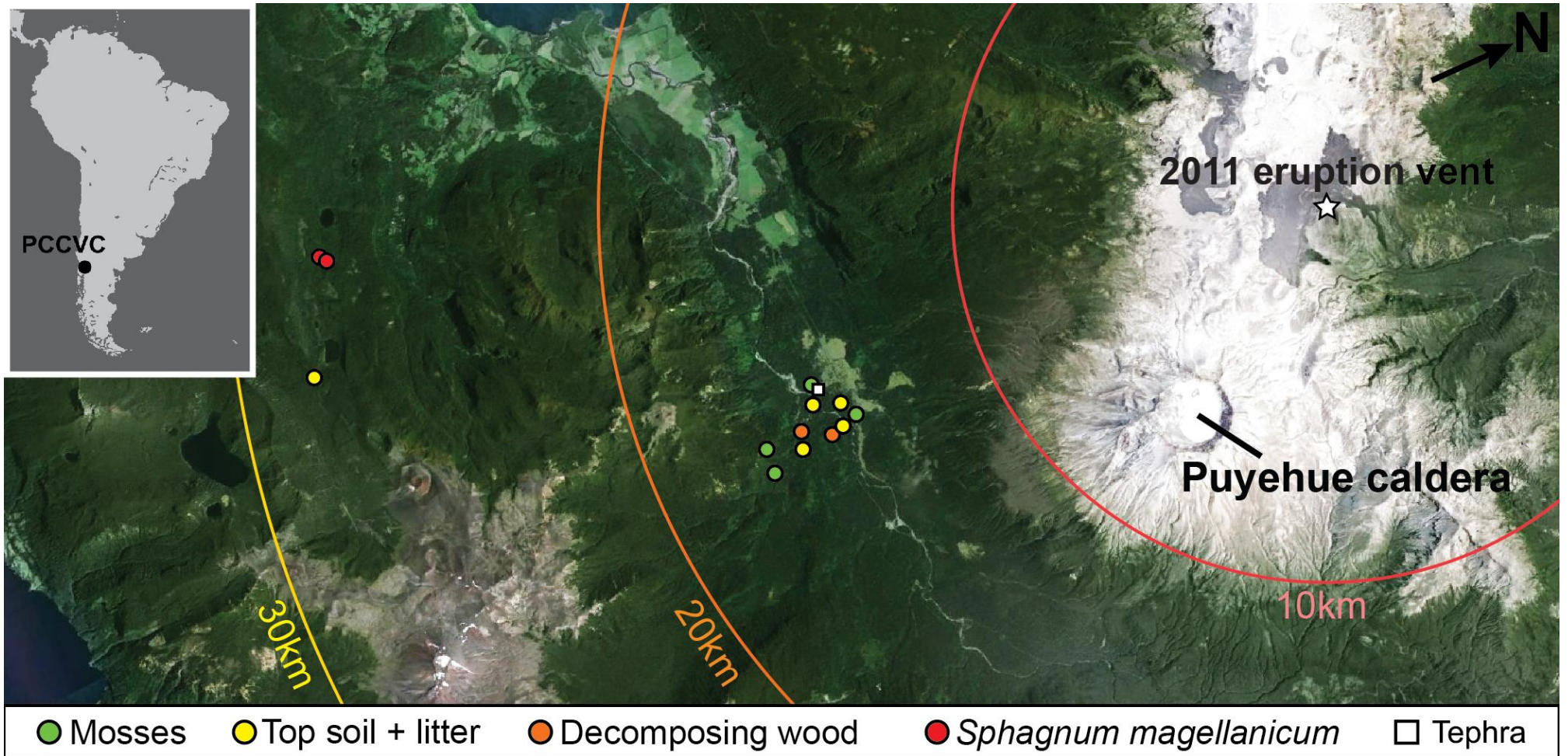


Fig. 1. (a) Geographical localization of the Puyehue-Cordon Caulle volcanic complex (PCCVC) in Chile. (b) Sampling sites in the Puyehue National Park.

Table 1. Information associated to the microhabitats sampled in the Puyehue National Park, Chile.

Sample code	Coordinates	Altitude (m a.s.l.)	Sample type
CHI-27	40°39'48.1" S; 072°10'31.2" W	359	Tephra
CHI-28	40°39'48.1" S; 072°10'31.2" W	359	Soil mosses
CHI-31	40°39'55.6" S; 072°10'22.6" W	340	Litter & topsoil
CHI-36	40°39'38.9" S; 072°10'6.3" W	350	Litter & topsoil
CHI-37	40°39'35.2" S; 072°9'58.3" W	369	Soil mosses
CHI-38	40°39'52.0" S; 072°9'48.0" W	379	Decaying wood
CHI-40	40°39'42.7" S; 072°9'52.7" W	424	Litter & topsoil
CHI-41	40°40'18.9" S; 072°9'58.8" W	410	Litter
CHI-42	40°40'44.0" S; 072°9'47.1" W	441	Soil mosses
CHI-45	40°40'15.9" S; 072°10'9.4" W	388	Decaying wood
CHI-46	40°40'39.0" S; 072°10'10.4" W	566	Soil mosses
CHI-49	40°46'40.9" S; 072°15'31.9" W	787	Litter & topsoil
CHI-52	40°46'3.1" S; 072°17'34.0" W	724	<i>Sphagnum magellanicum</i>
CHI-54	40°46'3.1" S; 072°17'34.0" W	724	Soil mosses

2.3.3 Sample treatment and ESEM-EDS photographs

Except for the tephra sample, all samples were washed with distilled water and wet sieved through 315 µm mesh sieve to remove debris and other large particles. The lower fraction was examined under a stereomicroscope Olympus SZX16 at 115x magnification to isolate and pick xenosomic testate amoeba species using a very fine paintbrush. A total of 51 amoebae (i.e. 17 species, each represented by three individuals used as statistical replicates), were extracted and positioned on SEM stubs using double-sided adhesive carbon discs and then coated with carbon. The identification of the species was based on morphological features of the shell following the same criteria used by previous taxonomic studies on Chilean testate amoebae (e.g. Zapata 2005; Zapata and Fernández 2008; Zapata et al. 2008; Fernández and Zapata 2011; Fernández et al. 2012; Fernández et al. 2015), thus facilitating the comparison of our findings with those of past and future studies in this region.

A fraction of the tephra sample was also put on a stub following the procedure described above for the other samples. Amoeba specimens and tephra on stubs were imaged with an Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) FEI Quanta 200 equipped with an Energy Dispersive X-ray Spectrometer (EDS). Both devices are collectively called as ESEM-EDS hereafter. Pictures were taken using both secondary (low-energy) electrons (SEC) and back-scattered (high-energy) electrons (BSE) modes. SEC is the most common imaging mode and facilitates the documentation and morphological identification of the species, while BSE-imaging mode is especially suited to localize areas with high heavy elements content (high Z) because of their stronger reflectivity in their shell and tephra (e.g. areas rich in Fe-Ti-

Mg oxides). BSE-imaging also allows getting sharper and crisper images (Erlandsen et al. 1999), facilitating the analysis of the size and morphology of the mineral particles constituting amoeba shells and tephra. BSE images were also used to create a plate with 3D anaglyph images of each amoeba species.

2.3.4 Determining the mineral composition of particles composing tephra and testate amoeba shells

We used ESEM-EDS to conduct both qualitative and quantitative elemental analyzes to determine the structural formula and then the identity of mineral particles composing the tephra and testate amoeba shells. The qualitative elemental analysis consisted in constructing an elemental map showing the spatial distribution of chemical elements within the tephra and testate amoeba shells. We aimed to map the following 12 chemical elements within each elemental map: Al, Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Si, and Ti. Elemental maps were produced by progressively rastering the electron beam point by point over the visible surface of the tephra and shells. A color code was used to display simultaneously each chemical element on a composite elemental map.

The quantitative elemental analysis consisted of a point elemental analysis. Rather than rastering over a large surface (e.g. as when constructing the elemental map), a point elemental analysis focuses on small areas of interest within the sample down to a few microns, allowing an accurate determination of their chemical compositions. Here, we used elemental maps as guides for locating mineral particles of different colors and thus with potentially different mineral identities. A total of 161- and 23-point elemental analyzes were conducted on specific mineral particles composing tephra and shells, respectively, down to an interactive volume of $1\text{-}\mu\text{m}^3$.

2.3.5 Determining the total mineral composition of tephra and testate amoeba shells

We conducted a stepwise process to estimate the total mineral composition of tephra and each testate amoeba shell collected. The total mineral composition estimation was based on the visible face of the shell impacted by the electron beam. First, we cropped all the mineral particles with the same mineral identity (i.e. those having the same color) from elemental maps representing the spatial distribution of mineral particles within tephra and testate amoeba shells. The mineral particles with the same mineral identity were then grouped and their total area calculated using the software ImageJ 1.05b. This calculation allowed us to know the area occupied by a given mineral in a given elemental map (Supplementary material 1). Determining the total area occupied by minerals in the elemental maps allowed us to estimate the total mineral composition of tephra and of each testate amoeba shell.

Finally, we used the total mineral composition values obtained for each one of the three shells belonging to the same species (i.e. replicas) to calculate the arithmetic mean (average) of the total mineral composition of the respective taxon (Table 2).

Table 2. Mineral composition of tephra and testate amoeba shells. Values are in percentages. The values were estimated through point elemental analyzes conducted on different mineral particles composing tephra and testate amoeba shells. Elemental analyzes were conducted with an Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an Energy Dispersive X-ray Spectrometer. For tephra, total mineral composition does not sum 100% because the percentage of diatom shells was not included (6.34% of the total area of the sample).

Sample / Replicas number	Data / Statistics	Volcanic glass (%)	Feldspars (%)	Oxides (%)	Quartz (xenosomes) / Amorphous silica (idiosomes) (%)	Total (%)	Analyzed area (μm^2)	Shell type
Tephra (n=1)		80.40	8.26	4.72	0.28	93.66	42090.47	
<i>Argyria dentistoma</i> (n=3)	Average	27.51	9.53	0.12	62.84	100	8684.92	2
	SD	0.54	0.49	0.00	0.23		2269.85	
<i>Centropyxis constricta</i> (n=3)	Average	80.81	11.23	4.82	3.14	100	6742.06	1
	SD	2.05	3.75	0.74	2.10		146.54	
<i>Centropyxis ecomis</i> (n=3)	Average	98.96	0.97	0.04	0.03	100	27941.64	1
	SD	0.88	0.79	0.06	0.04		796.93	
<i>Centropyxis elongata</i> (n=3)	Average	95.20	4.41	0.38	0.01	100	6570.17	1
	SD	1.82	1.65	0.19	0.01		1117.37	
<i>Centropyxis orbicularis</i> (n=3)	Average	95.82	2.64	1.17	0.37	100	8817.90	1
	SD	1.04	0.62	0.29	0.31		2895.33	
<i>Centropyxis sylvatica</i> (n=3)	Average	90.75	5.61	3.09	0.55	100	2430.32	1
	SD	7.61	3.66	4.01	0.78		289.00	
<i>Cyclopyxis eurystoma</i> (n=3)	Average	88.60	4.83	2.77	3.79	100	1002.01	1
	SD	1.56	1.68	0.62	0.77		149.67	
<i>Diffugia cf. bryophila</i> (n=3)	Average	97.47	1.54	0.84	0.15	100	10693.97	1
	SD	0.70	0.07	0.62	0.22		3690.41	
<i>Diffugia cf. lacustris</i> (n=3)	Average	96.05	3.82	0.13	0.00	100	11243.68	1
	SD	2.49	2.54	0.18	0.00		3556.90	
<i>Diffugia cf. lata</i> (n=3)	Average	97.45	2.55	0.00	0.00	100	6624.65	1
	SD	1.54	1.54	0.00	0.00		2312.80	
<i>Diffugia cyphodera</i> (n=3)	Average	98.39	1.21	0.40	0.00	100	21184.58	1
	SD	0.92	1.01	0.12	0.00		8035.55	
<i>Diffugia oblonga</i> (n=3)	Average	98.34	1.66	0.00	0.00	100	15516.29	1
	SD	1.16	1.16	0.00	0.00		5207.87	
<i>Diffugia sp.</i> (n=3)	Average	81.17	9.73	5.22	3.89	100	1917.14	1
	SD	2.17	1.08	1.66	0.68		120.37	
<i>Heleopera sylvatica</i> (n=3)	Average	98.70	1.14	0.00	0.16	100	13350.88	1
	SD	6.14	4.72	0.10	8.67		1773.27	
<i>Padaungiella sp.</i> (n=3)	Average	7.15	4.16	0.14	88.54	100	8666.93	2
	SD	4.52	2.60	0.20	6.71		149.67	
<i>Plagiopyxis declivis</i> (n=3)	Average	99.10	0.73	0.17	0.00	100	4883.98	1
	SD	0.93	1.03	0.24	0.00		464.67	
<i>Schwabia regularis</i> (n=3)	Average	85.12	5.72	5.31	3.85	100	4855.37	1
	SD	3.10	1.09	0.69	3.17		511.86	

2.4 RESULTS AND DISCUSSION

2.4.1 Mineral composition of particles composing tephra

Observations under binocular and BSE-imaging showed that tephra was essentially vitreous, mainly composed of white to dark grey glassy particles with sizes ranging from 1 to 350 μm . These particles exhibited sharp edges and conchoidal fractures (Figs 2a, b), suggesting that tephra from the PCCVC was mainly composed of silica-rich volcanic glass (Dürig and Zimanowski 2012). This was further confirmed by both the composite elemental map and the set of 23-point elemental analyzes (Fig. 2c, Table 2, and Supplementary material 2). The point elemental analyzes conducted only on transversely cut volcanic glass particles composing the tephra sample confirmed its chemical heterogeneity (Supplementary material 3). These point elemental analyzes also revealed that volcanic glass particles composing the tephra sample mostly were of dacitic and rhyolitic types (Supplementary material 4). These volcanic glass types are classified as acidic igneous rocks (Le Maitre et al. 2002). Our quantitative and qualitative results were closely consistent with previous studies on tephra from the PCCVC (e.g. Buteler et al. 2011; Caneiro et al. 2011; Collini et al. 2013).

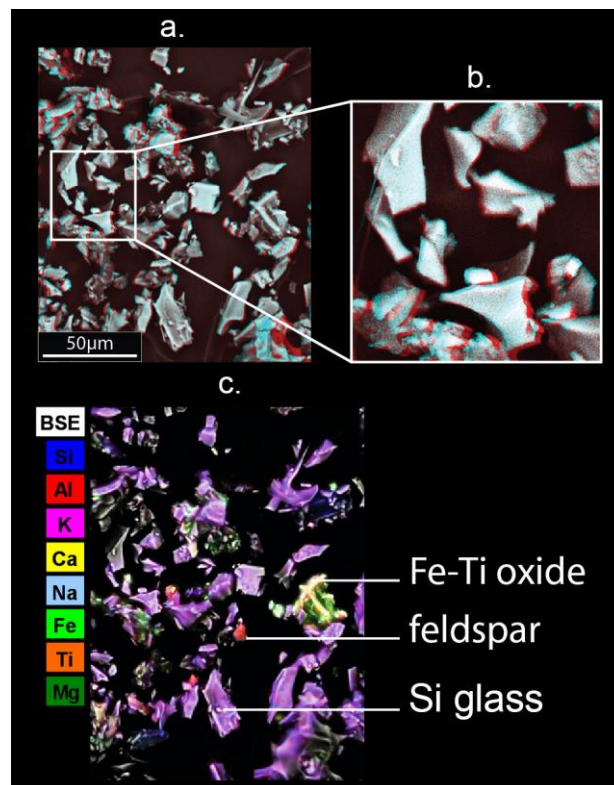


Fig. 2. (a) 3D red/cyan anaglyph micrograph showing the morphological characteristics of tephra particles erupted on 2011 by the Puyehue-Cordón Caulle volcanic complex, Chile. (b) Zoom in of tephra particles showing sharp edges and conchoidal fractures. (c) Composite elemental map showing the chemical elements present within tephra.

2.4.2 Mineral composition of particles composing testate amoeba shells

Seventeen species were isolated from the samples (Fig. 3). BSE-imaging showed that mineral particles composing testate amoeba shells exhibited the same morphological characteristics quoted above for tephra from the PCCVC (i.e. mineral particles with sharp edges and conchoidal fractures), suggesting that they were of volcanic origin (Fig. 4). Both qualitative and quantitative elemental analyzes supported this idea. First, the elemental maps revealed that chemical elements have similar proportions to those found in the tephra (Fig. 5 and Supplementary material 2). As in the tephra, the most abundant chemical element on testate amoeba shells was silica, composing about 39 to 72% of the total analyzed area (Supplementary material 2). Next, the set of 126-point elemental analyzes conducted on different mineral particles composing testate amoeba shells revealed that 15 of the 17 species identified had a shell mostly built with silica-rich volcanic glass particles, while the shell of the other two species (i.e. *Argygnia dentistoma* (Penard, 1890) and *Padaungiella* sp.) were mainly built with idiosomes recycled from other species (Fig. 6, Table 2 and Supplementary material 5). This finding was not surprising, since the species of the genera *Argygnia* Vucetich, 1974 and *Padaungiella* Lara et Todorov, 2012 commonly use mineral particles only as a complement to build their shell (e.g. Ogden and Hedley 1980; Clarke 2003; Mazei and Tsyganov 2006; Zapata et al. 2007). Our results also revealed that *Heleopera sylvatica* Penard, 1890 had a shell almost completely built with volcanic glass particles (98.7% of the surface of its shell was coated with this material) (Fig. 6, Table 2). While it is known that in this species the proportion of mineral particles used to build the shell can vary from among individuals (e.g. Clarke 2003), to our knowledge this is the first report for this species of a shell almost totally built with mineral particles (i.e. volcanic glass). This suggests that this species does not have a preference for any building material and that, like other testate amoeba species (Štěpánek 1952; Armynot du Châtelet et al. 2010, 2015), it simply uses the most abundant building material in its habitat to build its shell (i.e. tephra in our study). Moreover, it may suggest that *H. sylvatica* prefers mineral particles as building material when they are in sufficient abundance and appropriate size in its habitat. These interpretations should however be confirmed by further studies and especially taking into account the possible existence of several taxa within this morphospecies, which may differ in the use of xenosomes for building their shell. This observation could also apply to other species that, according to the literature, barely use mineral particles as building material (e.g. *Argygnia* spp. and *Padaungiella* spp.). However, we can only speculate on this question, and further research is needed to address it properly.

Additional point elemental analyzes conducted on very thin and polished sections of volcanic glass particles composing testate amoeba shells revealed that they mostly were of trachytic

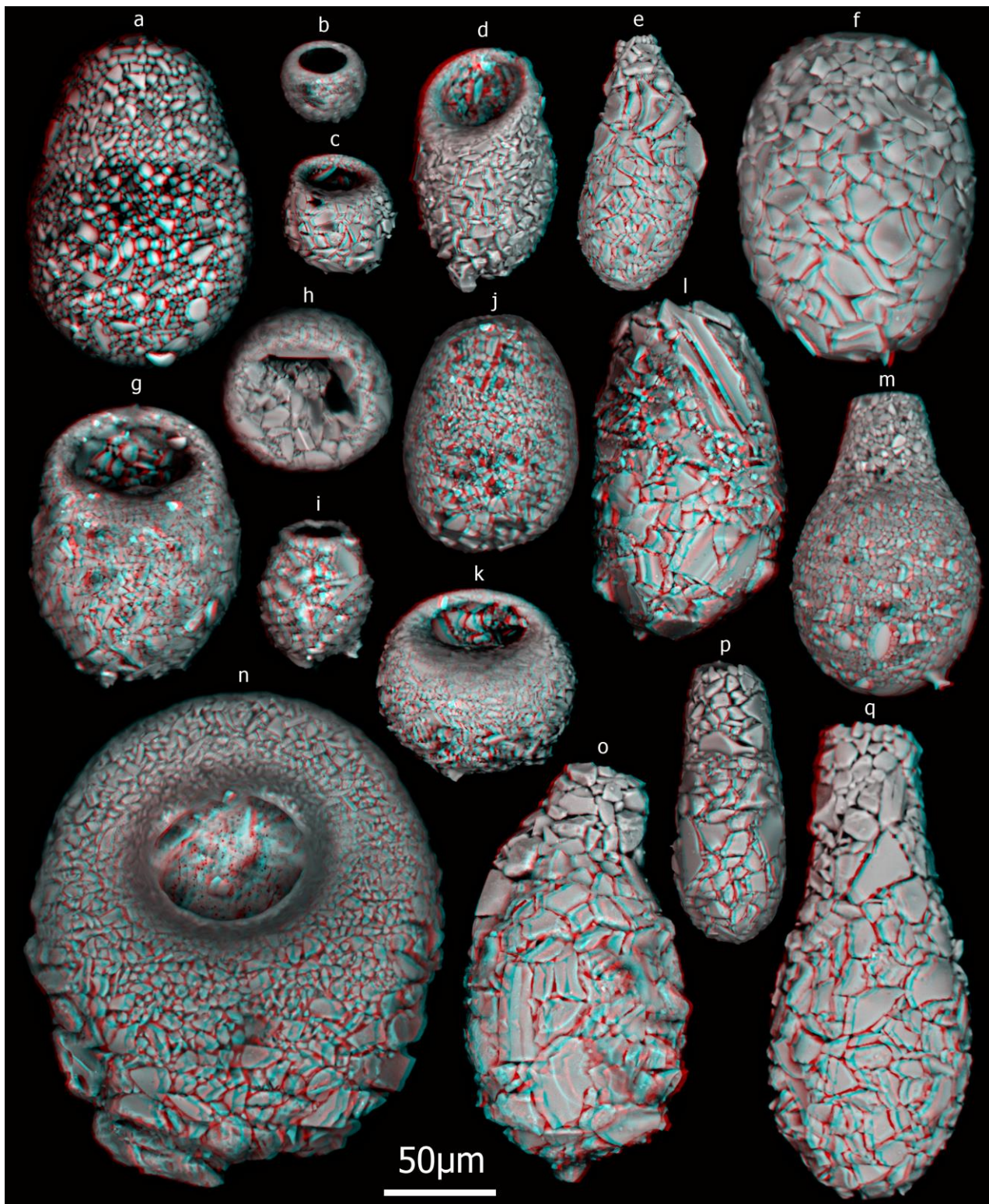


Fig. 3. 3D anaglyph micrographs of testate amoeba species recorded in the Puyehue National Park, Chile.

(a) *Argynnia dentistoma* (Penard, 1890), (b) *Cyclopyxis eurystoma* Deflandre, 1929, (c) *Centropyxis sylvatica* (Deflandre, 1929), (d) *Centropyxis elongata* (Penard, 1890), (e) *Diffflugia cf. bryophila* (Penard, 1902), (f) *Heleopera sylvatica* Penard, 1890, (g) *Centropyxis constricta* (Ehrenberg, 1841), (h) *Plagiopyxis declivis* Bonnet and Thomas, 1955, (i) *Diffflugia* sp., (j) *Schwabia regularis* Jung, 1942, (k) *Centropyxis orbicularis* Deflandre, 1929, (l) *Diffflugia cf. lata* (Jung, 1942), (m) *Padaungiella* sp. (undescribed species, Fernández et al. unpublished data), (n) *Centropyxis ecornis* (Ehrenberg, 1841), (o) *Diffflugia cyphodera* (Jung, 1942), (p) *Diffflugia cf. lacustris* (Penard, 1899), (q) *Diffflugia oblonga* Ehrenberg, 1838.

type and, to a lesser extent, of dacitic and rhyolitic types, (Supplementary material 4). While this analysis confirmed that testate amoebae used tephra to build their shells, it also revealed that the volcanic glass type that dominated in testate amoeba shells was different from that prevailing in the tephra (i.e. dacitic and rhyolitic types).

As volcanic glass particles of dacitic and rhyolitic types are much more acidic than those of trachytic type (Le Maitre et al. 2002), one can hypothesize that testate amoebae select the much more alkaline trachytic particles from tephra, possibly because it improves the performance of the organic cement that they use to bind together the xenosomes. This interpretation would agree with evidence showing that the organic cement produced and used by some other shelled eukaryotic microorganisms (e.g. foraminifera) to construct their agglutinated shells does not perform well under acidic conditions (Scott et al. 2001; Fernández and Zapata 2010a, 2010b).

However, it should be noted that the study site has also experienced the ash fallout of other past eruptions produced by the PCCVC and other neighboring volcanoes (Buteler et al. 2011; Caneiro et al. 2011; Collini et al. 2013). Therefore, it is also possible that the chemical composition of the volcanic glass found in testate amoeba shells mirrors the diversity of volcanic glass found in the soil of the study site, which results from past eruptions as well as the current eruption of the PCCVC. This would imply that testate amoebae are not selecting any particular volcanic glass type to build their shells. Rather, they would be randomly selecting any volcanic glass particle that it is in abundance in their immediate environment (Armynot du Châtelet et al., 2010).

Alternatively, the collected samples may also have included some subfossil shells built with volcanic glass particles from past eruptions. However, we consider this possible bias as unlikely as samples were taken from the topsoil (litter and upper organo-mineral) horizon or in microenvironments lying at the topsoil and all species studied were observed alive in the samples. Whatever the reasons of the aforementioned difference between the volcanic glass type dominating in tephra and testate amoeba shells, one fact is certain; our quantitative and qualitative elemental analyzes demonstrated that mineral particles present in testate amoeba shells were of volcanic origin, thus supporting our hypothesis. To the best of our knowledge, there are no other studies reporting that testate amoebae use tephra to build their shells in a site impacted by a volcanic eruption.

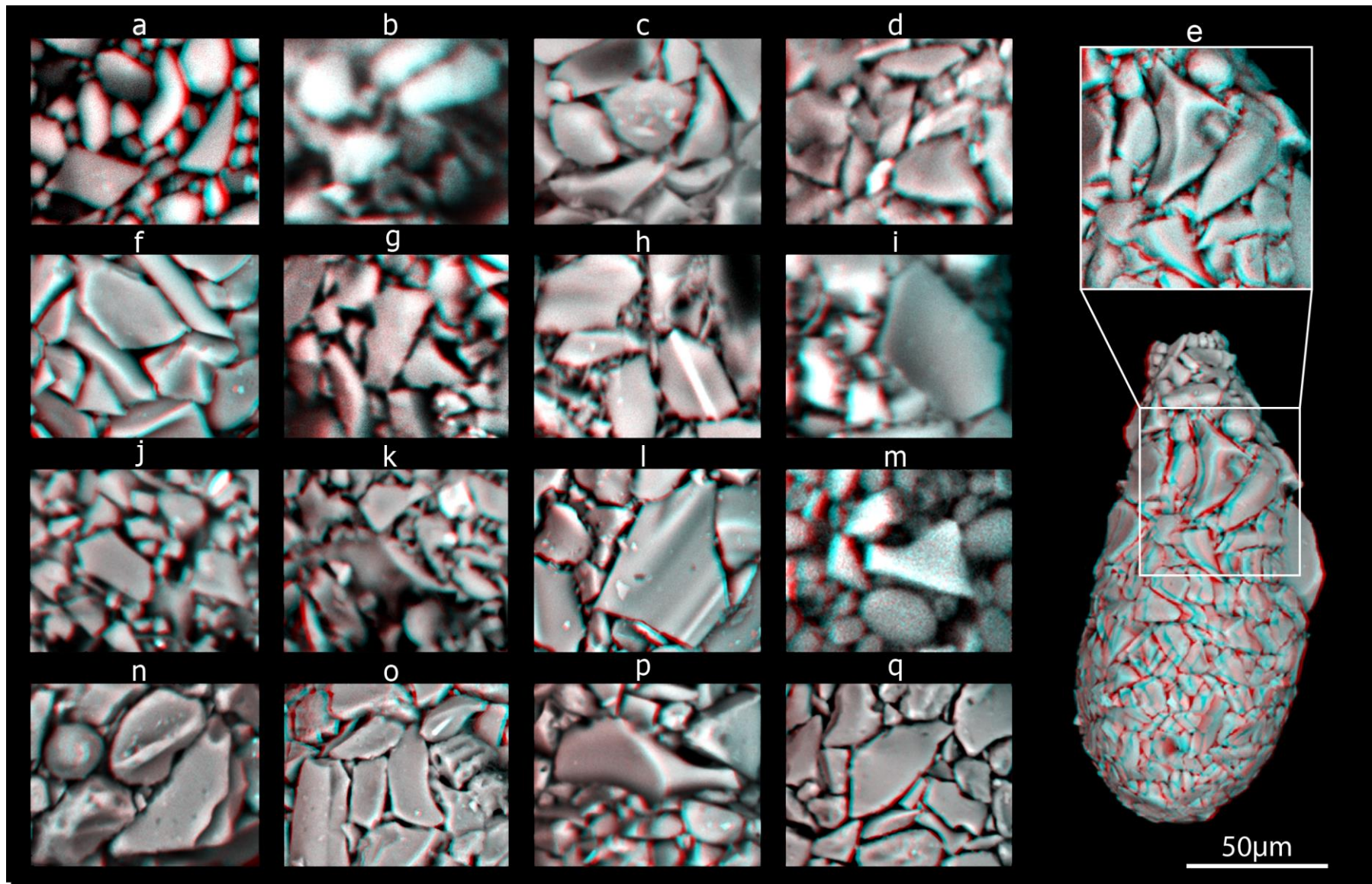


Fig. 4. Detail of mineral particles and xenosomes composing testate amoeba shells. Letters correspond to species as in Fig. 3.

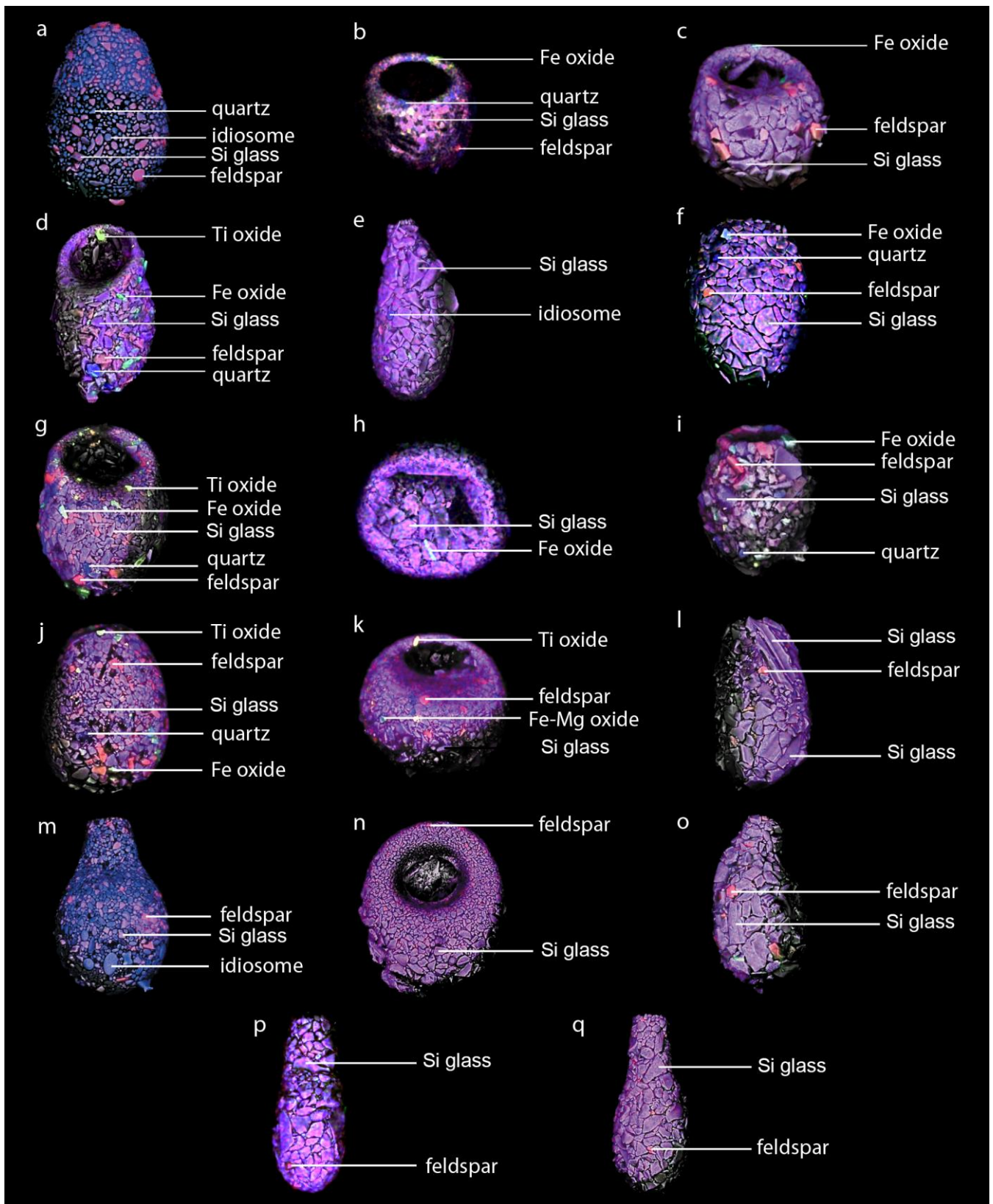


Fig. 5. Composite elemental maps showing the identity of the mineral particles composing testate amoeba shells. Letters correspond to species as in Fig. 3.

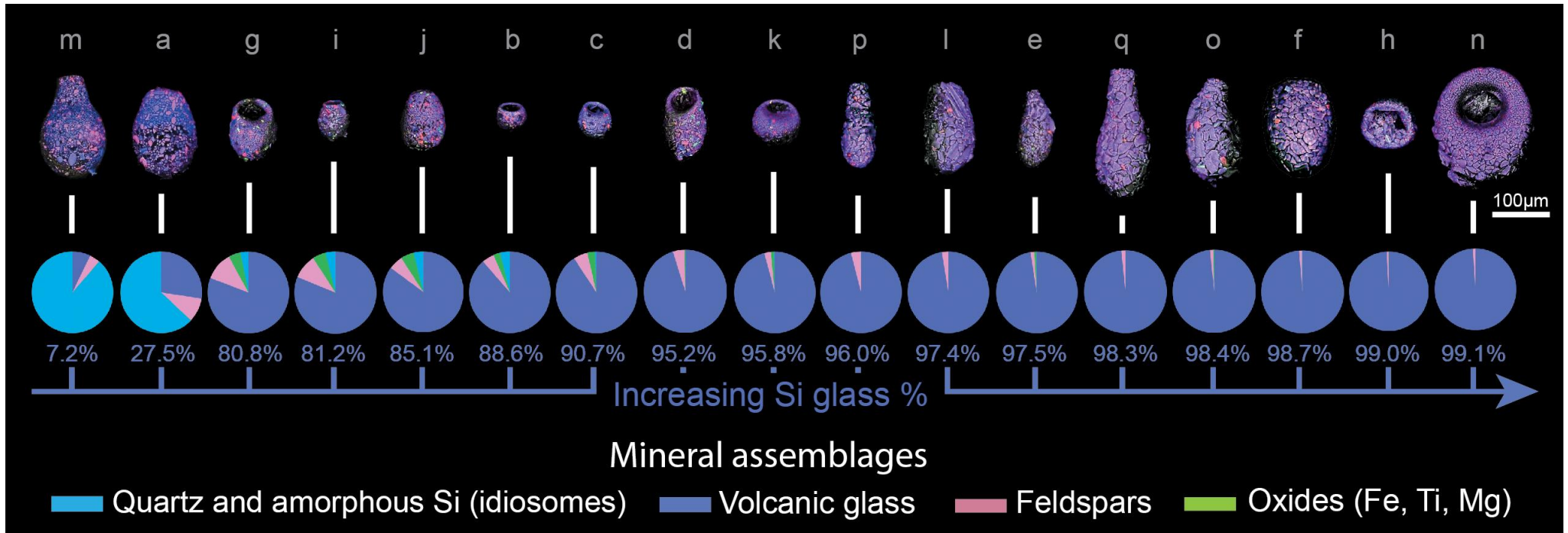


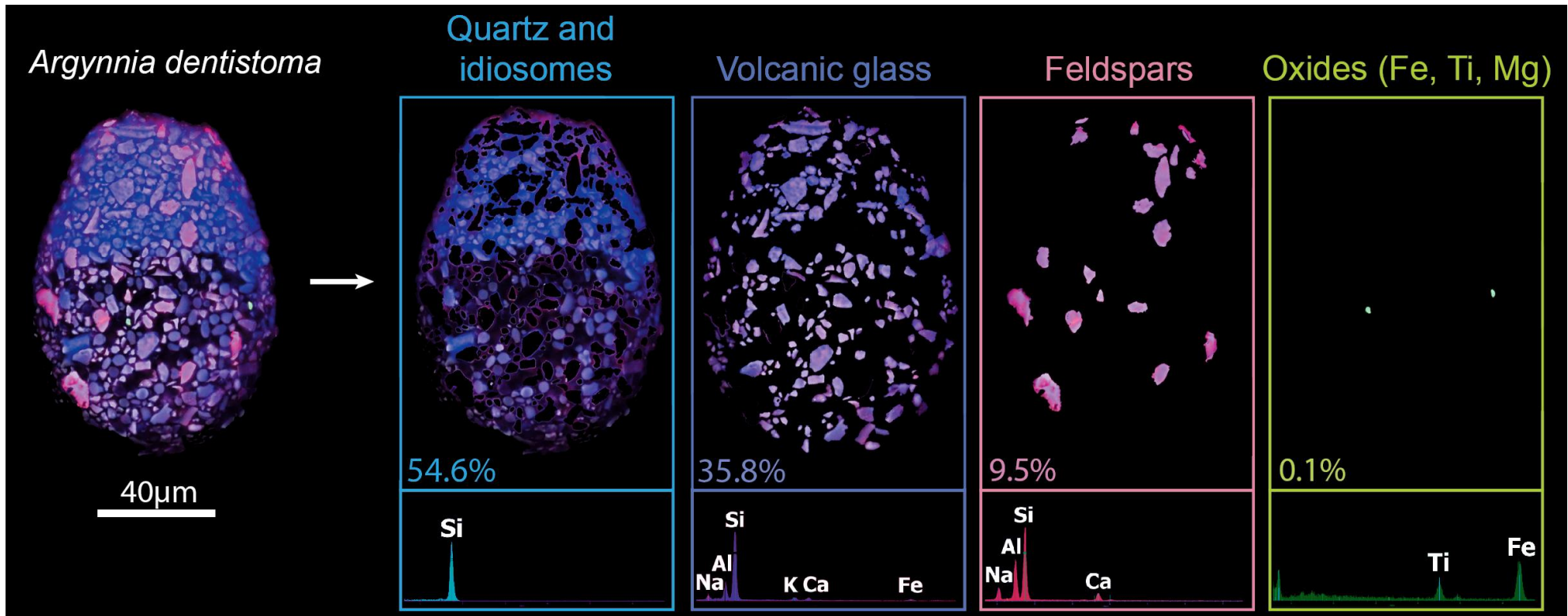
Fig. 6. Total mineral composition of the shell of testate amoeba species collected in the Puyehue National Park, Chile. The chart mainly focuses on showing the amount (%) of volcanic glass particles agglutinated by each species to build its shell. See Fig. 3 for species identity and Table 2 for the identity and amount of other mineral particles used by the species to build their shells.

2.5 CONCLUSIONS

We have demonstrated that testate amoebae can act as Cinderella's helping pigeons of the microbial world, since they collect and sort tephra particles to build their shells in sites affected by the ash fallout from volcanic eruptions. By building a shell 10-100 times larger than most of the non-visible volcanic ash particles, they can facilitate the extraction and counting of cryptotephra from the host sediment, helping researchers to save time on tasks that otherwise would be tiresome and laborious. By contrast, the isolation of testate amoeba shells (some of which are large enough to be isolated with a dissecting microscope) is less-time consuming. By picking individual testate amoeba shells of a given species from different layers of a sediment or peat core (or from different soil samples) and analyzing their mineral composition using X-ray spectrometry, it should be possible to determine the presence or absence of cryptotephra more easily and possibly more precisely than the analysis of the matrix itself.

2.6 ACKNOWLEDGMENTS

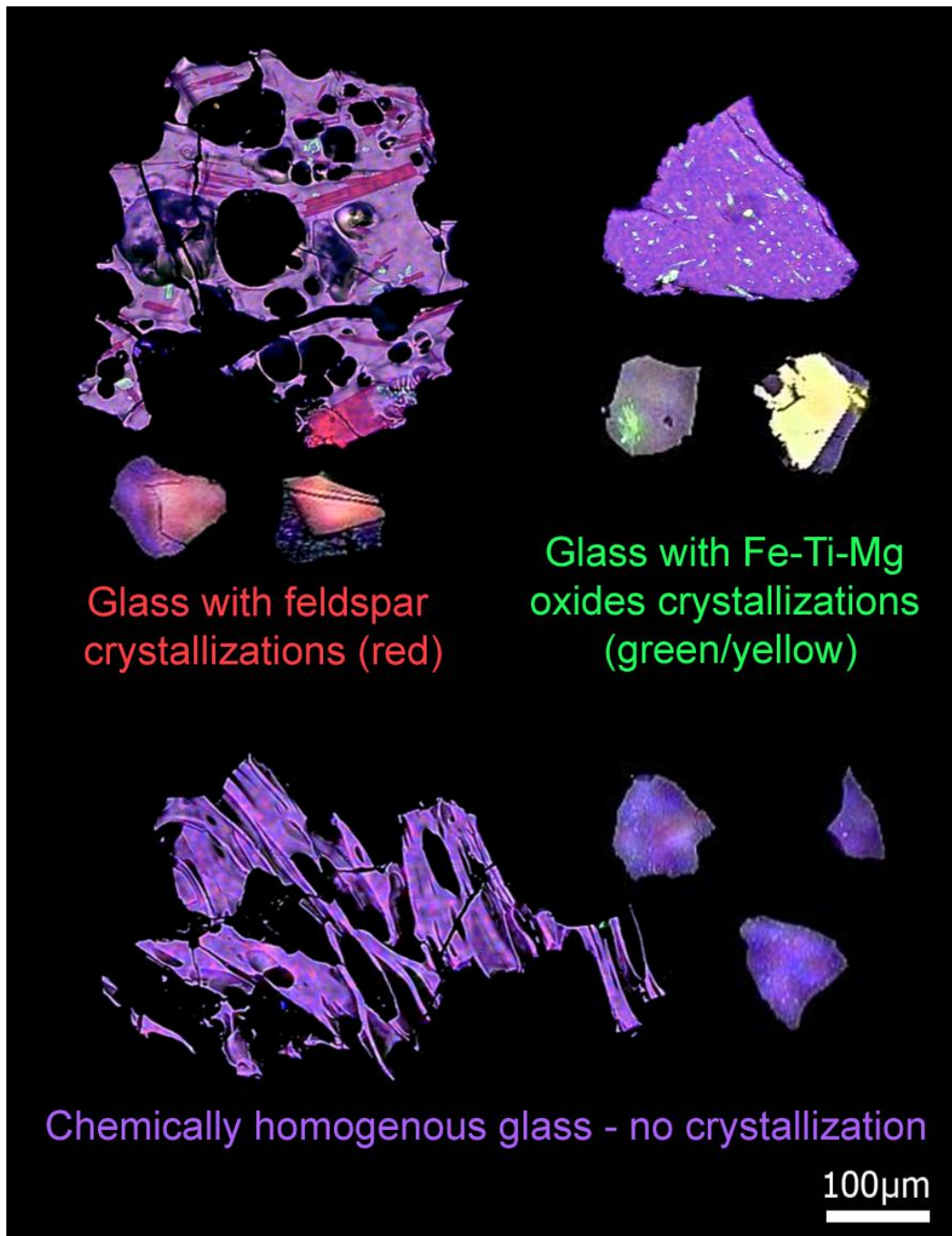
L.D.F. was supported by CONICYT (doctoral scholarships No. 21110037 and 78130011), the Universidad de Concepción (mobility grant, Dirección de Postgrado), the University of Neuchâtel (mobility grant, IDPOB) and the Wildlife Conservation Society (Karukinka grant No 2012). M.D. was supported by the μ POL-AIR project and Université de Franche-Comté PhD grant. μ POL-AIR project is supported by PRIMEQUAL program (support of French Ministry of Environment and ADEME). The authors are indebted to the two anonymous reviewers who provided useful and constructive comments that greatly improved this manuscript.



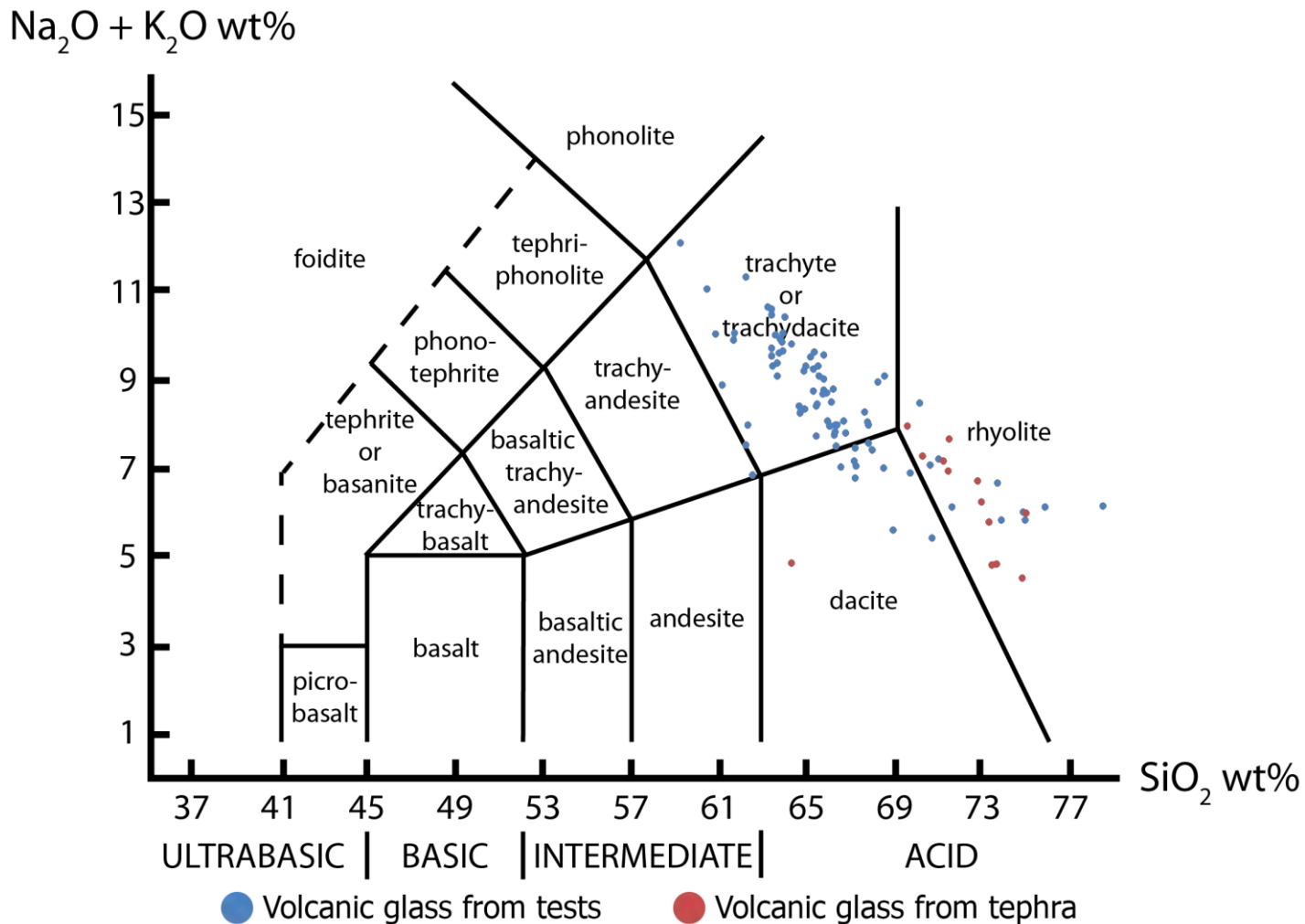
Supplementary material 1. Supplementary figure illustrating the process followed to estimate the total mineral composition of tephra and each testate amoeba shell. This figure particularly shows the procedure followed to calculate the total mineral composition in the testate amoeba species *Argynnia dentistoma* (Penard, 1890). First, we constructed a composite elemental map for the tephra sample and each species. Next, we cropped all mineral particles with the same mineral identity (i.e. those having the same color) from the elemental map. Finally, we calculated the total area (%) occupied by each mineral present in the elemental map. The mineral identity of the analyzed mineral particles was determined by comparing their chemical compositions with that of known minerals following Armynot du Châtelet et al. (2015). Elemental maps were constructed using an Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an Energy Dispersive X-ray Spectrometer and a back-scattered electrons (BSE) mode.

Supplementary material 2. Average abundances (%) for each chemical element observed in the tephra sample and each testate amoeba species. Abundance values were estimated through qualitative and quantitative elemental analyzes.

Sample / Replicas number	Data / Statistics	Si	Ti	Al	Fe	Mn	Mg	Ca	Na	K	P	S	Cl
<i>Argygnia dentistoma</i> (n=3)	Average	72.50	0.18	10.10	1.70	0.18	1.18	3.31	4.77	2.54	1.79	0.72	1.03
	SD	1.93	0.08	0.73	0.26	0.11	0.19	0.35	0.43	0.28	0.04	0.02	0.21
<i>Centropyxis constricta</i> (n=3)	Average	51.61	0.73	17.10	4.37	0.34	2.50	6.17	10.90	3.88	0.89	0.22	1.30
	SD	1.70	0.15	0.57	0.68	0.25	0.13	1.10	0.99	0.35	0.36	0.07	0.45
<i>Centropyxis ecornis</i> (n=3)	Average	50.94	0.37	15.02	10.54	2.40	2.23	3.34	10.16	3.26	0.73	0.22	0.78
	SD	0.82	0.02	0.42	0.86	0.59	0.19	0.15	0.07	0.13	0.09	0.06	0.15
<i>Centropyxis elongata</i> (n=3)	Average	53.11	0.61	17.38	4.03	0.29	1.83	4.42	10.40	4.28	1.39	0.45	1.81
	SD	1.78	0.19	0.82	0.31	0.03	0.39	0.47	0.56	0.33	0.52	0.35	0.63
<i>Centropyxis orbicularis</i> (n=3)	Average	56.24	1.56	16.73	4.33	0.44	1.78	3.23	9.52	3.87	1.08	0.31	0.91
	SD	1.80	1.23	0.48	0.49	0.24	0.05	0.22	0.45	0.15	0.13	0.12	0.26
<i>Centropyxis sylvatica</i> (n=3)	Average	51.58	0.40	17.46	3.95	0.72	3.21	4.77	11.61	3.58	1.34	0.41	0.97
	SD	3.03	0.05	0.29	0.57	0.39	1.37	1.76	0.66	0.59	0.34	0.10	0.13
<i>Cyclopyxis eurystoma</i> (n=3)	Average	39.43	0.52	17.44	7.99	0.64	3.30	8.40	12.03	5.08	1.92	0.42	2.82
	SD	1.47	0.05	1.11	1.11	0.12	0.50	0.52	0.29	0.30	0.44	0.20	0.70
<i>Diffflugia cf. bryophila</i> (n=3)	Average	53.38	0.53	16.26	5.15	0.66	2.39	2.66	12.13	4.01	1.05	0.35	1.43
	SD	0.17	0.06	0.14	0.61	0.14	0.26	0.46	0.15	0.19	0.42	0.18	0.51
<i>Diffflugia cf. lacustris</i> (n=3)	Average	54.84	0.65	16.73	3.71	0.58	1.90	3.25	10.97	4.70	0.83	0.28	1.57
	SD	0.39	0.13	0.30	0.62	0.04	0.09	0.44	0.91	0.26	0.26	0.12	0.30
<i>Diffflugia cf. lata</i> (n=3)	Average	54.94	0.61	16.36	3.78	0.46	1.72	3.56	10.93	4.69	1.22	0.33	1.41
	SD	1.77	0.18	0.21	0.38	0.34	0.05	0.45	0.17	0.33	0.14	0.05	0.34
<i>Diffflugia cyphodera</i> (n=3)	Average	52.84	0.62	15.92	7.04	0.39	2.17	2.80	11.87	4.08	0.82	0.26	1.19
	SD	2.15	0.16	0.30	1.19	0.20	0.25	0.36	0.63	0.57	0.11	0.04	0.40
<i>Diffflugia oblonga</i> (n=3)	Average	54.41	0.61	16.30	5.27	0.49	2.05	3.19	11.28	4.24	0.72	0.30	1.12
	SD	0.39	0.16	0.22	0.75	0.25	0.29	0.27	0.21	0.54	0.51	0.21	0.22
<i>Diffflugia sp.</i> (n=3)	Average	42.65	1.29	16.36	5.89	0.64	3.29	7.59	11.59	5.10	1.22	0.66	3.72
	SD	2.66	0.91	2.31	1.24	0.16	0.58	1.61	2.44	1.71	0.65	0.30	1.96
<i>Heleopera sylvatica</i> (n=3)	Average	55.84	0.59	16.72	3.04	0.25	1.93	3.22	11.28	4.38	0.82	0.31	1.62
	SD	1.74	0.08	0.20	0.12	0.17	0.30	0.70	1.27	0.62	0.36	0.13	0.67
<i>Padaungiella sp.</i> (n=3)	Average	64.24	0.30	4.86	1.17	0.40	2.50	4.11	8.82	4.83	2.38	1.34	5.05
	SD	6.93	0.14	0.22	0.25	0.28	0.57	0.21	2.43	2.17	0.66	0.25	2.30
<i>Plagiopyxis declivis</i> (n=3)	Average	56.32	0.68	16.44	4.12	0.39	1.53	3.35	10.10	4.82	0.71	0.13	1.41
	SD	1.38	0.08	0.43	0.44	0.04	0.14	0.95	0.42	0.71	0.02	0.04	0.21
<i>Schwabia regularis</i> (n=3)	Average	41.91	0.72	13.83	4.48	0.12	4.46	9.79	11.19	5.08	2.90	1.46	4.04
	SD	8.70	0.17	1.88	0.50	0.04	1.26	1.20	2.54	2.94	1.01	0.67	2.48



Supplementary material 3. Internal chemical heterogeneity of the volcanic glass particles composing the analyzed tephra sample. Particles were photographed using an Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an Energy Dispersive X-ray Spectrometer and a back-scattered electrons mode. Particles were treated with epoxy resin and then diamond polished before being photographed.



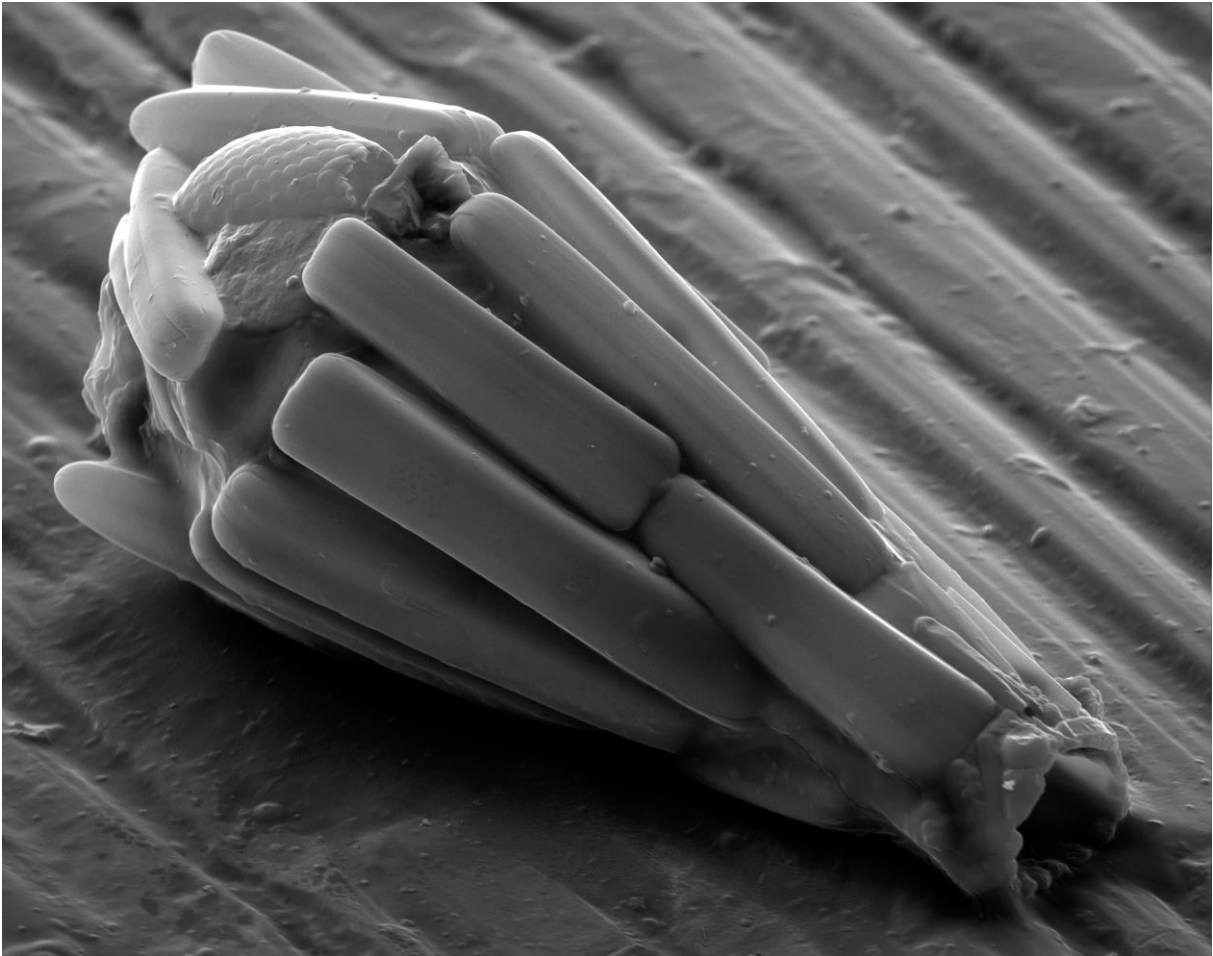
Supplementary material 4. A Total Alkali Silica diagram (Le Maitre et al. 2002) showing the volcanic glass types composing the tephra sample and testate amoebae shells collected in the Puyehue National Park, Chile. This diagram is the result of point elemental analyzes conducted only on transversely cut volcanic glass particles composing the tephra sample and testate amoeba shells. Point elemental analyzes were conducted using an Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an Energy Dispersive X-ray Spectrometer and a back-scattered electrons (BSE) mode (i.e. a quantitative elemental analysis).

Oxides weight %	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	FeO	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	Chemical formula
QUARTZ (n=1)	93.35	0.00	2.75	0.82	0.00	0.79	0.64	1.37	0.27	SiO ₂
FELDSPAR PLAGIOCLASE										NaAlSi ₃ O ₈ – CaAl ₂ Si ₂ O ₈
Bytownite (n=1)	44.59	0.63	30.19	1.72	0.59	1.05	17.30	3.45	0.49	(70%<%Ca<90%)
Labradorite (n=1)	49.34	0.36	29.31	1.62	0.34	1.40	12.12	5.25	0.25	(50%<%Ca<70%)
Andesine (n=1)	57.04	0.59	23.89	1.60	0.67	0.62	9.35	5.49	0.76	(30%<%Ca<50%)
Oligoclase (n=1)	51.30	0.61	25.61	1.95	0.57	2.53	5.57	10.98	0.88	(10%<%Ca<30%)
OXIDES										
Fe oxide* (n=1)	7.48	0.89	4.54	76.14	0.47	3.13	1.14	5.79	0.41	FeO
Fe-Ti oxide* (n=1)	1.46	16.26	2.20	76.01	0.38	2.38	0.00	1.25	0.05	Fe ₂ O ₃ + TiO ₂
Ilmenite* (n=1)	18.54	37.32	4.31	35.24	0.76	1.33	0.27	1.53	0.71	FeTiO ₃
GLASS (n=95)										non-crystalline
AVERAGE	67.24	0.81	15.65	4.03	0.50	1.53	2.05	5.19	3.00	
SD	3.97	0.23	1.87	1.25	0.35	0.62	0.88	1.78	0.71	

*Correspondance between determined minerals and optimal chemical formula is not perfect because of analytical conditions. These variations are mainly caused by silicates contamination, especially on thin particles.

Supplementary material 5. Mineral diversity of particles agglutinated by analyzed testate amoebae. Results are given in oxides weight (%SiO₂, %TiO₂, %Al₂O₃, %FeO, %MnO, %MgO, %CaO, %Na₂O and %K₂O). An example of point elemental analysis has been selected (among 161 realized on testate amoebae) for each crystallized mineral characterized. For non-crystalline mineral (here volcanic glass), an average has been calculated on n=95 point elemental analyzes identified as volcanic glass.

Discussion générale



Les différentes études menées dans le cadre de cette thèse ont permis d'aborder i/ les aspects méthodologiques pour l'étude de la composition des thèques d'amibes à l'aide de la microscopie électronique à balayage couplée à des microanalyses EDS (Chapitre 2) ; ii/ la variabilité *in situ* de la composition minéralogique des grains composants la thèque d'une espèce d'amibe à thèque xénosomique, *Bullinularia indica*, prélevés dans *Sphagnum capillifolium* (Chapitre 3) ; iii/ l'utilisation chez cette espèce de particules minérales apportées lors de dépôts artificiels pour constituer sa thèque (Chapitre 4) ; enfin, iiiv/ le potentiel de bio-indication des thèques d'amibes exposées à des retombées particulières d'origine volcanique (Chapitre 5).

En raison du choix de présenter ce document comme un recueil de publications incluant à chaque fois une discussion des résultats, la présente discussion générale aura surtout pour objectifs de synthétiser les apports significatifs de nos travaux, de mettre en évidence les observations communes à ces différentes études et, quand c'est possible, les comparer avec d'autres résultats de recherches antérieures.

Cette présente partie s'articulera autour de trois questions, à savoir :

- 1/ Quelles sont les optimisations techniques apportées dans le cadre de cette thèse pour l'observation et la caractérisation des thèques d'amibes ?
- 2/ Quels sont les paramètres permettant l'intégration des particules minérales d'origine atmosphérique chez les amibes à thèque ?
- 3/ Est-il pertinent d'utiliser les thèques d'amibes comme indicateurs de dépôts atmosphériques particuliers ?

1 QUELLES SONT LES OPTIMISATIONS TECHNIQUES APPORTÉES DANS LE CADRE DE CETTE THÈSE POUR L'OBSERVATION ET LA CARACTÉRISATION DES THÈQUES D'AMIBES ?

1.1 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE AVEC EDS

La technique analytique basée sur l'utilisation d'un MEB-EDS pour observer et analyser les thèques d'amibes a été systématiquement employée pour mener à bien les études présentées dans les chapitres 3, 4 et 5. Elle a notamment permis de caractériser le contenu minéral, organique et biominéral d'espèces xénosomiques (Chapitres 3, 4 et 5) et la diversité de nature et de taille des grains des thèques créées par des espèces idiosomiques (Chapitre 2). De la même façon, l'analyse des thèques d'amibes xénosomiques provenant de la réserve naturelle Puyehue (Chili, Chapitre 5) a contribué à quantifier et qualifier l'intégration des fines particules atmosphériques d'origine volcanique (cryptotephras).

La microscopie à balayage a commencé à être appliquée couramment pour la description des thèques dès la fin du XXème siècle (Ogden et Hedley, 1980). Avant son utilisation, la description des thèques était effectuée à l'aide de simples microscopes optiques et les observations reproduites sous la forme de monographies. Depuis les années 80, le matériel utilisé évolue et permet l'obtention d'images à l'aide du signal des électrons rétrodiffusés et la possibilité d'effectuer des analyses élémentaires. Ces avancées en matière de microscopie électronique ont marqué les grandes différences entre les précédents travaux sur les thèques d'amibes (Ogden, 1984 ; Foissner et Schiller, 2001 ; Porter et al., 2003 ; Mitchell 2008) et les études plus récentes comme celles développées dans cette thèse. Actuellement, la technique du MEB-EDS est encore peu employée pour l'étude de la composition chimique des thèques d'amibes (Armynot du Châtelet *et al.*, 2010), alors qu'elle est plus fréquemment utilisée pour l'observation des tests des foraminifères agglutinants qui sont des protistes proches de certaines amibes à thèque (Coimbra et al., 2009 ; Armynot du Châtelet et al., 2013a-b, Mancin et al., 2015, Stefanoudis et al., 2016). Au cours de ces travaux de thèse, plusieurs moyens de préparation des thèques (choix du support et de la métallisation) ont été testés afin d'améliorer la visualisation de ces objets (Chapitre 2). A l'issue de nombreux tests, il apparaît que la méthode la plus efficace pour effectuer des images précises de la surface des thèques est l'utilisation d'une lame de verre comme support, suivie d'une métallisation à l'or-palladium. En revanche, lorsque des analyses chimiques sur les thèques sont requises, il est recommandé d'utiliser des pastilles en

carbone comme support, suivie d'une métallisation au carbone de la thèque. Cette comparaison des différentes méthodes préparatoires, dont certaines sont issues de protocoles utilisés pour les foraminifères (Armynot du Châtelet et al., 2013b), n'avait encore jamais été réalisée pour les études de caractérisation des thèques d'amibes (ni de celle des autres microfossiles pour lesquels cette technique peut s'appliquer).

1.2 ANALYSE D'IMAGES

Dans les différentes recherches développées au cours de cette thèse, des analyses d'images ont pu être réalisées à la fois à l'aide (1) des images secondaires (SEC), par exemple pour les mesures des dimensions des thèques de *Bullinularia indica*, (2) des images à partir des électrons rétrodiffusés (BSE), par exemple pour l'estimation de la distribution granulométrique des grains minéraux des thèques et (3) des images composites EDS, pour quantifier les différentes proportions de chaque minéral (ou groupe de minéraux) des thèques. Ce genre de techniques n'avait été appliqué qu'une seule fois aux amibes à thèque (Armynot du Châtelet et al., 2010), bien qu'il ait été utilisé de manière répétée pour les foraminifères agglutinants (voir par exemple Gooday et al., 2010, Armynot du Châtelet et al., 2013b, Mancini et al., 2015, Stefanoudis et al., 2016). Des informations quantitatives à partir d'images étaient indispensables pour mener à bien les différents travaux précédemment décrits. L'optimisation des techniques a permis l'analyse en routine des thèques d'amibes et l'acquisition d'une base de données conséquente (images, cartographies et points d'analyse EDS). Au fil de l'obtention et du traitement des images au cours de la thèse, cette acquisition de données a permis de prendre conscience que les seules vraies limites des analyses d'images sont liées à la qualité/quantité des informations contenues dans les images brutes (e.g. résolution, nombre de Bits).

Un autre point important à évoquer est le temps nécessaire pour traiter les images et en extraire des données quantitatives. Globalement, les améliorations techniques ne permettent pas un gain de temps à l'analyse. Ce temps nécessaire pour analyser les thèques et traiter les images, qui peut être un frein majeur lorsqu'il s'agit de travailler sur un grand nombre de thèques, peut-être estimé à environ 3 heures par thèque (sur la base d'un échantillon de 50 thèques). Cette durée correspond au temps nécessaire pour préparer les thèques, acquérir les images, les traiter et identifier les minéraux. Il peut être variable en fonction de la taille des thèques (plus elles sont petites, plus elles sont difficiles à extraire et à analyser) et de leur quantité dans l'échantillon (il faudra plus de temps pour extraire un nombre suffisant d'individus dans le cas d'une espèce faiblement représentée dans l'échantillon). Il est donc évident, avant de lancer une expérience et fixer le nombre de thèques à prélever et analyser, de faire une pré-estimation du temps analytique et du traitement des images. Ce point est

primordial quand on sait qu'il faut un nombre élevé d'individus pour minimiser la variabilité intra-spécifique de la composition des thèques (Chapitre 3). Ce nombre minimal de répliques est à adapter en fonction des objectifs de l'expérience. Ainsi, Fiałkiewicz-Kozieł et al. (2015) et Armynot du Châtelet et al. (2015) utilisent un faible nombre de d'individus par espèce (n=1 à 2) dans leurs études, alors que résultats obtenus dans le cadre de notre travail montrent que la variabilité de la composition des thèques peut être forte chez certaines espèces xénosomiques telle que *Bullinularia indica* (cf Chapitre 3). Pour les études interprétant la composition des thèques d'une seule espèce, il est donc nécessaire d'analyser un nombre élevé de thèques.

2 QUELS SONT LES PARAMÈTRES PERMETTANT L'INTÉGRATION DES PARTICULES MINÉRALES D'ORIGINE ATMOSPHÉRIQUE CHEZ LES AMIBES À THÈQUE?

2.1 TAILLE DES PARTICULES

Deux études, préalables à ces travaux de thèse, avaient examiné la distribution des grains utilisés par des amibes xénosomiques, pour la construction de leur thèque : Armynot du Châtelet et al. (2010) et (2013). Ces recherches, portant sur des amibes xénosomiques lacustres, ont montré que les particules utilisées par les amibes à thèques étaient fines (majoritairement inférieures à 10µm de diamètre selon Armynot du Châtelet et al. (2010) ce qui correspond à un volume voisin de 100µm³ (Armynot du Châtelet et al., 2013). Cependant, aucune étude n'avait jusqu'à présent été réalisée sur des amibes à thèques xénosomiques des sphaignes des tourbières. Nos études montrent que *Bullinularia indica*, l'espèce xénosomique choisie dans la tourbière étudiée (Chapitres 3 et 4), utilise des particules minérales inférieures à 15µm (95% des particules analysées dans les 38 thèques de cette espèce ont une taille inférieure à 15µm), avec une gamme de taille préférentielle voisine de 4 µm. Ces conclusions vont donc également dans le sens d'une sélection des particules par l'amibe en fonction de leur taille.

Ces résultats (Chapitre 3) ont permis de définir la taille des particules présentes dans les lots utilisés et décrits au Chapitre 4. La sélection des grains minéraux selon leur nature et la gamme de taille des particules utilisées par *B. indica* ne concernent que cette espèce et ne sont pas représentatifs de l'ensemble des espèces d'amibes à thèques xénosomiques.

2.2 NATURE DES PARTICULES

Peu d'études ont été effectuées sur la composition des thèques en se basant sur des microanalyses élémentaires (Jeanson et Coûteaux, 1977 ; Von Karl Rauenbusch, 1987). Ces recherches ont caractérisé la chimie globale des thèques, sans en détailler les minéraux qui les composent. Dans le cadre d'une identification de la diversité minérale des thèques d'amibes, seules deux études appuyées par des analyses MEB-EDS ont été réalisées par Armynot du Châtelet et al. (2010, 2013) sur des amibes lacustres. Neuf minéraux sont identifiés dans l'étude de 2010, puis quatre autres supplémentaires en 2013. Dans Armynot du Châtelet et al. (2015, en annexe), 24 minéraux différents ont été identifiés dans 7

espèces d'amibes à thèques (idiosomiques et xénosomiques) provenant de plusieurs tourbières à sphaignes. Au sein des études menées au cours de cette thèse, ce sont au total 18 minéraux différents qui ont été identifiés dans des individus d'une seule espèce, *Bullinularia indica*. Une grande partie de ces 18 minéraux sont communs avec ceux détectés dans Armynot du Châtelet et al. (2015). Les différences proviennent majoritairement des minéraux de la famille des amphiboles qui ont pu y être analysés et identifiées. Dans le Chapitre 3, les résultats indiquent également que *Bullinularia indica* est capable d'utiliser une large variété de grains organiques et de microsquelettes d'autres microorganismes (e.g. diatomées et petites espèces d'amibes à thèque idiosomiques). Bien que la thèque de cette espèce soit connue pour être constituée d'éléments très variables par leur nature et par leurs couleurs (Ogden et Hedley, 1980 ; Meisterfeld, 2008), aucune étude n'avait encore été réalisée pour exposer cette diversité à l'échelle des grains. L'ensemble de ces résultats démontrent que les amibes à thèques sont capables d'intégrer une importante gamme de particules de natures différentes. De plus, les résultats présentés aux Chapitres 4 et 5 montrent que ces particules peuvent être sélectionnées par l'amibe en fonction de leur nature. Ainsi, la phlogopite n'est pas sélectionnée par *B. indica*, même lorsque les apports artificiels de particules sont élevés (Chapitre 4). Par contre, le verre volcanique émis par les récentes éruptions de volcans chiliens est retrouvé en grande quantité dans les thèques des 17 espèces analysées proches de la source (Chapitre 5). Mancin et al. (2015) ont montré que des espèces de foraminifères agglutinants sont aussi capables d'utiliser des particules de verre volcanique pour construire leur test, et qu'une espèce en particulier, *Karrerella novangliae*, est capable de sélectionner et de privilégier ce type de fragment. Ces observations dans des microorganismes proches des amibes à thèques xénosomiques confortent la nécessité de mieux comprendre les processus de sélection des grains. La nature des particules est donc un paramètre important à prendre en compte dans l'observation de la diversité minérale des thèques.

2.3 TYPE DE SOURCE PARTICULAIRE

Les résultats présentés au Chapitre 4, montrent que les particules minérales utilisées par *Bullinularia indica*, dans des buttes de sphaignes d'une tourbière ombrotrophe, ont une gamme de taille et un assemblage minéralogique plus proche des dépôts particuliers atmosphériques que des particules minérales constituant le substrat tourbeux. Ces observations ont justifié le choix de la méthode de dépôts particuliers artificiels par dispersion (en voie humide) au-dessus de *Sphagnum capillifolium*. Dans le chapitre 5, la source des particules recherchées est connue (les volcans voisins) et a une signature chimique et minéralogique précise. En revanche dans la tourbière dans laquelle les autres études ont été réalisées, le contexte géologique est plus varié avec des sources

nombreuses, proches ou plus distantes. Armynot du Châtelet et al. (2015) a montré que la nature des particules semble être le reflet de l'environnement géologique et que leur taille pourrait être en relation avec la distance à leur source. Ici, ces conclusions sont nuancées. Ainsi, les conditions d'acidité de la tourbière semblent entraîner la disparition des particules carbonatées, qui constituent pourtant le composant majeur du socle sur lequel repose la tourbière et ses environs. Même avec une bonne connaissance du contexte minéralogique, les conditions physico-chimiques de l'environnement dans lequel se développent les amibes à thèques xénosomiques sont donc un autre paramètre important à prendre en compte. Elles conditionnent la stabilité des minéraux et leur intégration dans les thèques.

Les particules très fines utilisées par les amibes xénosomiques posent le problème de la détermination de la distance à la source. Les vents sahariens peuvent transporter des particules de 20 μ m sur plusieurs centaines de kilomètres (Skonieczny et al., 2011) et les cryptotéphras inférieurs à 80 μ m peuvent avoir parcouru 850 km en seulement une journée après leur relargage dans l'atmosphère (Stevenson et al., 2015). Connaître précisément le type de source peut donc s'avérer difficile surtout si ce sont des minéraux communs.

Le traçage de la source des particules contenues dans les thèques pourrait être abordé en tenant compte de plusieurs conditions : (1) connaître précisément la composition chimique des particules tracées, (2) avoir une composition qui ne soit pas ou peu sensible aux phénomènes d'altération pouvant survenir lors de son transport et son dépôt ou dans le milieu récepteur et (3) l'identité chimique des particules doit être suffisamment singulière (e.g. signature isotopique). Enfin, même en remplissant l'ensemble de ces conditions, il reste deux paramètres incontrôlables : le biais biologique (lié au hasard) ou simplement l'absence de sélection du minéral par l'amibe.

3 EST-IL PERTINENT D'UTILISER LES THÈQUES D'AMIBES COMME INDICATEURS DE DÉPÔTS ATMOSPHÉRIQUES PARTICULAIRES ?

Les résultats des différentes études menées dans le cadre de cette thèse ont montré qu'il existe une étroite relation entre les apports particuliers atmosphériques, qu'ils soient naturels ou artificiels, et la composition des thèques d'amibes xénosomiques. Un apport de minéraux allochtones contribue à modifier l'assemblage minéralogique « naturel ». Lorsque ces apports sont élevés, comme pour les cryptotéphras consécutifs à de violentes éruptions volcaniques, il apparaît que les thèques d'espèces appartenant au genre *Diffugia*, qui sont la plupart du temps composées essentiellement de quartz, de feldspaths et de micas (Armynot du Châtelet et al., 2010, 2013), ont une thèque de composition minérale significativement différente, majoritairement composée de verre volcanique. Dans l'étude relatée au Chapitre 4, des particules traçantes ont été détectées dans les thèques dès le premier mois d'expérience, et les proportions de thèques contenant certains minéraux traçants peuvent atteindre 92%. Ces résultats confirment la rapidité d'intégration par les amibes de minéraux provenant d'un dépôt humide de minéraux particuliers. Un flux de particules minérales spécifiques pourrait donc être détecté, sous réserve d'analyser un nombre suffisant de thèques. Une des idées soulevées par ces observations serait d'essayer d'élaborer un modèle d'intégration de particules qui serait fonction de leur nature, de leur quantité dans les thèques. Le modèle pourrait être adapté pour toutes les espèces d'amibe xénosomiques. Pour cela, il faut tenir compte de plusieurs paramètres environnementaux : par exemple la pluviométrie, la pluie pouvant lessiver les dépôts particuliers, ou la température, celle-ci déterminant le taux de reproduction des amibes ou leur enkystement (Tsyganov et al., 2012, Jassey et al., 2016). Ces modèles d'intégration de particules pourraient s'avérer très utiles dans les études en écologie, en permettant par exemple de calculer des taux de reproduction en fonction de la quantité de certaines particules dans les thèques sous un flux particulaire connu.

Nos études ont porté sur des minéraux naturels. Fiałkiewicz-Kozieł et al. (2015) ont montré que le potentiel de bio-indication des amibes à thèques des tourbières ne se limite pas uniquement à ces minéraux, mais peut s'étendre aux particules polluantes, en l'occurrence celles qui sont issues de la combustion du charbon. Dans les reconstructions paléo-environnementales holocènes, des microparticules de charbon (Bony et al., 2015) ou des grains de pollen (Calò et al., 2012) sont utilisés par les amibes xénosomiques. L'ensemble de ces observations plaide pour l'utilisation des thèques d'amibes pour caractériser des flux particuliers actuels (et éventuellement anciens).

Les travaux effectués dans cette thèse ont porté essentiellement sur l'espèce *Bullinularia indica* (Chapitre 3 et 4). Les observations constatées à l'échelle intra-spécifique apportent des réponses qui ne sont pas forcément applicables à l'ensemble des thèques d'amibes xénosomiques. Le Chapitre 5, se plaçant à une échelle inter-espèces, montre néanmoins que certains mécanismes d'intégration de particules, et notamment la sélection des grains en fonction de leur nature, est commune à plusieurs espèces.

Les résultats de l'étude du Chapitre 3 montrent que la variabilité intra-spécifique de la composition des thèques de *B. indica* est assez forte, d'où la nécessité d'analyser un échantillon d'individus conséquent avant de tirer des conclusions. Cette variabilité n'est pas connue pour les autres espèces d'amibes à thèque. Le rôle indicateur est donc à discuter espèce par espèce, d'où la nécessité d'étendre ces études de variabilité intra-spécifique à d'autres espèces et d'autres environnements pour combler ce manque cruel d'informations. Pour qu'une espèce puisse être considérée comme un bon bio-indicateur, il faut donc que sa variabilité intra-spécifique soit faible, ou au moins bien connue (pour pouvoir déterminer le nombre de répliques nécessaires). Dans l'hypothèse d'une forte variabilité inter-spécifique, certaines espèces pourraient s'avérer être indicatrices d'un élément particulier. Cette hypothèse est d'autant plus crédible qu'une sélection des particules en fonction de leur nature a été démontrée (Chapitre 4) et existe chez *B. indica* (au moins).

Il existe 3 freins à l'utilisation des thèques d'amibes en bio-indication :

- 1) Tout d'abord, les conditions physico-chimiques de leur milieu de vie, qui peuvent conduire à la mauvaise préservation de certains minéraux (e.g. acidité des tourbières qui dissout les carbonates) et donc à leur absence dans les thèques ;
- 2) La présence ou absence d'espèces recherchées, qui peut rendre difficile la faisabilité des prélèvements dans un environnement donné, ou l'obtention d'un nombre suffisant de répliques (un faible nombre de thèques analysées conduit à un problème de puissance d'analyse statistique) ;
- 3) Ensuite, la capacité de sélection des particules par les amibes en fonction de leur nature (Chapitre 4). En effet, si elles sont capables de sélectionner ces particules, jusqu'à quel point peut-on considérer que l'assemblage minéralogique des thèques reflète son environnement ?

Ces éléments constituent des limites de l'utilisation des thèques en bio-indication dans l'actuel état des connaissances. Pour pouvoir pleinement tirer parti de l'étude de ce que traduisent les objets qui composent les thèques, il serait nécessaire de disposer de plus de recul sur la façon dont les espèces utilisent et sélectionnent les grains. Les études développées au cours de cette thèse ne font que mettre en lumière les possibilités bio-indicatrices de l'étude de la composition des thèques, une seule espèce, *Bullinularia indica*, ayant été examinée dans le détail, alors que Décloitre (1986) estime la diversité des amibes à thèque à au moins 2000 espèces.

Conclusions et Perspectives



1 CONCLUSIONS

Ce travail de recherche constitue une approche originale, à l'interface entre l'écologie des microorganismes et les géosciences. En effet, l'utilisation des amibes à thèques xénosomiques comme bio-indicateurs des particules présentes dans leur environnement (dans le tapis de sphaignes ou issues de dépôts secs ou humides d'origine atmosphérique) a encore été très peu abordé. En ce sens, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse portant sur l'utilisation de la capacité des amibes à thèques xénosomiques à intégrer des particules minérales transportées par voie atmosphérique constituent une approche novatrice permettant d'envisager différents développements possibles. En particulier, la mise en évidence d'un lien entre la nature minérale des apports particulaires d'origine atmosphérique et leur intégration par les amibes à thèque n'avait encore jamais été abordée.

Les travaux menés au cours de cette thèse permettent de dégager cinq conclusions majeures :

- Taille des particules : La taille des particules minérales intégrées dans la thèque xénosomique de *Bullinularia indica* est similaire à celle des particules minérales transportées dans l'atmosphère. Les particules de grande taille ($> 15 \mu\text{m}$) ne sont quasiment jamais intégrées.
- Nature des éléments intégrés : Les particules minérales intégrées dans les thèques sont des silicates stables dans les conditions physico-chimiques des tourbières, des bryophytes et des sols étudiés. Ces minéraux peuvent être des phases cristallisées (par exemple le quartz) ou amorphe (verres volcaniques). Certains minéraux, même lorsqu'ils sont présents à forte concentration, ne sont jamais intégrés par les amibes. Il s'agit de certains micas qui contiennent à la fois du potassium et du magnésium, tels que la phlogopite ou la biotite.
- Origine des particules : Les amibes peuvent intégrer des particules minérales et organiques issues d'une source locale ou plus distante. Les particules possédant une signature singulière pourraient être utilisées pour identifier leur origine et permettre ainsi de déterminer la distance de transport jusqu'au milieu récepteur
- Dynamique d'intégration des particules : Les amibes intègrent des particules au cours de leur division suivant une cinétique qui pourrait probablement être modélisée en effectuant des investigations complémentaires. L'introduction de particules traçantes

pourrait notamment permettre de mieux évaluer la vitesse de reproduction des amibes *in situ*.

- Capacité de Bio-indication des particules intégrées dans les thèques : La combinaison des observations portant sur la taille, la forme et la nature des particules utilisées par des amibes xénosomiques permettent de poser les bases de l'utilisation des amibes à thèques pour la bio-indication de la qualité des dépôts particulaires récents ou anciens

2 PERSPECTIVES À COURT TERME

Ce travail de thèse permet de proposer des pistes de réflexion pour des recherches futures susceptibles d'améliorer la compréhension sur la diversité des processus de construction des thèques d'amibes. De nombreux travaux expérimentaux *in situ* et en conditions contrôlées pourraient permettre d'acquérir des informations complémentaires sur la biologie des amibes à thèque en général et sur leur capacité d'intégration des particules en particulier. Le panel des expérimentations futures est vaste, parce qu'il serait nécessaire de prendre en compte la diversité des amibes xénosomiques, dans des habitats variés et comprenant l'étude d'un plus large panel de particules minérales.

Parmi cet éventail de futures recherches possibles, des choix sont nécessaires et quelques axes de recherches, qui me semblent prioritaires, sont proposés ici :

Les résultats obtenus lors des différentes études menées dans le cadre de cette thèse plaident pour l'utilisation des thèques d'amibes comme bio-indicateurs. Cependant, une seule espèce xénosomique, *Bullinularia indica*, a fait l'objet d'une recherche approfondie sur la composition en grains minéraux de sa thèque ainsi que de ses affinités d'intégration envers certaines natures de particules. Les études complémentaires que j'envisage de mener à court terme sont d'approfondir ces données en utilisant d'autres amibes xénosomiques ou en testant notamment des apports de particules minérales anthropiques.

- Dans un premier temps, je souhaite analyser la totalité des données obtenue dans le cadre de mes travaux de thèse. Les expériences menées dans la tourbière de Frambouhans-Les Ecorces ont permis l'obtention d'un grand nombre d'échantillons et d'une base de données conséquente, dont une partie reste à exploiter. D'autres amibes xénosomiques ont été identifiées dans les prélèvements de *Sphagnum capillifolium*, dont un grand nombre d'espèces du genre *Nebela*. Ces espèces sont plus complexes à identifier que *Bullinularia indica*, mais une grande partie de cette identification a déjà pu être réalisée (Fig.1). Des analyses MEB-EDS ont également

été effectuées sur ces espèces en même temps que *Bullinularia indica*. Les résultats préliminaires, non présentés dans ce document, montrent qu'une partie de ces espèces a intégré des particules traçantes (Fig.2). Il serait donc important d'exploiter ces données afin de comparer la dynamique d'intégration de *Bullinularia indica* avec les espèces du genre *Nebela*.

- Les images BSE des espèces de *Nebela* obtenues en complément de *Bullinularia indica* permettent d'observer leur contenu idiosomique (Fig.3). Les thèques de ces espèces prédatrices présentent une large variété d'idiosomes provenant de leurs proies : *Euglypha spp*, *Corythion spp*, *Trinema spp*. J'envisage donc dans un second temps effectuer des analyses d'images avec reconnaissance de ces idiosomes, qui permettraient de tracer ces relations proies-prédateurs entre les différentes espèces citées, et complèteraient les connaissances des réseaux trophiques opérants dans les écosystèmes de tourbières.

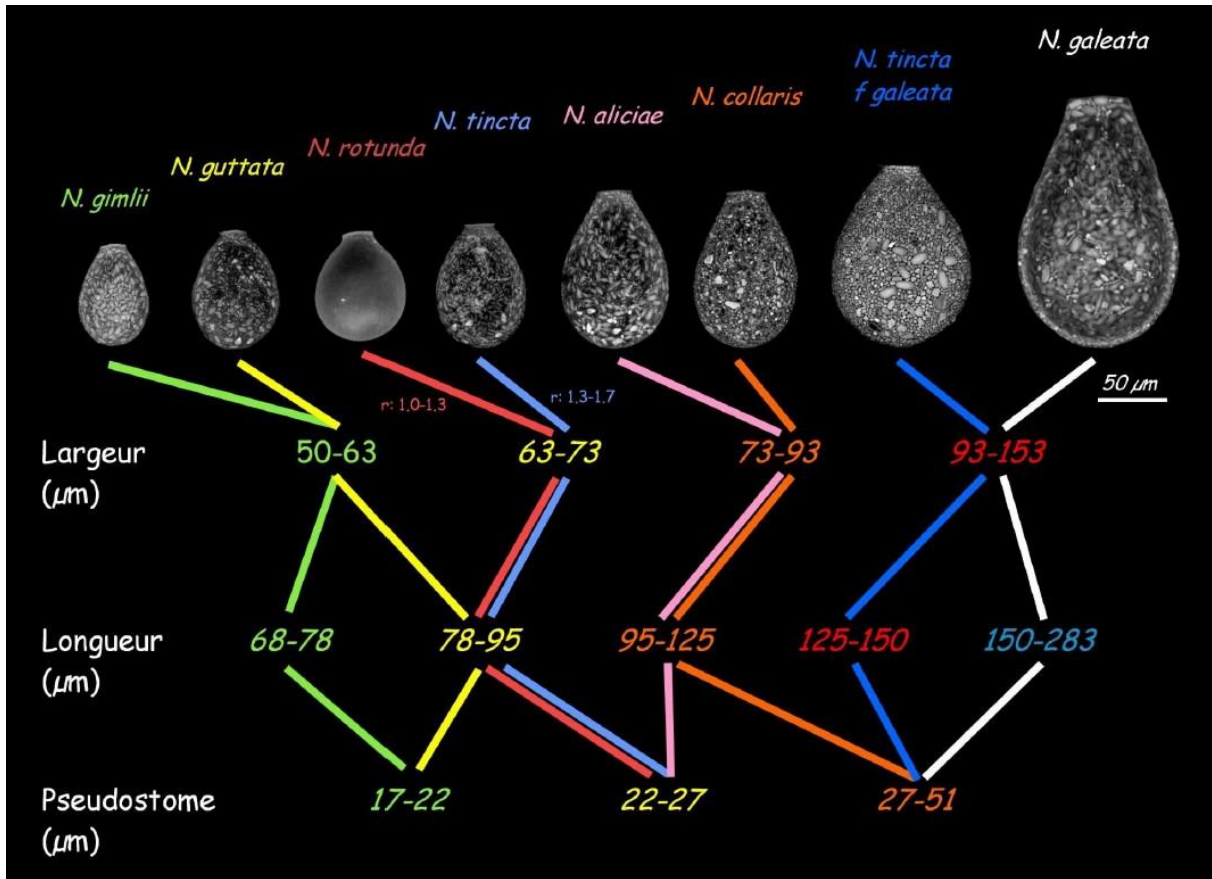


Fig. 1 - Schéma montrant les différentes espèces de *Nebela*, identifiées en fonction de 3 paramètres morphologiques : largeur de la thèque, longueur de la thèque et diamètre du pseudostome

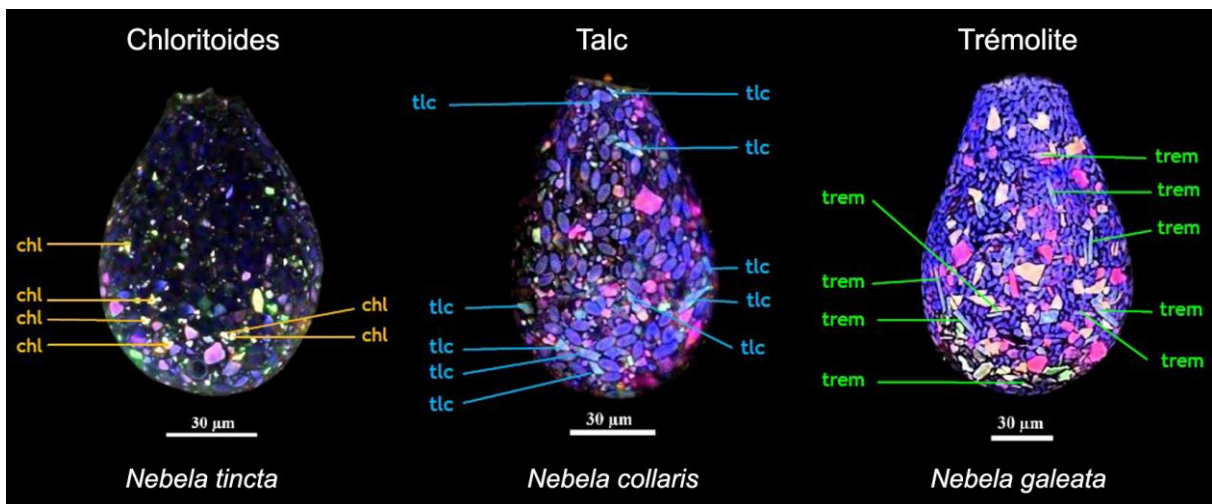


Fig.2 - Quelques exemples de particules traçantes intégrées chez les espèces du genre *Nebela* (chl=chloritoïde, tcl=talc; trem=tremolite).

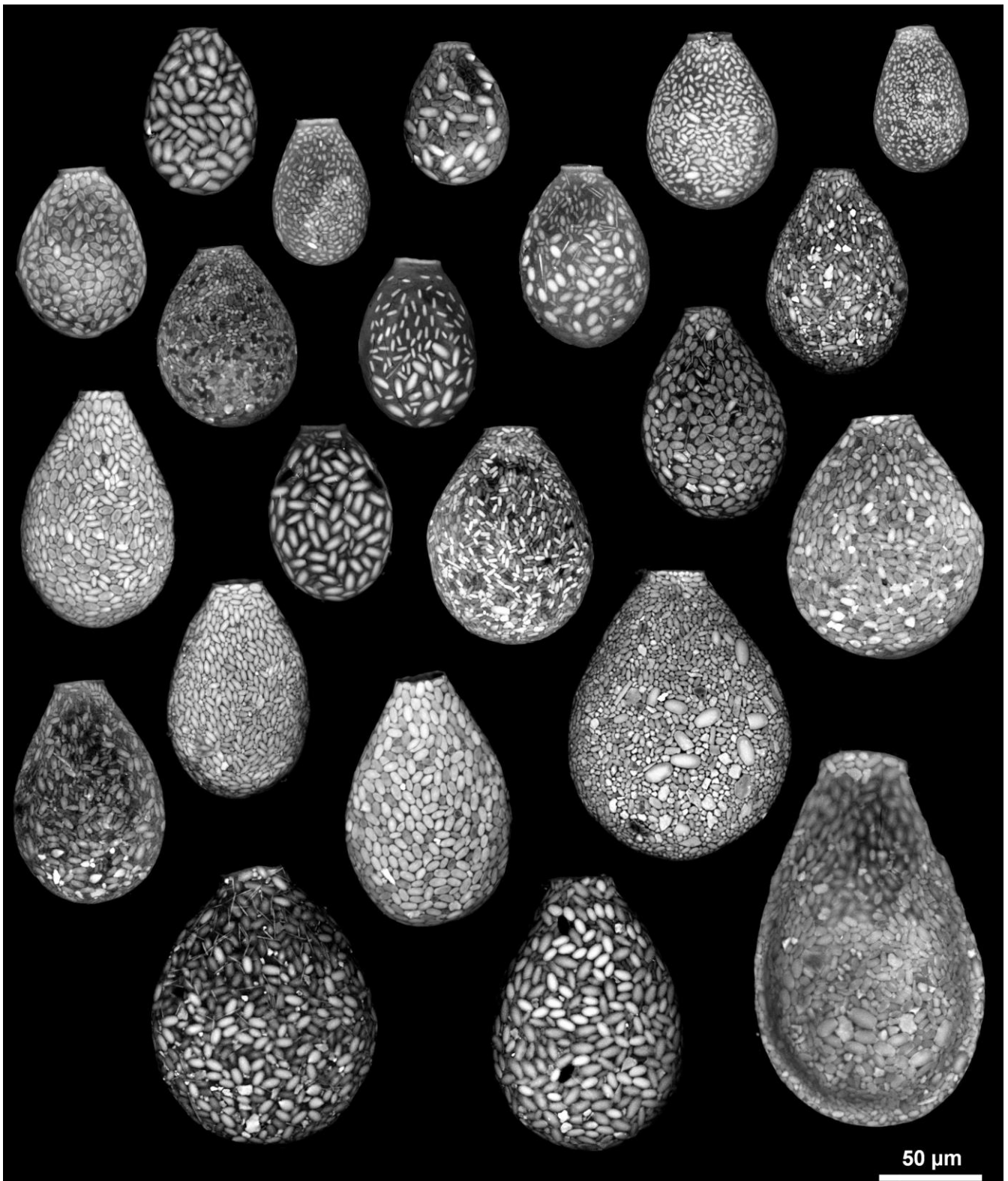


Fig.3 - Images MEB (BSE) de plusieurs individus d'amibes à thèque appartenant au genre *Nebela* et montrant la diversité de leur taille et du contenu en idiosomes issus de l'intégration des squelettes de leurs proies

- Une autre partie de mes travaux n'a pas été évoquée dans cette thèse. Parmi ces travaux, un essai d'intégration sur 6 mois de particules métalliques (cuprite Cu_2O) témoins de l'activité anthropique (car émises par les transports et l'industrie), par *B. indica*, a été tenté. Malheureusement, aucune de ces particules n'a été retrouvée dans les thèques analysées sur les 6 mois d'expérience, menée entre mai et octobre 2015. La cause de cet échec réside vraisemblablement dans les conditions climatiques (températures élevées, faible intensité des pluies) de l'année 2015, qui ont conduit à assécher considérablement la tourbière entre le mois de juin et le mois de septembre, période durant laquelle l'expérience a été menée. Ce manque d'eau a pu provoquer l'enkystement des amibes, et donc l'absence de reproduction et d'interaction avec les particules mises à leur disposition. Une autre raison, est que l'acidité des eaux acides piégées dans les sphaignes pourrait entraîner une dissolution de ces particules. La dernière raison pourrait être tout simplement que *B. indica* n'utilise pas ces particules, comme pour la phlogopite. J'aimerais donc reconduire cette expérience, dans un troisième temps, au cours d'une année moins sèche, après plusieurs tests préliminaires de solubilité de la cuprite en milieu acide (pH=3).
- Enfin, je souhaite élargir mes champs d'expérimentation en étendant ces études aux amibes lacustres, fluviatiles et édaphiques pour déterminer si elles sont capables d'intégrer des particules polluantes (e.g. rejets industriels, miniers) dans des contextes très différents.

3 PERSPECTIVES À LONG TERME

A long terme, la poursuite de ces travaux pourrait être (1) d'essayer d'élaborer des modèles temporels d'intégration de particules par les amibes et (2) de mieux préciser le potentiel d'utilisation de la composition des thèques d'amibes dans les études paléo-environnementales.

- Les essais d'intégration de particules allochtones ont montré que sous une pluie particulaire continue, les amibes ont été capables d'enregistrer une partie de ce flux (plus ou moins selon la nature minérale). Il serait possible d'essayer de mieux comprendre les paramètres environnementaux qui peuvent conditionner l'intégration des particules (e.g. pluviométrie, température) en prenant en compte la biologie de l'organisme (vitesse de reproduction, mortalité, mode de prédation). Il serait intéressant, à partir de ces informations, d'essayer d'élaborer un modèle qui permettrait d'estimer le taux d'intégration des particules par les amibes en fonction de

leur nature et de leur quantité disponible. La validité de ce modèle pourrait être contrôlée expérimentalement par la même méthodologie employée dans l'étude du Chapitre 4. Ce modèle pourrait notamment être utilisé dans les études en paléoécologie. Dans un premier temps, un essai préliminaire pourrait être réalisé en tenant compte des résultats de l'intégration des particules du lot n°2, qui est le seul lot de particules minérales de nature homogène (talc) qui a été intégré par les amibes.

La principale caractéristique des amibes à thèque réside dans leur capacité à construire une enveloppe rigide, qui résiste après la mort de l'individu. Cette thèque se dépose et se mêle à l'enregistrement sédimentaire dans tous les milieux favorables aux conditions de développement des amibes. Les assemblages d'espèces d'amibes à thèque sont depuis longtemps utilisés en paléoécologie. La composition précise des thèques d'amibes fossiles pourrait constituer un outil complémentaire pour les chercheurs spécialistes des environnements anciens. Les thèques d'amibes pourraient donc constituer un proxy complémentaire dans les études paléo-environnementales, sous condition que celles-ci portent sur un des nombreux écosystèmes dans lesquels les thécamœbiens se développent. Les résultats acquis dans le cadre de ma thèse montrent que les thèques d'amibes peuvent indiquer la présence de cryptotephres récents. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux en analysant les thèques d'amibes d'une carotte de sédiments correspondant à un enregistrement de plusieurs milliers d'années, afin de tenter de retracer et corréliser les apports successifs de cryptotephres (i.e. les périodes d'éruptions volcaniques) au cours du temps. Les thèques d'amibes pourraient également traduire l'évolution d'une pollution particulière d'origine atmosphérique (e.g. particules issues de la combustion du charbon comme dans Fiałkiewicz-Kozieł et al., 2015), sur plusieurs centaines d'années. Il serait donc intéressant de tester l'analyse des thèques d'amibes en complément d'autres indicateurs particuliers, tels que les microparticules de charbon (Bony et al., 2015) ou les grains de pollen (Calò et al., 2012) dans les reconstructions paléo-environnementales holocènes.

Bibliographie

Adl, S.M., Girard, V., Breton, G., Lak, M., Maharning, A., Mills, A., Perrichot, V., Trionnaire, M., Vullo, R., Néraudeau, D., 2011. Reconstructing the soil food web of a 100 million-year-old forest: The case of the mid-Cretaceous fossils in the amber of Charentes (SW France). *Soil Biology & Biochemistry* 43: 726-735.

Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, R.S., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–93.

Anderson O. R. 1988. Some enzyme activities in the testate amoeba *Netzelia tuberculata*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 35, 19-20.

Anderson, O. R. 1987. Fine structure of a silicia-biomineralizing testate amoeba *Netzelia tuberculata* - *J. Protozool.* 34: 302-309.

Anderson, O. R. 1990. Effects of silicate deficiency on test morphology, cytoplasmic fine structure, and growth of the testate amoeba *Netzelia tuberculata* (Wallich) Netzel (Rhizopoda, Testacea) grown in laboratory culture. *Arch. Protistenk.*, 138:17-27.

Aoki Y, Hoshino M, Matsubara T. 2007. Silica and testate amoebae in soil under pine-oak forest. *Geoderma*, 142: 29-35

Armynot du Châtelet, E., Bernanrd, N., Delaine, M., Potdevin, J.-L., Gilbert, D. 2015. The mineral composition of the tests of 'testate amoebae' (Amoebozoa, Arcellinida): The relative importance of grain availability and grain selection. *Rev. Micropaleontol.* 58, 141–154.

Armynot du Châtelet, E., Bout-Roumazeilles, V., Coccioni, R., Frontalini, F., Guillot, F., Kaminski, M.A., Recourt, P., Riboulleau, A., Trentesaux, A., Tribovillard, N., Ventalon, S., 2013a. Environmental control on shell structure and composition of agglutinated foraminifera along a proximal-distal transect in the Marmara Sea. *Mar. Geol.* 335, 114–128.

Armynot du Châtelet, E., Frontalini, F., Guillot, F., Recourt, P., Ventalon, S., 2013b. Surface analysis of agglutinated benthic foraminifera through ESEM-EDS and Raman analyses : An expeditious approach for tracing mineral diversity. *Mar. Micropaleontol.* 105, 18-29.

- Armynot du Châtelet, E., Guillot, F., Recourt, P., Ventalon, S., Tribovillard, N., 2010. Influence of sediment grain size and mineralogy on testate amoebae test construction. *C. R. Geosci.* 342, 710–717.
- Armynot du Châtelet, E., Noiriël, C., Delaine, M., 2013c. 3D morphological and mineralogical characterisation of testate amoebae. *Microsc. Microanal.* 19, 1–12.
- Artz, R.R.E., Chapman, S.J., Siegenthaler, A., Mitchell, E.A.D., Buttler, A., Bortoluzzi, E., Gilbert, D., Yli-Petays, M., Vasander, H., Francez, A.-J., 2008. Functional microbial diversity in regenerating cutover peatlands responds to vegetation succession. *J. Appl. Ecol.* 45, 1799-1809.
- Asioli A, Medioli FS, Patterson RT 1996 - Thecamoebians as a tool for reconstruction of paleoenvironments in some Italian lakes in the foothills of the Southern Alps (Orta, Varese, and Candia). *Journal of Foraminiferal Research*, 26, 248-263.
- Awerinzew, S. 1906. Die Struktur und die chemische Zusammensetzung der Gehäuse bei den Süßwasser-Rhizopoden. *Arch. Protistenk.* 8. 95-111
- Baas Becking L.G.M. 1934. *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde* Diligentia Wetensch. Serie 18/19, van Stockum's Gravenhange, 263 pp
- Bamforth, S.S., 2010. Distribution of and insights from soil protozoa of the Olympic coniferous rain forest. *Pedobiologia*, 53, 361–367.
- Barber, A., Siver, P.A. and Karis, W., 2013. Euglyphid Testate Amoebae (Rhizaria:Euglyphida) from an Arctic Eocene Waterbody: Evidence of Evolutionary Stasis in Plate Morphology For Over 40 Million Years. *Protist*, 164: 541-555.
- Bartos, E. 1940. Studien Über die Moosebewohnenden Rhizopoden der Karpaten *Archiv für Protistenkunde* 94, 93-160
- Bassi, D., Fugagnoli, A., Posenato, R. and Scott, D.B., 2008. Testate amoebae from the early Jurassic of the western Tethys, North-East Italy. *Palaeontology*, 51(6): 1335-1339.
- Beyens & Meisterfeld, 2001
- Beyens, L., Chardez D, de Baere D, Verbruggen C. 1995. The Aquatic Testate Amebas Fauna of the Strømness Bay Area, South-Georgia: *Antarctic Science*, 7: 3-8
- Beyens, L., Chardez D. 1987. Evidence from testate amoebae for changes in some local hydrological conditions between c.5000BP and c.3800BP on Edgeøya (Svalbard). *Polar Research*, 5: 165-169

- Beyens, L., Chardez, D., De Baere D. 1991. Ecology of aquatic testate amoebae in coastal lowlands of Devon Island (Canadian High Arctic). *Archiv für Protistenkunde* 140, 22-33.
- Beyens, L., Meisterfeld, R., 2001. Protozoa: testate amoebae. In: Smol, J.P., Birks, H.J.B., Last, W.M. (Eds.), *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments*, vol. 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 121–153.
- Blockley, S.P.E., Lane, C.S., Hardiman, M., Rasmussen, S.O., Seierstad, I.K., Steffensen, J.P., Svensson, A., Lotter, A.F., Turney, C.S.M., Bronk Ramsey, C., 2012. Synchronisation of palaeoenvironmental records over the last 60,000 years, and an extended INTIMATE 1 event stratigraphy to 48,000 b2k. *Quat. Sci. Rev.* 36, 2–10.
- Bobrov A.A., Wetterich, S., Beermann, F., Schneider, A., Kokhanova, L., Schirrmeister, L., Pestryakova, L. A., Herzsuh U. 2012. Testate amoebae and environmental features of polygon tundra in the Indigirka lowland (East Siberia). *Polar Biology* 36, 857-870.
- Bobrov A.A., Yazvenko S.B., Warner, B.G. 1995. Taxonomic and ecological implications of shell morphology of three testaceans (Protozoa, Rhizopoda) in Russia and Canada. *Arch. Protistenk.* 145, 119-126.
- Bobrov, A.A., Charman, D.J., Warner, B.G., 2002. Ecology of testate amoebae from oligotrophic peatlands: specific features of polytypic and polymorphic species. *Biology Bulletin* 29, 605–617.
- Boeuf, O. and Gilbert, D., 1997. Présence de Thécamoebiens du genre *Trinema*, au Pliocène supérieur, découverte à Chilhac (Haute-Loire, France). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paléontologie*, 325: 623-627.
- Bonnet, L. 1964. Le peuplement thécamoebien des sols. *Revue d'Écologie et de Biologie du Sol*, 1: 123-408.
- Bonnet, L. 1974. Thécamoebiens. In : "Quelques aspects de la Faune des Mousses". *Annales du Centre Régional de Documentation Pédagogique (C.R.D.P.) de l'Académie de Clermont-Ferrand*, pp. 21-30
- Bonnet, L. 1975 Types morphologiques, ecologie et evolution de la theque chez les thecamoebiens. *Protistologica*, 11: 363-378
- Bonnet, L., 1958, Les Thécamoebiens du sol: *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse*, v.93, p. 529-543.
- Bonnet, L., 1960, Kystes et Trophophase chez *Plagiopyxis minuta* Bonnet (Thécamoebiens): *Bulletin de la Société Zoologique de France*, v. 85, p. 43-52.

Bonnet, L., Thomas, R. 1960. Faune terrestre et d'eau douce des Pyrénées-Orientales, fasc. 5., Thécamoebiens du sol. Supplément à Vie et Milieu, 103: 182. Hermann, Paris. (Repris par Masson, Paris).

Bony G., Morhange, C., Marriner, N., Baralis, A., Kaniewski, D., Rossignol, I., Lungu, V. 2015. History and influence of the Danube delta lobes on the evolution of the ancient harbour of Orgame (Dobrogea, Romania). *Journal of Archaeological Science* 61, 186-203.

Booth RK, Sullivan ME, Sousa VA. 2008. Ecology of testate amoebae in a North Carolina pocosin and their potential use as environmental and paleoenvironmental indicators. *Ecoscience* 15: 277-289

Booth, R.K. 2002 Testate amoebae as paleoindicators of surface-moisture changes on Michigan peatlands: modern ecology and hydrological calibration. *J. Paleolimnol* 28: 329-348

Booth, R.K., Notaro, M, Jackson, S.T, Kutzbach, J.E. 2006. Widespread drought episodes in the western Great Lakes region during the past 2000 years: Geographic extent and potential mechanisms. *Earth Plan Sc Let* 242: 415-427

Bortoluzzi, E., Epron, D., Siegenthaler, A., Gilbert, D., Buttler, A., 2006. Carbon balance of a European mountain bog at contrasting stages of regeneration. *New Phytol.* 172, 708-718.

Bosak T., Lahr, D., Pruss, S.B., Macdonald, F.A., Gooday, A., Dalton, L., Matys, E.D. 2011. Possible early foraminiferans in post-Sturtian (716-635 Ma) cap carbonates. *Geology*.

Burbidge, S.M, Shröder-Adams, C.J 1998. Thecamoebians in Lake Winnipeg: a tool for Holocene Paleolimnology. *J Paleolimnol*, 19: 309-328

Burdíková, Z., Čapek, M., Ostašov P., Machac, J., Pelc, R., Mitchell, E.A.D., Kubinova, L. 2010. Testate amoebae examined by confocal and two-photon microscopy: implications for taxonomy and ecophysiology. *Microsc Microanal* 16:735–746

Buteler, M., Stadler, T., López García, G.P., Lassa, M.S., Trombotto Liaudat, D., D'Adamo, P., Fernández-Arhe, V., 2011. Propiedades insecticidas de la ceniza del complejo volcanic Puyehue-Cordón Caulle y su posible impacto ambiental. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 70, 149–156.

Calò, C., Henne, P. D., Curry, B., Magny, M., Vescovi, E., La Mantia, T., Pasta, S., Vannièrè, B., Tinner, W. 2012. Spatio-temporal patterns of Holocene environmental change in southern Sicily. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 323-325, 110-122.

- Camacho S., Connor, S., Asioli, A., Boski, T., Scott, D. 2015. Testate amoebae and tintinnids as spatial and seasonal indicators in the intertidal margins of Guadiana Estuary (southeastern Portugal). *Ecological Indicators* 58, 426-444.
- Caneiro, A, Mogni, L., Serquis, A., Cotaro, C., Wilberger, D., Ayala, C., Daga, R., Poire, D., Scerbo, E., 2011. Informe Técnico: Análisis de cenizas volcánicas del Cordón Caulle (complejo volcánico Puyehue-Cordón Caulle). Comisión Nacional de Energía Atómica, Junio 2011, 7 pp.
- Cash, J, Wailes, GH, Hopkinson, J. 1915. The British Freshwater Rhizopoda and Heliozoa. Volume III, Rhizopoda, Part III. London: printed for the Ray Society, 156 p.
- Cash, J, Wailes, GH, Hopkinson, J. 1919. The British Freshwater Rhizopoda and Heliozoa. Volume IV, Rhizopoda, Part IV. London: printed for the Ray Society, 130 p. Cash et Hopkinson (1905, 1909),
- Chardez, D, Lambert, J. 1981. Thécamoebiens indicateurs biologiques (Protozoa, Rhizopoda testacea). *Bull.Rech. Agron. Gembloux*, 16 (3): 181-204
- Chardez, D. 1965a. Ecologie générale des Thécamoebiens. *Bulletin de l'Institut Agronomique et des Stations de Recherche de Gembloux*, 33: 307-341 Chardez 1964
- Chardez, D. 1967a. Histoire naturelle des Protozoaires Thécamoebiens. *Les Naturalistes Belges* : Bruxelles, 100 p. Chardez, 1986 ;
- Chardez, D. 1969. Le genre *Phryganella* Penard (Protozoa Rhizopoda Testacea). *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux, New Series*, 4: 315-322 Chardez, 1974
- Chardez, D. 1989. Sur la multiplication de *Centropyxis discoides* et l'influence du milieu sur la morphologie de la thèque. *Acta Protozoologica*, 28: 31-34 Chardez, 1991
- Charman, D.J., 1997. Modelling hydrological relationships of testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) on New Zealand peatlands. *J. Roy. Soc. N. Z.* 27, 465–483.
- Charman, D.J., 1999. Testate amoebae and the fossil record: issues in biodiversity. *Journal of Biogeography*, 26(1): 89-96.
- Charman, D.J., 2001. Biostratigraphic and palaeoenvironmental applications of testate amoebae. *Quat. Sci. Rev.* 20, 1753–1764.
- Charman, D.J., Gehrels, W.R., Manning, C., Sharma, C. 2010. Reconstruction of recent sea-level change using testate amoebae. *Quaternary Research* 73, 208-219.

- Charman, D.J., Hendon, D, Woodland, W.A. 2000. The identification of testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) in peats. QRA Technical Guide No 9, Quaternary Research Association: London, 147p
- Charman, D.J., Warner, B. 1997. The ecology of testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) and microenvironmental parameters in Newfoundland, Canada: modeling hydrological relationships for palaeoenvironmental reconstruction. *Écoscience*, 4: 555-562
- Charman, D.J., Warner, B.G. 1997. The ecology of testate amoebae (Protozoa:Rhizopoda) in oceanic peatlands in Newfoundland, Canada: modelling hydrological relationships for palaeoenvironmental reconstruction. *Écoscience* 4, 555-562.
- Charret, R. 1962. L'exuviation chez *Hyalosphenia papilio* (Rhizopode Testacé):*Compt. rend. Acad. Sci., Paris*, v. 254, no 4, p. 730-732.
- Charret, R. and Vivier, E. 1964. Sur l'ultrastructure d'*Arcella polypora* (Rhizopode testacé): in: Titlbach, M. (ed.): *Electron Microscopy 1964-Proceedings of the Third European Regional Conference held in Prague, August 26- September 3, 1964*, v.B, p. 187-188: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences (Prague).
- Chatelain A.P., Meisterfeld, R., Roussel-Delif, L., Lara., E. 2013. Sphaenoderiidae (fam. Nov.), a new clade of Euglyphid testate amoebae characterized by small, round scales surrounding the aperture. *Protist* 164, 782-792.
- Clarke, K.J., 2003. *Guide to the Identification of Soil Protozoa-Testate Amoebae*. Freshwater Biological Association, Cornell University.
- Coimbra J.C., Carreno, A.L., De Santana dos Anjos-Zerfass, G. 2009. Biostratigraphy and paleoceanographical significance of the Neogene planktonic foraminifera from the Pelotas Basin, southernmost Brazil. *Revue de Micropaléontologie* 52, 1-14.
- Collini, E., Osores, M.S., Folch, A., Viramonte, J.G., Villarosa, G., Salmuni, G., 2013. Volcanic ash forecast during the June 2011 Cordón Caulle eruption. *Nat. Hazards* 66, 389–412.
- Corliss, 2001. Two most remarkable Amoeba men: Joseph Leidy (1823-1891) of Philadelphia and Eugène Penard (1855-1954) of Geneva. *Protist* 152, 69-85.
- Costan, G., Planas, D. 1986. Effects of a short-term experimental acidification on a microinvertebrate community: Rhizopoda, Testacea. *Revue canadienne de zoologie* 64, 1224-1230.

Coûteaux, M.M. 1992 Decomposition of cells and empty shells of testate amoebae (Rhizopoda, Testacea) in an organic acid soil sterilized by propylene oxide fumigation, autoclaving, and gamma-ray irradiation. *Biology and fertility of soils*, 12: 290-294

Coûteaux, M.M., Munsch, A, Ponge, J.F. 1979. Le genre *Euglypha*: essai de taxinomie numérique. *Protistologica*, 15: 565-579.

Coûteaux, M.M., Ogden, C.G., 1988. The growth of *Tracheleuglypha dentata* (Rhizopoda : Testacea) in clonal cultures under different trophic conditions. *Microbial Ecology* 15, 81-93.

Coûteaux, M.M., Pussard, M. 1983. Nature du regime alimentaire des protozoaires du sol. New trends in Soil Biology. In: Lebrun Ph (Ed), *Proceedings of the VIII Int. Colloquium of Soil Biology*, Louvain-la-Neuve: Belgium, pp. 179-195

Dallimore, A., Schröder-Adams C.J., Dallimore, S.R. 2000. Holocene environmental history of thermokarst lakes on Richards Island, Northwest Territories, Canada: thecamoebians as paleolimnological indicators. *Journal of Paleolimnology*, 23: 261-283

De Wit, R., Bouvier, T. 2006. 'Everything is everywhere, but, the environment selects' ; what did Baas Becking and Beijerinck really say ?' *Environ. Microbiol.* 8, 755-8.

Décloître, L. 1961. Le genre *Paraquadrula* (Thekamoebina). *Int. Revue ges Hydrobiol*, 46 (2): 321-330

Décloître, L. 1977. Le genre *Nebela*. Compléments à jour au 31 décembre 1974 de la monographie du genre parue en 1936. *Archiv für Protistenkunde*, 119: 325-352

Décloître, L. 1978. Le genre *Centropyxis* I. Compléments à jour au 31 décembre 1974 de la Monographie du Référécnés bibliographiques générales 226 genre parue en 1929. *Archiv für Protistenkunde*, 120: 63-85

Décloître, L. 1979. Le genre *Centropyxis* II. Compléments à jour au 31 décembre 1974 de la Monographie du genre parue en 1929. *Archiv für Protistenkunde*, 121: 162-192

Décloître, L. 1981. Le genre *Trinema* Dujardin, 1841. Révision à jour au 31 XII. 1979. *Archiv für Protistenkunde*, 124: 193-218

Décloître, L. 1986. Statistique mondial des Thécamoebiens. *Annales de la Société des Sciences Naturelles: Toulon et Var*, 37 p

Deflandre, G. 1928. Le genre *Arcella* Ehrenberg. *Morphologie-Biologie. Essai phylogénétique et systématique* *Archiv für Protistenkunde*, 64: 152-287

Deflandre, G. 1929. Le genre *Centropyxis* Stein. *Archiv für Protistenkunde*, 67: 322-375

- Deflandre, G. 1936. Etude monographique sur le genre *Nebela* Leidy (Rhizopoda-Testacea). *Annales de Protistologie*, 5: 201-322
- Deflandre, G. 1953. Thécamoebiens. In : Grasse PP, *Traité de Zoologie*. Masson Edition: France, 97-149
- Delaine, M., Armynot du Châtelet, E., Bout-Roumazielles, V., Goubert, E., Le Cadre, V., Recourt, P., Trentesaux, A., Arthuis, R., 2014. Multiproxy approach for Holocene paleoenvironmental reconstructions from microorganisms (testate amoebae and foraminifera) and sediment analyzes: the infilling of the Loire Valley in Nantes (France). *Holocene* 25, 407–420.
- Delaine, M., Fernández, L.D., Armynot du Châtelet, E., Recourt, P., Potdevin, J-L., Mitchell, E.A.D., Bernard, N., 2016. Cinderella's helping pigeons of the microbial world: The potential of testate amoebae for identifying cryptotephra. *Eur. J. Protistol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2016.05.003>
- Delaine, M., Bernard, N., Gilbert, D., Recourt, P., Armynot du Chatelet, E., 2016 (in revision). Diversity of testate amoebae shell content : Example of *Bullinularia indica* living in *Sphagnum capillifolium* carpet. Soumis dans *European Journal of Protistology*
- Delvigne, J., 1983. Micromorphology of the alteration and weathering of pyroxenes in the Koua Bocca ultramafic intrusion, Ivory Coast, western Africa. *Sci. Géol. Mém.* 72, 57-68.
- Diaz-De-Quijano, M., Joly, D., Gilbert, D., Bernard, N., 2014. A more cost-effective geomatic approach to modelling PM10 dispersion across Europe. *Appl. Geogr* 55, 108-116.
- Diaz-De-Quijano, M., Joly, D., Gilbert, D., Toussaint, M-L., Franchi, M., Fallot, J-M., Bernard, N., 2016. Modelling and mapping trace element accumulation in *Sphagnum* peatlands at the European scale using a geomatic model of pollutant emissions dispersion. *Environ. Pollut.* 214, 8-16.
- Duleba W. & Debenay J-P., 2003, Hydrodynamic circulation in the estuaries of Estação Ecologica Jureia-Itatins, Brazil, inferred from foraminifera and thecamoebian assemblages. – *Journal of Foraminiferal Research*, 33, 62-93
- Dürrig, T., Zimanowski, B., 2012. “Breaking news” on the formation of volcanic ash: Fracture dynamics in silicate glass. *Earth Planet. Sci. Lett.* 335–336.
- Eckert B. S., McGee-Russell S. M. 1974. Shell structure in *Diffugia lobostoma* observed by scanning and transmission electron microscopy. – *Tissue & Cell*, 6, 215-221.

- Eichler P.P.B., Castelao G.P., Pimenta F.M., Eichler B.B., Miranda L.B.DE, Rodrigues A.R. & Pereira E.R.M., 2006, Foraminifera and thecamoebians as indicator of Hydrodynamic process in a choked coastal lagoon, Laguna estuarine system, SC, Brazil, – *Journal of Coastal Research*, 39, 1144-1148
- Elliott, S.M., Roe, H.M., Patterson, R.T. 2012. Testate amoebae as indicators of hydroseral change: An 8500 year record from Mer Bleue Bog, eastern Ontario, Canada. *Quaternary International* 268, 128-144.
- Ellison, R.L., Ogden, C.G. 1987. A guide to the study and identification of fossil testate amoebae in Quaternary lake sediments. *International Review of Hydrobiology*, 72: 639-652
- Erlandsen, S.L., Macechko, P.T., Frethem, C., 1999. High resolution backscatter electron (BSE) imaging of immunogold with in-lens and below-the-lens field emission scanning electron microscopes. *Scanning Microsc.* 1, 43–54.
- Farooqui, A., Aggarwal, N. and Jha, N., 2014. Thecamoebians from Late Permian Gondwana sediments of peninsular India *European Journal of Protistology* 50: 89-105.
- Fernández, L.D., 2015. Source-sink dynamics shapes the spatial distribution of soil protists in an arid shrubland of northern Chile. *J. Arid Environ.* 113, 121–125.
- Fernández, L.D., Fournier, B., Rivera, R., Lara, E., Mitchell, E.A.D., Hernández, C.E. 2016. Water-energy balance, past ecological perturbations and evolutionary constraints shape the latitudinal diversity gradient of soil testate amoebae in Southwestern South America. *Global Ecol. Biogeogr.* In press.
- Fernández, L.D., Lara, E., Mitchell, E.A.D., 2015. Checklist, diversity and distribution of testate amoebae in Chile. *Eur. J. Protistol.* 51, 409–424.
- Fernández, L.D., Lara, E., Mitchell, E.A.D., 2015. Checklist, diversity and distribution of testate amoebae in Chile. *Eur. J. Protistol.* 51, 409–424.
- Fernández, L.D., Zapata, J., 2010a. Registro tafonómico de *Ammonia beccarii* (Linné, 1758) (Protozoa: Foraminiferida) en la Ensenada Quillaipe, Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 38(2): 286–291.
- Fernández, L.D., Zapata, J., 2010b. Distribución de foraminíferos bentónicos (Protozoa: Foraminiferida) en la ensenada Quillaipe (41°32' S; 72°44' O), Chile: implicaciones para el estudio del nivel del mar. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 83, 567–583.
- Fernández, L.D., Zapata, J., 2011. Variación estacional en la comunidad de amebas testadas de una turbera temperada del sur de Chile. *Bol. Soc. Biol. Concepción* 80, 27–39.

Fernández, L.D., Zapata, J., Meisterfeld, R., Baessolo, L., 2012. First records and community patterns of Arcellinida inhabiting a pristine and remote island from southeastern Pacific. *Acta Protozool.* 51, 139–154.

Fiałkiewicz-Kozieł, B., Smieja-Król, B., Ostrovnyaya, T.M., Frontasyeva, M., Siemińska, A., Lamentowicz, M., 2015. Peatland microbial communities as indicators of the extreme atmospheric dust deposition. *Water Air Soil Poll.* 226(4), 97.

Finlay, B.J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, 296: 1061-1063

Fiorini, F., Scott, D.B., Wach, G.D. 2008. Thecamoebians from the early Cretaceous of the Scotian Shelf. *Micropaleontology* 53, 511-516.

Foissner, W. 1997. Protozoa as bioindicators in agroecosystems, with emphasis on farming practices, biocides, and biodiversity. *Agriculture Ecosystems and Environment* 62, 93-103.

Foissner, W., Schiller, W. 2001. Stable for 15 million years: scanning electron microscope investigation of Miocene euglyphid thecamoebians from Germany, with description of the new genus *Scutiglypha*. *European Journal of Protistology*, 37: 167-180

Folch, A., Jorba, O., Viramonte, J., 2008. Volcanic ash forecast – application to the May 2008 Chaitén eruption. *Nat. Hazards Earth Syst. Sci.* 8, 927–940.

Folk, R. L., 1968. Petrology of sedimentary rocks. Austin, Texas (Hemphill's Book Store).

Fournier, B., Coffey, E.E.D., van der Knaap, W.O., Fernández, L.D., Bobrov, A., Mitchell, E.A.D., 2016. A legacy of human-induced ecosystem changes: Spatial processes drive the taxonomic and functional diversities of testate amoebae in *Sphagnum* peatlands of the Galápagos. *J. Biogeogr.* 43, 533–543.

Gehrels W.R., Roe H.M. & Charman D.J., 2001, Foraminifera, testate amoebae and diatoms as sea-level indicators in UK saltmarshes; a quantitative multiproxy approach. – *Journal of Quaternary Science*, 16, 201-220

Gilbert, D, Amblard C, Bourdier G, Francez A-J. 1998b. The microbial loop at the surface of a peatland: Structure, function, and impact of nutrient input. *Microbial Ecol* 35: 83-93

Gilbert, D, Amblard, C, Bourdier, G, Francez, A-J. 1998a. Short term effect of nitrogen enrichment on the Référencés bibliographiques générales 228 microbial communities of a peatland. *Hydrobiologia*, 373/374 : 111-119

Gilbert, D., Amblard, C., Bourdier, G., Francez, A-J., Mitchell, E.A.D., 2000. Le régime alimentaire des Thécamoebiens (Protista, Sarcodina). *Année Biol.* 39, 57-68.

Golemansky, V. & Coûteaux, M-M. 1982 Etude en microscopie électronique a balayage de huit especes de thécamoebiens interstitiels du supralittoral marin. *Protistologica* 18, 4, 473-480.

Golemansky, V., 2008. Origin, Phylogenetic relations, and adaptations of the marine interstitial testate amoebae (Rhizopoda: Lobosea, Filosea, and Granuloreticulosea). *Advances in Arachnology and Developmental Biology* 12, 87-100.

Golemansky, V., Ogden, C. G., 1980, Shell structure of three littoral species of testate amoebae from the Black Sea (Rhizopodes: Protozoa): *Bulletin of the British Museum of Natural History (Zoology)*, v. 38, no 1, p. 1-6.

Gomaa, F., Kosakyan, A., Heger, T., Corsaro, D., Mitchell, E.A.D., Lara, E. 2014. One Alga to Rule them All: Unrelated Mixotrophic Testate Amoebae (Amoebozoa, Rhizaria and Stramenopiles) Share the Same Symbiont (Trebouxiophyceae). *Protist* 165, 161-176.

Gomaa, F., Todorov, M., Heger, T.J., Mitchell, E.A., Lara, E., 2012. SSU rRNA phylogeny of Arcellinida (Amoebozoa) reveals that the largest Arcellinid genus, *Diffugia* Leclerc 1815, is not monophyletic. *Protist* 163, 389–399.

Gooday A.J., Uematsu, K., Kitazato, H., Toyofuku, T., Young, J.R. 2010. Traces of dissolved particles, including coccolths, in the tests of agglutinated foraminifera from the Challenger Deep (10,897m water depth, western equatorial Pacific). *Deep-Sea Research* 57, 239-247.

Grimm, J., Grimm, W., 1812. *Kinder- und Hausmärchen*, 1st ed. (Berlin: Realschulbuchhandlung, 1812), v. 1, no. 21. Translated by D. L. Ashliman. © 1998 <http://www.pitt.edu/~dash/type0510a.html>

Grospietsch, T. 1958. *Wechseltierchen (Rhizopoden)*: Kosmos-Gesellschaft der Naturfreunde/ Franckh'sche Verlagshandlung. *Sammlung Einführung in die Kleinlebewelt*: 1-82 (Stuttgart)

Grospietsch, T., 1954a, *Studien über die Rhizopodenfauna von Schweidisch Lappland*: *Archiv für Hydrobiologie*, v. 49, n167 4, p. 546-580.

Guillemot, J., Barlier, J., Derumaux, F., 1965. *Carte géologique de la France à 1/50000: Maïche (feuille 504)*. Orléans : BRGM.

Heal, O. 1961. The distribution of testate amoeba (Rhizopoda, Testacea) in some fens and bogs in northern England: *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*, 44: 369-382

Heal, O.W. 1962. The abundance and microdistribution of testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda), in *Sphagnum*. *Oikos*, 13: 35-47

- Heal, O.W. 1964. Observations on the seasonal and spatial distribution of Testacea (Protozoa: Rhizopoda) in Sphagnum. *Journal of Animal Ecology*, 33: 395-412
- Hedley, R. H., Ogden, C. G., 1973. Biology and fine structure of *Euglypha rotunda* (Testacea: Protozoa): *British Museum of Natural History Bulletin (Zoology)*, v. 25, no 4, p. 119-137, pl. 1-7.
- Hedley, R. H., Ogden, C. G., 1974a. Observations on *Trinema lineare* Penard (Testacea: Protozoa): *British Museum of Natural History Bulletin (Zoology)*, v. 26, p. 187-199.
- Hedley, R. H., Ogden, C. G., 1974b. Adhesion plaques associated with the production of a daughter cell in *Euglypha* (Testacea: Protozoa): *Cell Tiss. Res.*, v. 153, p. 261- 268.
- Hedley, R. H., Ogden, C. G., Mordan, N. S., 1976. Manganese in the shell of *Centropyxis* (Rhizopodea: Protozoa): *Cell Tiss. Res.*, v. 171, no 4, p. 543-549.
- Hedley, R. H., Ogden, C. G., Mordan, N. S., 1977. The biology and fine structure of *Cryptodiffugia oviformis* (Rhizopodea: Protozoa): *British Museum of Natural History Bulletin (Zoology)*, v. 30, no 8, p. 311-328, pl. 1-6.
- Heger, T.J., Pawlowski, J., Lara, E., Leander, B.S., Todorov, M., Golemansky, V., Mitchell, E.A.D., 2011. Comparing Potential COI and SSU rDNA Barcodes for Assessing the Diversity and Phylogenetic Relationships of Cyphoderiid Testate Amoebae (Rhizaria: Euglyphida). *Protist* 162(1): 131-141.
- Heger, T.J., Straub, F., Mitchell, E.A.D., 2012. Impact of farming practices on soil diatoms and testate amoebae: A pilot study in the DOK-trial at Therwil, Switzerland. *Bioindication in Soil Ecosystems* 49, 31-36.
- Hengstum, P. J. van., Reinhardt, E. G., Medioli, F. S. and Gröcke, D. R., 2007. Exceptionally preserved Late Albian (Cretaceous) arcellaceans (thecamoebians) from the Dakota Formation near Lincoln, Nebraska, USA. *Journal of Foraminiferal Research*, 37, 300–308.
- Holt, E.A., Miller, S.W. 2011. Bioindicators: Using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge* 2, 8.
- Hoogenraad, H. R., de Groot, A. A., 1940a, Moosbewohnende thekamöbe Rhizopoden von Java und Sumatra: *Treubia (Buitenzorg)*, v. 17, no4, p. 209-259.
- Jassey V.E.J., Chiapusio G., Gilbert D., Toussaint M-L., Binet P., 2012. Phenoloxidase and peroxidase activities in Sphagnum-dominated peatland in a warming climate. *Soil Biol. Biochem.* 46, 49-52.

- Jassey, V.E.J., Chiapusio, G., Mitchell, E.A.D., Binet, P., Toussaint, M.L., Gilbert, D. 2011a. Fine-scale horizontal and vertical micro-distribution patterns of testate amoebae along a narrow fen/bog gradient. *Microb Ecol* 61: 374-385
- Jassey, V.E.J., Lamentowicz, M., Bragazza, L., Hofsommer, M.L., Mills, R.T.E., Buttler, A., Signarbieux, C., Robroek, B.J.M. 2016. Loss of testate amoeba functional diversity with increasing frost intensity across a continental gradient reduces microbial activity in peatlands. *European Journal of Protistology*, in press.
- Jayaraman, N. 1940. Alteration of tremolite to talc in the dolomite marbles of Yellandu Warangal District (Hyderabad, DN.). *N. Proc. Indian Acad. Sci. (Math. Sci.)* 12, 65.
- Jeanson, C., Couteaux, M.M. 1977. Microanalyse élémentaire de la théque de Thécamoebiens du genre Euglypha: Academie des Sciences, Paris; *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances, sér. D*, v. 284, no 19, p. 1895-1898, pls. 1-3.
- Jeuniaux, C. 1963. *Chitine et Chitinolyse*. Masson et tie, Paris.
- Johansen, C.A., Eves, J.D., Mayer, D.F., Bach, J.C., Nedrow, M.E., Kious, C.W., 1981. Effects of ash from Mt. St. Helens on bees. *Melanderia* 37, 20–29.
- Joyon, L., Charret, R., 1962, Sur l'ultrastructure du Thécamoebien *Hyalosphenia papilio* (Leidy): Academie des Sciences, Paris; *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances*, v. 255, no 20, p. 2661-2663, 4 pls.
- Jung, W., 1942. Südchilenische Thekamöeben. *Arch. Hydrobiol.* 95, 253–356.
- Kajukało K., Fiałkiewicz-Kozieł, B., Galka, M., Kolaczek, P., Lamentowicz, M. 2016. Abrupt ecological changes in the last 800 years inferred from a mountainous bog using testate amoebae traits and multi-proxy data. *European Journal of Protistology*, in press.
- Koenig, I., Feldmeyer-Christe, E., Mitchell, E.A.D., 2015. Comparative ecology of vascular plant, bryophyte and testate amoeba communities in four Sphagnum peatlands along an altitudinal gradient in Switzerland. *Ecol. Indic.* 54, 48-59.
- Kosakyan, A., Gomaa, F., Lara, E., Lahr, D. 2016. Current and future perspectives on the systematics, taxonomy and nomenclature of testate amoebae. *European Journal of Protistology*, in press.
- Kosakyan, A., Heger, T.J., Leander, B.S., Todorov, M., Mitchell, E.A.D., Lara, E., 2012. COI barcoding of Nebelid testate amoebae (Amoebozoa: Arcellinida): extensive cryptic diversity and redefinition of the Hyalospheniidae schultze. *Protist* 163, 415–434.

- Kosakyan, A., Mulet, M., Mitchell, E.A.D., Lara, E. 2015. Environmental DNA COI barcoding for quantitative analysis of protists communities: A test using the *Nebela collaris* complex (Amoebozoa; Arcellinida; Hyalospheniidae). *European Journal of Protistology* 51, 311-320.
- Krashevskaya, V., Bonkowski, M., Marauan, M., Scheu, S., 2007. Testate amoebae (protista) of an elevational gradient in the tropical mountain rain forest of Ecuador. *Pedobiologia* 51, 319–331.
- Kuwahara, Y., Aoki, Y. 1995. Dissolution process of phlogopite in acid solutions. *Clay and Clay Minerals* 43, 39-50.
- La Tour, T. E., Kerrich, R., Hodder, R.W., and Barnett, R. L. 1980. Chloritoid stability in very iron-rich altered pillow lavas. *Contr. Mineral. and Petrol.* 74, 165.
- Lagerheim, G., 1902, Om *Quadrula subglobosa* Lagerheim: *Geologiska Föreningen I Stockholm Förhandlingar*, v. 24, p. 346-352.
- Lahr, D.J., Bosak, T., Lara, E., Mitchell, E.A.D. 2015. The Phanerozoic diversification of silica-cycling testate amoebae and its possible links to changes in terrestrial ecosystems. *PeerJ* 3:e1234; DOI 10.7717/peerj.1234.
- Lahr, D.J., Grant, J.R., Katz, L.A., 2013. Multigene phylogenetic reconstruction of the Tubulinea (Amoebozoa) corroborates four of the six major lineages, while additionally revealing that shell composition does not predict phylogeny in the Arcellinida. *Protist* 164, 323–339.
- Lahr, D.J.G., Lopes, S.G.B.C. 2006. Morphology, Biometry, Ecology and Biogeography of Five Species of *Diffugia* Leclerc, 1815 (Arcellinida: Diffugiidae), from Tiete River, Brazil. *Acta Protozoologica*, 45: 77-90
- Lambert, J., Chardez, D., 1978. Intérêt criminalistique de la microfaune terrestre: *Revue Internationale de Police criminelle*, 319: 158-170
- Lamentowicz, M., Bragazza, L., Buttler, A., Jassey, V.E.J, Mitchell, E.A.D. 2013. Seasonal patterns of testate amoeba diversity, community structure and species environment relationships in four Sphagnum-dominated peatlands along a 1300 m altitudinal gradient in Switzerland. *Soil Biology and Biochemistry* 67, 1-11.
- Lane, C.S., Cullen, V.L., White, D., Bramham-Law, C.W.F., Smith, V.C., 2014. Cryptotephra as a dating and correlation tool in archaeology. *J Arch. Sci.* 42, 42–50.

- Lara, E., Heger, T.J., Ekelund, F.; Lamentowicz, M., Mitchell, E.A.D. 2008. Ribosomal RNA Genes Challenge the Monophyly of the Hyalospheniidae (Amoebozoa: Arcellinida). *Protist*, 159: 165-176
- Lara, E., Heger, T.J., Mitchell, E.A.D. 2007a. SSU rRNA reveals a sequential increase in shell complexity among the Euglyphid testate amoebae (Rhizaria: Euglyphida). *Protist* 158:229–237
- Lara, L., Moreno, H., Naranjo, J., Matthews, S., Pérez de Arce, C., 2006. Magmatic evolution of the Puyehue-Cordón Caulle volcanic complex (40° S), Southern Andean Volcanic Zone: from shield to unusual rhyolitic fissure volcanism. *J. Volcanol. Geotherm. Res.* 157, 343–366.
- Lavallée, Y., Meredith, P.G., Dingwell, D.B., Hess, K.-U., Wassermann, J., Cordonnier, B., Gerik, A., Kruhl, J.H., 2008. Seismogenic lavas and explosive eruption forecasting. *Nature* 453, 507–510.
- Le Maitre, R.W., Streckeisen, A., Zanettin, B., Le Bas, J., Bonin, B., Bateman, P., Bellieni, G., Dudek, A., Efremova, S., Keller, J., J. Lamere, Sabine, P.A., Schmid, R., Sorensen, H., Woolley, A.R., 2002. Igneous rocks: a classification and glossary of terms – Recommendations of the International Union of Geological Sciences. Subcommission of the Systematics of Igneous Rocks. Cambridge University Press
- Le Roux, G., Fagel, N., De Vleeschouwer, F., Krachler, M., Debaille, V., Stille, P., Mattielli, N., van der Knaap, W.O., van Leeuwen, J. F.N., Shotyk, W. 2012. Volcano- and climate-driven changes in atmospheric dust sources and fluxes since the Late Glacial in Central Europe. *Geology* 40, 335-338.
- Leidy, J. 1878c. Species of Euglypha, Trinema, Pamphagus, and Cyphoderia, with synonyms and descriptions of new forms: *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 3rd ser., v. 30, p. 171-173 (1878).
- Leidy, J. 1879. Fresh-water Rhizopods of North America. Report of the United States Geological Survey of the Territories, 12: I-XI, 1-324
- Lepot, K., Benzerara, K., Philippot, P. 2011. Biogenic versus metamorphic origins of diverse microtubes in 2.7 Gyr old volcanic ashes: Multi-scale investigations. *Earth and Planetary Science Letters* 312, 37-47.
- Lin F.G., Clemency, C.V. 1981. Dissolution kinetics of phlogopite. I. Closed system. *Clays and Clay Minerals* 29, 101-106

- Lloyd J., 2000, Combined foraminiferal and thecamoebian environmental reconstruction from an isolation basin in NW Scotland: implications for sea-level studies. – *Journal of Foraminiferal Research*, 30, 294-305
- Louisier et Parkinson (1981),
- Makled, W.A. and Langer, M.R. 2010. Preferential selection of titanium-bearing minerals in agglutinated Foraminifera: Ilmenite (FeTiO₃) in *Textularia hauerii* d'Orbigny from the Bazaruto Archipelago, Mozambique. *Rev. Micropaleontol.* 53, 163-173.
- Mancin, N., Basso, E., Lupi, C., Cobianchi, M., Hayward, B.W. 2015. The agglutinated foraminifera from the SW Pacific bathyal sediments of the last 550 kyr: Relationship with the deposition of tephra layers. *Mar. Micropaleontol.* 115, 39-58.
- Marcisz, K., Fournier, B., Gilbert, D., Lamentowicz, M., Mitchell, E.A.D., 2014. Response of Sphagnum peatland testate amoebae to a 1-year transplantation experiment along an artificial hydrological gradient. *Environ. Microbiol.* 37, 810–818.
- Marcisz, K., Tinner, W., Colomaro, D., Kolaczek, P., Slowinski, M., Fialkiewicz-Koziel, B., Lokas, E., Lamentowicz, M., 2015. Long-term hydrological dynamics and fire history over the last 2000 years in CE Europe reconstructed from a high-resolution peat archive. *Quaternary Science Reviews* 112, 138–152.
- Marske, K.A., Ivie, M.A., Hilton, G.M., 2007. Effects of volcanic ash on the forest canopy insects of Montserrat, west Indies. *Environ. Entomol.* 36, 817–825.
- Mast, S.O., Root, F.M. 1916. Observations on amoeba feeding on rotifers, nematodes and ciliates and their bearing on the surface-tension theory. *J Exp Zool*, 21: 33-49
- Mattheeussen, R., Ledeganck, P., Vincke, S., Van de Vijver, B., Nijs, I., Beyens, L. 2005. Habitat selection of aquatic testate amoebae communities on Qeqertarsuaq (Disko Island), West Greenland. *Acta Protozoologica*, 44:253–263
- Mazei, Y., Tsyganov, A., 2006. Freshwater testate amoebae. KMK, Moscow (In Russian).
- Mazei, Y.A. & Chernyshov, V.A. 2011. Testate amoebae communities in the southern tundra and forest–tundra of western Siberia. *Biology Bulletin*, 5, 515–523.
- Medioli, F.S., Scott, D. B., 1985, Designation of types, for one genus and nine species of Arcellaceans (Thecamoebians) with additional reference material for four other species: *Journal of Foraminiferal Research*, v. 15, no 1, p. 24-37, pl. 1.
- Meisterfeld, R, Mitchell, E.A.D. 2008. Arcellinida Kent 1880, Testate Lobose Amoebae. [en ligne] URL <<http://tolweb.org/Arcellinida/124471/2008.09.02>> [Version 02 September 2008, under construction]. In: The Tree of Life Web Project, URL <http://tolweb.org/>

Meisterfeld, R. 2008. *Bullinularia foissneri* nov. spec. (Amoebozoa, Arcellinida) from Australia and synopsis of the genus *Bullinularia*. Denisia.

Meisterfeld, R., 2002a. Order Arcellinida Kent, 1880, In: Lee, J.J., Leedale, G.F. & Bradbury, P. (Eds.), *An illustrated guide to the protozoa*, second edition, vol. 2. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, U.S.A., pp. 827–860.

Meisterfeld, R., 2002b. Testate Amoebae with Filopodia, In: Lee, J.J., Leedale, G.F. & Bradbury, P. (Eds.), *An illustrated guide to the protozoa*, second edition, vol. 2. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, U.S.A., pp. 1054–1084.

Meisterfeld, R., Heisterbaum, M. 1986. The decay of empty tests of testate amoebae (Rhizopoda, Protozoa). *Symposia Biologica Hungarica*, 33: 285-390

Meyer, C., Desalme, D., Bernard, N., Binet, P., Toussaint, M.L., Gilbert, D. 2013. Using testate amoeba as potential biointegrators of atmospheric deposition of phenanthrene (polycyclic aromatic hydrocarbon) on "moss/soil interface-testate amoeba community" microecosystems. *Ecotoxicology* 22, 287-294.

Meyer, C., Diaz-De-Quijano, M., Monna, F., Franchi, M., Toussaint, M-L., Gilbert, D., Bernard, N. 2015. Characterisation and distribution of deposited trace elements transported over long and intermediate distances in north-eastern France using *Sphagnum* peatlands as a sentinel ecosystem. *Atmos. Environ.* 101, 286-293.

Meyer, C., Gilbert, D., Gaudry, A., Franchi, M., Nguyen-Viet, H., Fabure J., Bernard, N. 2010. Relationship of Atmospheric Pollution Characterized by gas (NO₂) and particles (PM₁₀) to Microbial Communities Living in Bryophytes at Three Differently Polluted Sites (Rural, Urban and Industrial). *Microbial Ecology* 59 (2): 324-334

Meyer, C., Gilbert, D., Gillet, F., Moskura, M., Franchi, M., Bernard, N., 2012. Using "bryophytes and their associated testate amoeba" microsystems as indicators of atmospheric pollution. *Ecol. Indic.* 13, 144–151.

Mignot, J.P., Raikov, I.B. 1992. Evidence for Meiosis in the Testate Amoeba *Arcella*. *J. Protozool.*, 39: 287-289

Mitchell, .E.A.D, Gilbert, D., Buttler, A., Grosvernier, P., Amblard, C., Gobat, J-M. 2003. Structure of microbial communities in *Sphagnum* peatlands and effect of atmospheric carbon dioxide enrichment. *Microbial Ecology*, 46 (2): 187-199

Mitchell, E.A.D. and Gilbert, D., 2004. Vertical micro-distribution and response to nitrogen deposition of testate amoebae in *Sphagnum*. *J. Euk. Microb.* 51, 480-490.

- Mitchell, E.A.D., Bragazza, L., Gerdol, R., 2004. Testate amoebae (Protista) Communities in *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. (Bryophyta): Relationships with Altitude and Moss Elemental Chemistry. *Protist* 155, 423-436.
- Mitchell, E.A.D., Buttler, A., Grosvernier, P., Rydin, H., Albinsson, C., Greenup, A.L., Heijmans, M.M.P.D., Hoosbeek, M.R., Saarinen, T. 2000. Relationships among testate amoebae (Protozoa), vegetation and water chemistry in five Sphagnum-dominated peatlands in Europe. *New Phytol.* 26: 95-106
- Mitchell, E.A.D., Payne, R.J., Lamentowicz, M., 2008. Potential implications of differential preservation of testate amoeba shells for paleoenvironmental reconstruction in peatlands. *J. Paleolimnol.* 40, 603–618.
- Mitchell, E.A.D., Payne, R.J., O., van der Knaap, W., Lamentowicz, L., Gabka, M., Lamentowicz, M. 2013. The performance of single- and multi-proxy transfer functions (testate amoebae, bryophytes, vascular plants) for reconstructing mire surface wetness and pH. *Quaternary Research* 79, 6-13.
- Moraczewski, J., 1961, Testacea du littoral peu profonde du lac Kisajno (Région des lacs de Mazurie): *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, v. 9, p. 175-194.
- Moraczewski, J., 1971, La composition chimique de la coque d'*Arcella discoides* Ehrbg: *Acta Protozoologica*, v. 8, p.407-421.
- Müller, S., Bobrov, A.A., Schirrmeister, L., Andreev, A.A. and Tarasov, P.E., 2009. Testate amoebae record from the Laptev Sea coast and its implication for the reconstruction of Late Pleistocene and Holocene environments in the Arctic Siberia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 271: 301-315.
- Netzel, H., 1975a, Struktur und Ultrastruktur von *Arcella vulgaris* var. multinucleate (Rhizopoda, Testacea): *Archiv für Protistenkunde*, v. 117, no 3, p. 219-245, pls. 19-29.
- Netzel, H., 1975b, Die Entstehung der hexagonalen Schalenstruktur bei der Thekamöbe *Arcella vulgaris* var. multinucleata (Rhizopoda, Testacea): *Archiv für Protistenkunde*, v. 117, no. 4, p. 321-357, pls. 43-51.
- Nguyen-Viet H., Bernard N., Mitchell E.A.D., Badot P-M., Gilbert D., 2008. Effect of lead pollution on testate amœbæ communities living in *Sphagnum fallax*: An experimental study. *Ecotox. Environ. Safe.* 69, 130-138.
- Nguyen-Viet, H., 2005. Utilisation potentielle des amibes à thèque et des autres microorganismes des mousses pour la bioindication de la pollution d'origine atmosphérique

(NO², métaux lourds) : Etudes in situ et en conditions contrôlées en France et au Vietnam. Thèse de doctorat, Université de Sciences et Techniques de Franche-Comté, France. 175 p

Nguyen-Viet, H., Gilbert, D., Bernard, N., Mitchell, E.A.D, Badot, P-M., 2004. Relationship between atmospheric pollution characterized by NO₂ concentrations and testate amoebae abundance and diversity. *Acta Protozoologica*, 43: 233-329

Nikolaev, S. I., Mitchell, E. A. D., Petrov, N. B., Berney, C., Fahrni, J, Pawlowski, J. (2005). The testate lobose amoebae (order Arcellinida Kent, 1880) finally find their home within Amoebozoa. *Protist*, 156: 191-202

Nikolaev, S.I., Berney, C., Fahrni, J.F., Bolivar, I., Polet, S., Mylnikov, A.P., Aleshin, V.V., Petrov, N.B., Pawlowski, J., 2004. The twilight of Heliozoa and rise of Rhizaria, an emerging supergroup of amoeboid eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8066-8071

Ogden, C.G. 1983. Observations on the systematics of the genus *Diffflugia* in Britain (Rhizopoda, Protozoa). *Bulletin of British Museum (Natural History) – Zoology series*, 44 (1): 1-73

Ogden, C.G. 1984. Notes on testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) from Lake Vlasina, Yugoslavia. *Bulletin of the British Museum of Natural History (Zoology)*, 47: 241-263

Ogden, C.G. 1987. The taxonomic status of the genera *Pontigulasia*, *Lagenodiffflugia* and *Zivkovicia* (Rhizopoda: Difflogiidae). *Bulletin of British Museum of Natural History (Zoology)*, 52 (1): 13-17

Ogden, C.G. 1988c. Fine structure of the shell wall in soil testate amoeba *Cyclopyxis kahli* (Rhizopoda). *J. Protozool.*, 35, 537-540

Ogden, C.G., 1988a, Morphology of the organic shell matrix of *Diffflugia* (Rhizopoda) in culture, including modification by the addition of agglutinate particles: *Archiv für Protistenkunde*, v. 136, pp. 365-376

Ogden, C.G., 1988b, The role of the organic matrix in the construction of the agglutinate shell of *Centropyxis discoides* (Rhizopoda: Protozoa): *Journal of Natural History*, v. 22, pp. 137-148

Ogden, C.G., Hedley, R.H., 1980. An atlas of freshwater testate amoebae. British Museum (Natural History). Oxford University Press.

Ogden, C.G., Meisterfeld, R. 1989. The taxonomy and systematics of some species of *Cucurbitella*, *Diffflugia* and *Netzelia* (Protozoa: Rhizopoda), with an evaluation of diagnostic characters. *European Journal of Protistology*, 25: 109-128

- Ooms M., Beyens L. & Temmerman S., 2011, Testate amoebae as estuarine water-level indicators: modern distribution and the development of a transfer function from freshwater tidal marsh (Scheldt estuary, Belgium). – *Journal of Quaternary Science*, 26, 819-828
- Opravilova, V. and Hajek, M., 2006. The variation of testacean assemblages (Rhizopoda) along the complete base-richness gradient in fens: A case study from the Western Carpathians. *Acta Protozool.* 45, 191-204
- Patterson R.T., Huckerby, G., Kelly, T.J., Swindles, G.T., Nasser, N.A., 2015. Hydroecology of Amazonian lacustrine Arcellinida (testate amoebae): A case study from Lake Quistococha, Peru. *Eur. J. Protistol.* 51, 460-469.
- Patterson, R.T., Barker, T., Burbidge, S.M. 1996. Arcellaceans (Thecamoebians) as proxies of arsenic and mercury contamination in northeastern Ontario Lakes. *Journal of Foraminiferal Research*, 26: 172-183.
- Patterson, R.T., Roe, H.M., and Swindles, G.T. 2012. Development of an Arcellacea (testate lobose amoebae) based transfer function for sedimentary phosphorus in lakes. *Palaeogeography, Paleoclimatology, Palaeoecology*, 348-349:32-44
- Paulick, H., Herrmann, W., Gemmill, J.B. 2001. Alteration of Felsic Volcanics Hosting the Thalanga Massive Sulfide Deposit (Northern Queensland, Australia) and Geochemical Proximity Indicators to Ore. *Economic Geology* 96, 1175, 1200.
- Payne, R., 2012. Volcanic impacts on peatland microbial communities: A tephropalaeoecological hypothesis-test. *Quater. Int.* 268, 98–110.
- Payne, R., Kishaba, K., Blackford, J., Mitchell, E.A.D. 2006. The ecology of testate amoebae (Protists) in South- Central Alaska peatlands: building transfer function models for paleoenvironmental studies. *The Holocene*, 16: 403-14
- Payne, R.J., Kilfeather, A.A., Van der Meer, J.J.M., Blackford, J.J., 2005. Experiments on the taphonomy of tephra in peat. *Suoseura Finn. Peatl. Soc.* 56, 147–156.
- Penard E (1899) Les Rhizopodes de faune profonde dans le lac Léman. *Revue Suisse de Zoologie*, 7: 1-142
- Penard, E. 1902. Faune rhizopodique du bassin du Léman: pp. 1-714 Henry Kundig (Genève).
- Penard, E., 1891a, Contributions à l'étude des Rhizopodes du Léman: (Bibliothèque Universelle); *Archives des Sciences physique et naturelles*, ser. 3, v. 26, p. 134- 156, pl.2.

- Porter, S.M. and Knoll, A.H., 2000. Testate amoebae in the Neoproterozoic Era: evidence from vase-shaped microfossils in the Chuar Group, Grand Canyon. *Paleobiology*, 26(3): 360-385.
- Porter, S.M., Meisterfeld, R., Knoll, A.H., 2003. Vase-shaped microfossils from the Neoproterozoic Chuar group, Grand Canyon: a classification guided by modern testate amoebae. *J. Paleont.* 77, 409–429.
- Prowazek, S., von, 1900a, Cystenbildung bei den Protozoen: *Zeitschrift für angewandte Mikroskopie*, v. 5, no 10, p. 269-274, pl. 2.
- Qin, Y., Payne, R.J., Gu, Y., Huang, X., Wang, H., 2012. Ecology of testate amoebae in Dajihu peatland of Shennongjia Mountains, China, in relation to hydrology. *Front. Earth Sci.* 6, 57–65.
- Reinhardt, E., Dalby, A.P., Kumar, A., Patterson, R.T., 1998. Arcellaceans as pollution indicators in mine tailing contaminated lakes near Cobalt, Ontario, Canada. *Micropaleontology* 44:131–148
- Robinson, B.S., Bamforth, S.S., Dobson, P.J. 2002. Density and diversity of protozoa in some arid Australian soils. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 449–453
- Roe, H.M., Charman, D.J. and Gehrels, W.R. (2002) The preservation of testate amoebae in Holocene coastal deposits in the UK: applications for studies of sea-level change. *Journal of Quaternary Science*, 17, 411-429.
- Saedeleer, H. de, 1934, Beitrag zur Kenntnis der Rhizopoden: morphologische und systematische Untersuchungen und ein Klassifikationsversuch: *Mémoires du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique*, no 60, p. 1-128, pls. 1-8.
- Saucin-Meulenberg M., Bussers J.C & Jeuniaux CH., 1973, Composition chimique de la thèque de quelques thécamœbiens (Protozoaires). – *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 107, 107-113.
- Schmidt, A.R., Ragazzi, E., Coppellotti, O., Roghi, G., 2006. A microworld in Triassic amber. *Nature* 444, doi:10.1038/444835a.
- Schmidt, A.R., Schönborn W., Schäfer, U. 2004. Diverse fossil amoebae in German Mesozoic amber. *Palaeontology*, 47 (2): 185-197
- Schmitt, A.R., Girard, V., Perrichot, V. and Schönborn, W., 2010. Testate Amoebae from a Cretaceous Forest Floor Microbiocoenosis of France. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(3): 245-249.

- Schoene, B., Samperton, K.M., Eddy, M.P., Keller, G., Adatte, T., Bowring, S.A., Khadri, S.F.R., Gertsch, B., 2015. U-Pb geochronology of the Deccan Traps and relation to the end-Cretaceous mass extinction. *Science* 347, 182–184.
- Schönborn, W. 1965a. Studien über die Gattung *Diffugiella* Cash (Rhizopoda, Testacea): *Limnologica*, 3: 315-328
- Schönborn, W., 1992. Comparative Studies on the Production Biology of Protozoan Communities in Freshwater and Soil Ecosystems. *Arch. Protistenkd.* 141, 187-214.
- Schönborn, W., Dorfelt, H., Foissner, W., Krienitz, L., Schafer, U., 1999. A fossilized microcenosis in Triassic amber. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 571–584.
- Schröter, D., Wolters, V., De Ruiter, P.C., 2003. C and N mineralisation in the decomposer food webs of a European forest transect. *Oikos* 102, 294–308
- Scott D.B., Suter J.R. & Kisters E.C., 1991, Marsh foraminifera and arcellaceans of the lower Mississippi Delta: Controls on spatial distributions. – *Micropaleontology*, 37, 373-392
- Scott, D., Medioli, F., Schafer, C., 2001. Monitoring of coastal environments using foraminifera and thecamoebian indicators. Cambridge University Press, New York.
- SERNAGEOMIN (Servicio Nacional de Geología y Minería), 2015a. Ranking de los 90 volcanes activos de Chile. Gobierno de Chile.
- Skonieczny, C., Bory, A., Bout-Roumazielles, V., Abouchami, W., Galer, S.J.G., Crosta, X., Stuut, J.B., Meyer, I., Chiapello, I., Podvin, T., Chatenet, B., Diallo, A., Ndiaye, T., 2011. The 7–13 March 2006 major Saharan outbreak: multiproxy characterization of mineral dust deposited on the West African margin. *J. Geophys. Res.-Atmos.* 116
- Smith, H.G., 1974. The colonization of volcanic tephra on Deception Island by Protozoa. *British Antarctic Survey Bulletin* 38, 49–58.
- Smith, H.G., 1985. The colonization of volcanic tephra on Deception Island by protozoa: long-term trends. *Bull. Br. Antarct. Surv.* 66, 19–33.
- Smith, H.G., Bobrov, A. & Lara, E. 2008. Diversity and biogeography of testate amoebae. *Biodivers Conserv* (2008) 17: 329.
- Stefanoudis, P., Schiebel, R., Mallet, R., Durden, J., Bett, B., Gooday, A., 2016. Agglutination of benthic foraminifera in relation to mesoscale bathymetric features in the abyssal NE Atlantic (Porcupine Abyssal Plain). *Marine Micropaleontology* 123, 15-28.

Štěpánek, M., 1952. Testacea of the pond of Hrádek at Kunratice (Prague). *Acta Mus. Nat. Pragae, Ser. b.* 8, 1–55.

Stevenson, J.A., Millington, S.C., Beckett, F.M., Swindles, G.T., Thordarson, T., 2015. Big grains go far: understanding the discrepancy between tephrochronology and satellite infrared measurements of volcanic ash. *Atmos. Meas. Tech.* 8, 2069-2091.

Stout J. D. & Walker G. D., 1976, Discrimination of mineral particles in test formation by thecamoebae. – *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 95, 486-489.

Swindles G.T. & Roe H.M., 2007. Examining the dissolution characteristics of testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) in low pH conditions: Implications for peatland palaeoclimate studies. – *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 252, 486-496

Swindles, G.T., Amesbury, M.J., Turner, T.E., Carrivick, J.L., Woulds, C., Raby, C., Mullan, D., Roland, T., Galloway, J.M., Parry, L., Kokfelt, U., Garneau, M., Charman, D., Holden, J. 2015. Evaluating the use of testate amoebae for palaeohydrological reconstruction in permafrost peatlands. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 424, 111-122.

Swindles, G.T., Blundell, A., Roe, H.M., Hall, V.A., 2010. A 4500-year proxy climate record from peatlands in the North of Ireland: the identification of widespread summer 'drought phases'? *Quat. Sci. Rev.* 29, 1577-1589.

Swindles, G.T., Green, S.M., Brown, L., Holden, J., Raby, C., Turner, E., Smart, R., Peacock, M., Baird, A., 2016. Evaluating the use of dominant microbial consumers (testate amoebae) as indicators of blanket peatland restoration. *Ecological Indicators* 69, 318-330.

Szelecz, I., Fournier, B., Seppey, C., Amendt, J., Mitchell, E. 2014. Can soil testate amoebae be used for estimating the time since death? A field experiment in a deciduous forest. *Forensic Science International* 236, 90-98.

Thomas, R., 1958a. Le genre *Plagiopyxis* Penard. *Hydrobiologia*, 10: 198-214

Thomas, R., 1958b. Réflexions sur la nutrition des thécamoebiens. *Travaux du Laboratoire de Botanique et Cryptogamie de la Faculté de Médecine et Pharmacie de l'Institut de Bordeaux*: 1-2

Thomas, R., 1961, Note sur quelques Rhizopodes de France: *Cahiers des Naturalistes, Bulletin des Naturalistes Parisiens, new series*, v. 17, p. 74-80.

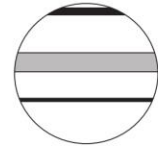
Thomas, R., Gauthier-Lièvre, L. 1959. Le genre *Lesquereusia* Schlumberger 1845 (Rhizopodes testacés). *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord*, 50: 34-86

- Tsyganov, A.N., Aerts, R., Nijs, I., Cornelissen, J.H.C., Beyens, L. 2012. Sphagnum-dwelling testate amoebae in subarctic bogs are more sensitive to soil warming in the growing season than in winter: the results of eight-year field climate manipulations. *Protist* 163, 400-414.
- Tsyganov, A.N., Nijs, I., Beyens, L. 2011a. Does climate warming stimulate or inhibit soil protist communities ? A test on testate amoebae in high-arctic tundra with free-air temperature increase. *Protist* 162: 237-248
- Turner, T.E., Swindles, G.T., 2012. Ecology of Testate Amoebae in Moorland with a complex fire history: implications for ecosystem monitoring and sustainable land management. *Protist* 163, 844–855.
- Valentine, J., Davis, S.R., Kirby, J.R., Wilkinson, D.M., 2013. The use of testate amoebae in monitoring peatland restoration management: case studies from North West England and Ireland. *Acta Protozool.* 52, 129–145.
- Vazquez Riveiros N., Babalola A.O., Boudreau R.E.A., Patterson R.T., Roe H.M. & Doherty C., 2007, Modern distribution of salt marsh foraminifera and thecamoebians in the Seymour-Belize Inlet Complex, British Columbia, Canada. – *Marine Geology*, 242, 39-63
- Von Karl Rauenbusch. 1987. Biology and fine structure (SEM studies) of terrestrial testacea in forest soils (rhizopoda, protozoa). *Arch. Protistenkd.* 134, 191-294.
- Wall, A.A.J., Magny, M., Mitchell, E.A.D., Vanniere, B., Gilbert, D. 2010. Response of testate amoeba assemblages to environmental and climatic changes during the Lateglacial-Holocene transition at Lake Lautrey (Jura Mountains, eastern France). *J. Quat. Sci.* 25, 945–956.
- Wanner, M., Elmer, M., Sommer, M., Funk, R., Puppe, D. 2015. Testate amoebae colonizing a newly exposed land surface are of airborne origin. *Ecological Indicators* 48, 55-62.
- Wanner, M., Meisterfeld, R., 1994. Effects of some environmental factors on the shell morphology of testate amoebae (rhizopoda, protozoa). *European Journal of Protistology* 30, 191-195.
- Watson, E.J., Swindles, G.T., Lawson, I.T., Savov, I.P. 2015. Spatial variability of tephra and carbon accumulation in a Holocene peatland. *Quat. Sci. Rev.* 124, 248–264.
- Wilkinson, D.M. 2001. What is the upper size limit for cosmopolitan distribution in free-living microorganisms? *J Biogeography* 28:285–291
- Wilkinson, D.M. 2008. Testate amoebae and nutrient cycling: peering into the black box of soil ecology. *TREE* 23(11) : 596-599.

- Wilkinson, D.M., Koumoutsaris, S., Mitchell, E.A.D. & Bey, I. 2012. Modelling the effect of size on the aerial dispersal of microorganisms. *Journal of Biogeography*, 39, 89-97
- Yang, J., Smith, H. G., Sherratt, T. N., Wilkinson, D. M. 2010. Is there a size limit for cosmopolitan distribution in free-living microorganisms? A biogeographical analysis of testate amoebae from polar areas. *Microb. Ecol.* 59: 635–645
- Zapata, J. 2005. Tecamebas (Protozoa, Rhizopoda) de la turbera Rucapihuel (40°34'42.5" S; 73°34'31.4" W), Chile. *Bol. Soc. Biol. Concepción* 76, 39–56.
- Zapata, J., Fernández, L., 2008. Morphology and morphometry of *Apodera vas* (Certes, 1889) (Protozoa: Testacea) from two peatlands in southern Chile. *Acta Protozool.* 47, 389–395.
- Zapata, J., Matamala, M., 1987. Tecamebianos del lago Kitiash (Isla Rey Jorge, Antártica). *Biota* 3, 59–71.
- Zapata, J., Toledo, R., Rojas, M., 2007. Clave ilustrada para los géneros de tecamebas (Protozoa, Rhizopoda) de la laguna Mallín (Parque Nacional Puyehue: 40°45' S; 72°18.7' O), Chile. *Bol. Soc. Biol. Concepción* 78, 67–76.
- Zapata, J., Yáñez, M., Rudolph, E., 2008. Tecamebianos (Protozoa: Rhizopoda) de una turbera del Parque Nacional Puyehue (40°45' S; 72°19' W), Chile. *Gayana* 72, 9–17.

Annexes





Multiproxy approach for Holocene paleoenvironmental reconstructions from microorganisms (testate amoebae and foraminifera) and sediment analyses: The infilling of the Loire Valley in Nantes (France)

The Holocene
1–14
© The Author(s) 2014
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0959683614561883
hol.sagepub.com
SAGE

Maxence Delaine,^{1,2} Eric Armynot du Châtelet,² Viviane Bout-Roumazelles,² Evelyne Goubert,³ Valérie Le Cadre,³ Philippe Recourt,² Alain Trentesaux² and Rémy Arthuis⁴

Abstract

Foraminifera and testate amoebae are jointly used with sediment characteristics (sediment size, calcium carbonate, C, H, N and S proportions, and clay mineralogy) to reconstruct the Holocene sediment infilling of the Loire estuary (Nantes, France). The results reveal the infilling of the Loire Valley during the Holocene. Deposited on the Hercynian substratum, the first deposits are made of gravels with rare associated fauna. This corresponds to the gravel lag usually present as basal deposits in the river course. The clay mineralogy indicates an erosion of the substratum. Then, from 8850 to 5850 cal. yr BP, estuarine fauna settled in a laminated sediment that alternates between clay and sand. The smectite associated with kaolinite and illite suggests increased input from the Sèvre Nantaise River. The fauna progressively shifts from estuarine to marine, indicating a rise in the sea level. From 5850 cal. yr BP, the pace of the sea level rise slowed and channels migrated, implying intense erosion. After 2100 cal. yr BP, the fauna was dominated by testate amoebae, indicating a continentalization of the environment. The top samples reflect recent human activity and urbanization.

Keywords

foraminifera, Holocene, paleoenvironmental reconstructions, sediment infilling, testate amoebae

Received 21 May 2014; revised manuscript accepted 22 September 2014

Introduction

Foraminifera (Rhizaria) and testate amoebae (Rhizaria and Amoebozoa) are unicellular eukaryotes, and are abundant and diversified in all modern aquatic and marine environments (Lee et al., 2000). Foraminifera are the best known and the most diversified of all microfossils (Sen Gupta, 1999). They are widely distributed in all marine and transitional marine environments (Murray, 2006; Scott et al., 2001), and play a significant role in global biogeochemical cycles of inorganic and organic compounds (Haynes, 1981; Lee and Anderson, 1991). It is well known that the composition, species diversity and spatial distribution of benthic foraminiferal assemblages are greatly controlled by environmental parameters (Hayward et al., 2004; Murray, 2006). Indeed, numerous environmental factors influence the distribution of foraminifera, including salinity (Gehrels et al., 2001), organic matter (OM) quality (Armynot du Châtelet et al., 2009) and sediment texture (Armynot du Châtelet et al., 2010; Magno et al., 2012).

Testate amoebae are ubiquitous and live in various freshwater environments. In particular, they are well developed in peat lands, rivers, lakes or brackish-water settings (Charman, 2001). Rare species can survive in brackish waters (Van Hengstum et al., 2008; Vazquez Riveiros et al., 2007). They also have the following advantages: high species diversity, widespread distribution,

and the ability to tolerate extreme conditions (Beyens and Chardez, 1995) and/or react quickly to environmental change (Booth et al., 2004). Testate amoebae distribution is controlled by salinity (Gehrels et al., 2001; Van Hengstum et al., 2008). Other parameters also affect the development of testate amoebae communities, such as pollution (Nguyen-Viet et al., 2008) and seasonal variables like temperature, light penetration, primary production and precipitation (Neville et al., 2010).

¹UMR 6249 CNRS Chrono-Environnement, Université de Franche-Comté, France

²UMR 8187 CNRS Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, Université Lille I, France

³GMGL, UMR 6538 CNRS Domaines Océaniques, Université de Bretagne-Sud, France

⁴Centre Archéologique INRAP, UMR 6566 'Centre de recherche en archéologie, archéosciences, histoire', INRAP, France

Corresponding author:

Maxence Delaine, UMR 6249 CNRS Chrono-Environnement, Université de Franche-Comté, 4 Place Tharradin, B.P. 71427, 25211 Montbéliard cedex, France.

Email: maxence.delaine@univ-fcomte.fr

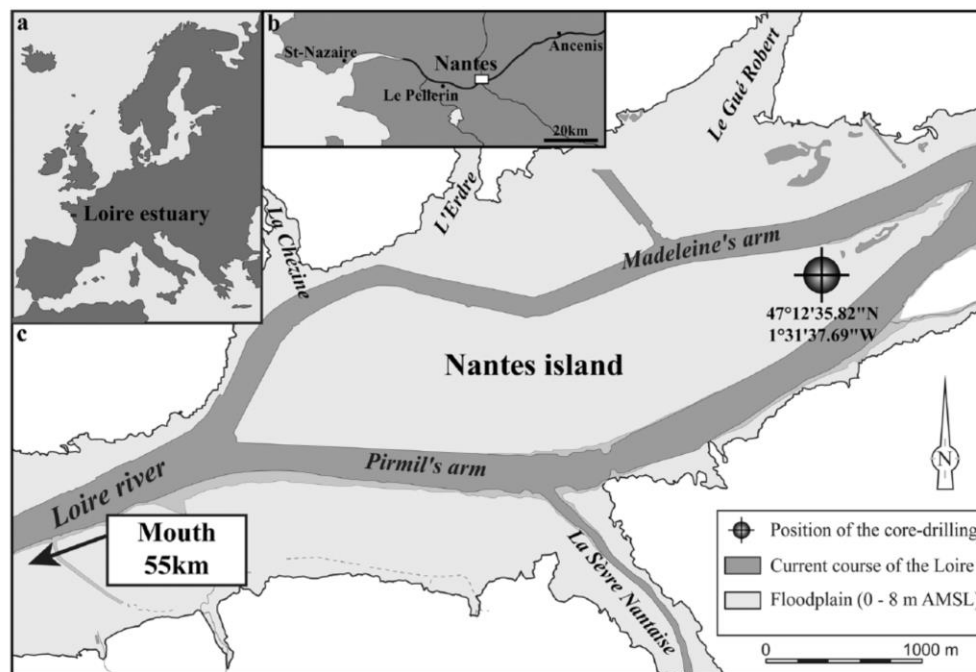


Figure 1. Localization of the study site in the European Atlantic coast (a) Loire estuary and (b) position of the core drilling at the eastern extremity of the (c) Nantes Island. AMSL (elevation above mean sea level, relative to the average sea level datum: NTF, ellipsoid Clarke 1880 IGN).

Foraminifera are currently used to reconstruct marine paleoenvironments (Armynot du Châtelet et al., 2005; Edwards and Horton, 2000; Leorri et al., 2010), and testate amoebae are utilized in the same way as a common tool for freshwater paleoenvironmental reconstruction (Asioli et al., 1996; Charman, 2001; Ellison, 1995; Medioli and Scott, 1988; Wall et al., 2010). Meanwhile, in transitional environments (e.g. those with salinity constraints), a combination of both foraminifera and testate amoebae has been used in historical studies to reproduce environments of the past (Duleba and Debenay, 2003; Eichler et al., 2004; Gehrels et al., 2001; Lloyd, 2000).

An extensive study over about 15 worldwide estuaries published in 2006 (Dalrymple, 2006) indicates that, following the Zaitlin et al. (1994) model, most of the late Pleistocene–Holocene estuaries experienced severe changes in sediment fluxes during the overall rising sea level system. Most estuaries first present a transgressive unit prograding shoreward followed by a seaward prograding Highstand System Tract (HST; Dalrymple, 2010). French estuaries (whose Loire estuary), follow this general trend (Chaumillon et al., 2010; Proust et al., 2010). Numerous paleoenvironmental studies have examined the fossil fluvial valleys preserved on continental shelves. It is also the case that various approaches have been used all around the Bay of Biscay: seismic survey (Chaumillon et al., 2010; Menier, 2003; Proust et al., 2010), core drilling (Sorrel et al., 2010; Traini et al., 2013), or a combination of seismic/sedimentological/bio-indicator tools (Perez-Belmonte, 2008; Poirier, 2010). Nevertheless, no study has examined the continental parts of these valleys.

Using a multiproxy approach (sediment and faunal characteristics), the main objective of this research is to reconstruct the evolution of the environmental deposits during the Holocene sea level rise in the Loire upper estuary. This study allows a better understanding of the estuarine microfaunal response during the Holocene transgressive, which could be of importance for other worldwide paleoenvironmental studies.

Study area

The Loire River drains a watershed of 115,000 km² and flows into the Atlantic Ocean in the widely developed continental shelf of the Bay of Biscay. The Loire estuary extends over 100 km from Ancenis (upper limit for the tidal wave) to Saint-Nazaire (Figure 1). The flow rate ranges from 80 to 5500 m³/s (850 m³/s on average; Etcheber et al., 2007), while the turbidity reaches 3 g/L and the tidal prism is 3 × 10⁹ m³ (Etcheber et al., 2007). The seawater intrusion reaches 65 km upstream (Ciffroy et al., 2003b), and the turbidity maximum zone constitutes a stock of 1.5 × 10⁶ tons of fine particles with a residence time between 4 and 10 months. The sedimentation rate ranges from 0.5 cm/year upstream close to the Island of Nantes to 4 cm/year downstream close to Le Pellerin (Ciffroy et al., 2003b). During the Holocene, the thickness of the accumulated sediments was ca. 30 m near Nantes and ca. 40 m close to the river mouth in Saint-Nazaire (Ottmann et al., 1968; Ters et al., 1968).

The spatial extent of the flood plain is controlled by the lithology and the Hercynian substratum structure. The Loire watershed is composed of Paleozoic (Hercynian) metamorphic and magmatic bedrock and Mesozoic to Cenozoic sedimentary formations (Proust et al., 2010; Thinon et al., 2008). The northern part of the watershed is composed of altered granites, shales and gneiss that provide both illite and kaolinite (Delfau and Le Berre, 1981; Esteoule-Choux, 1967). The southern part of the watershed is composed of sand and sandy marl from which smectite is derived, and altered amphibolite and gabbros that provide vermiculite and other clay minerals (Esteoule-Choux, 1967).

The larger extension of the estuary is bordered by a tidal marsh and a tidal flat. The Nantes area is characterized by an island that is built from Hercynian headland. This so-called Nantes Island is 4.9 km long and 1 km wide. It is surrounded by two river channels: the Madeleine channel to the north and the Pirmil channel to the south (Figure 1). The area is now widely urbanized.

Material and methods

The core and the sampling

The core is situated close to Nantes Island (Figure 1). It was selected from nine cores drilled for a Collective Research Program (PCR Loire) that took place from 2010 to 2013. These cores were positioned following the inventory of the sedimentary deposits preserved within the Loire valley (Arthus and Nauleau, 2008). This inventory is based on the 1586 core drillings carried out and compiled by The French geological survey (Bureau de Recherches Géologiques et Minières) in the area (available online at <http://infoterre.brgm.fr/>). The drilling was conducted with a swindler with a piston corer, and produced cores that are 1.5 m long with a 10 cm diameter. The total length is 30 m (the longest core in the area) and reaches the Hercynian substratum.

The core is located on the ancient channel of the Loire River and consequently records most of the sediment deposits that occurred throughout the Holocene. Two sets of sediment samples were selected: (1) 177 samples were chosen for the sediment grain size analyses, and (2) of these, 50 were also subjected to microfaunal analyses, calcium carbonate content, C and N elemental analyses, and a clay mineralogy analysis. The second set of samples was selected according to clayey and silty sediment grain size, which is more suitable for larger foraminiferal database and subsequent interpretation in estuaries (e.g. Armynot du Châtelet et al., 2009).

Sediment analyses

Sediment grain size. As a first step, the sediment grain size was eye-estimated to define the stratigraphic column and the lithologic units. Next, the 177 selected samples were analysed using the principle of diffraction of a monochromatic laser beam on suspended particles (Malvern Mastersizer 2000, red He–Ne laser, 632 and 466 nm wave lengths). This method is detailed by Trentesaux et al. (2001). Measurements can range from 0.02 to 2000 μm , with an obscuration of between 10% and 20%. A maximum of two modes were determined and used as descriptive parameters. Grains were grouped into six size classes: clay (<2 μm), fine silt (2–10 μm), sortable silt (10–63 μm), fine and very fine sand (63–250 μm), medium sand (250–500 μm), and coarse and very coarse sand (>500 μm).

Calcium carbonate. The calcium carbonate content was determined from 1 g of finely crushed bulk sediment using a Bernard calcimeter. The proportions are expressed as a dry sediment weight. Measurements were taken in triplicate for each sample. Reproducibility was good and all the three measurements were processed as a mean.

OM. The quantity and quality of the OM was approximated by estimating the total organic carbon (TOC) and N content in the sediment. This technique used a FlashEA 1112 Elemental Analyser (Thermo) and is explained in a former study performed in a similar environment by Armynot du Châtelet et al. (2009). The analysis was performed on 1.5–2 mg of sample added to approximately 5 mg of vanadiumpentoxide, used as a combustion catalyst. 2,5-bis(5-tert-butyl-benzoxazol-2-yl)thiophene (BBOT) was used as standard. The TOC content was then determined by subtracting the carbonate carbon (deduced from the calcium carbonate proportion) from the total C. Measurements were taken in duplicate for each sample and a mean was calculated after checking that there was no dissimilarity. An estimation of the OM quality was determined with the TOC/N ratio. Fresh OM from microalgae, which are protein-rich and cellulose-poor, has atomic TOC/N values that are commonly between 4 and 10, whereas vascular land plants, which are protein-poor and

cellulose-rich, create OM that usually has TOC/N ratios of 20 and greater (Meyers, 1994). The proportions of OM that originate from these two general sources can consequently be distinguished by their TOC/N ratios.

Clay mineralogy. The clay mineralogy was used to trace the origin of the sediment in the estuary. The protocol used for clay mineralogy analyses is the classic procedure described by Bout-Roumazeilles et al. (1999). The analyses were run on a Brucker Endeavor D4 diffractometer coupled with a LynkEye detector between 2.49° and 32.5°. Each clay mineral was then characterized by its layer plus interlayer interval as revealed by an XRD analysis (Brindley and Brown, 1980). The semi-quantitative estimation of the abundances of the various clayey minerals is based on peak areas and added together to obtain 100% (smectite + illite + vermiculite + mixed-layers + chlorite + kaolinite = 100%). The error on the reproducibility of the measurements is estimated to be <5% for each clay mineral, as checked by an analysis of replicate samples.

Microfaunal analysis

The 50 samples (~20 cm³ each) were wet sieved through 38, 63, 125 and 315 μm mesh sieves. Five samples were used to identify the size fraction corresponding to the size of the fauna. Rare specimens are present in the 38–63 μm fraction. As a consequence, the study's focus is on the 63–315 μm fractions. Within these fractions, terrigenous grains on the one hand and foraminifera and testate amoebae on the other were separated by flotation on trichloroethylene ($d = 1.46 \text{ g/cm}^3$). A detailed control of the residue of three test samples (the latter described as harbouring a rich fauna) was used to validate the methods: no foraminifera or testate amoebae were found in these residues.

Microfaunal observation, extraction and determination were carried out under a binocular Olympus SZX16 with a maximum magnification of 115. The taxonomic references used for the testate amoebae were: Leidy (1879), Ogden and Hedley (1980), Cash and Hopkinson (1905), Lee et al. (2000) and Clarke (2003). For the foraminifera, the taxonomic references were: Brady (1884) and Cimerman and Langer (1991). Only the species present as a proportion of at least 5% of at least one sample were selected for the statistical analyses. This procedure allowed us to remove the rare species.

The testate amoebae and foraminifera were classified into eight ecological groups (EGs): freshwater, tidal channel under a continental influence, salt marsh, tidal flat, tidal channel, marine infralittoral, marine circalittoral, and widespread estuarine species. The marine infralittoral group was subdivided into four subgroups: epiphytes, dysoxic/anoxic tolerant infauna, OM rich and low O₂ content tolerant infauna/epifauna, and opportunist oxic epifauna. The ecological groupings are based on the work of: Severin (1983), Jones and Charnock (1985), Bernhard (1986), Corliss and Chen (1988), Duleba et al. (1999) and Goubert et al. (2001).

Radiocarbon dating

Six levels were dated by the ¹⁴C dating method. The maximal interval between two dated samples was 6.6 m. The samples were processed in the Beta Analytic laboratory and AMS-dated (classical dating of the short lived single-component materials which have been well preserved within the sediment).

The dates obtained were used to calculate an age–depth model, which was produced using the Bacon (Blaauw and Christen, 2011) approach: age–depth modelling uses Bayesian statistics to reconstruct Bayesian accumulation histories for deposits. The age-model was computed using the WinBacon package for the R software. The radiocarbon ages were converted to calendar ages

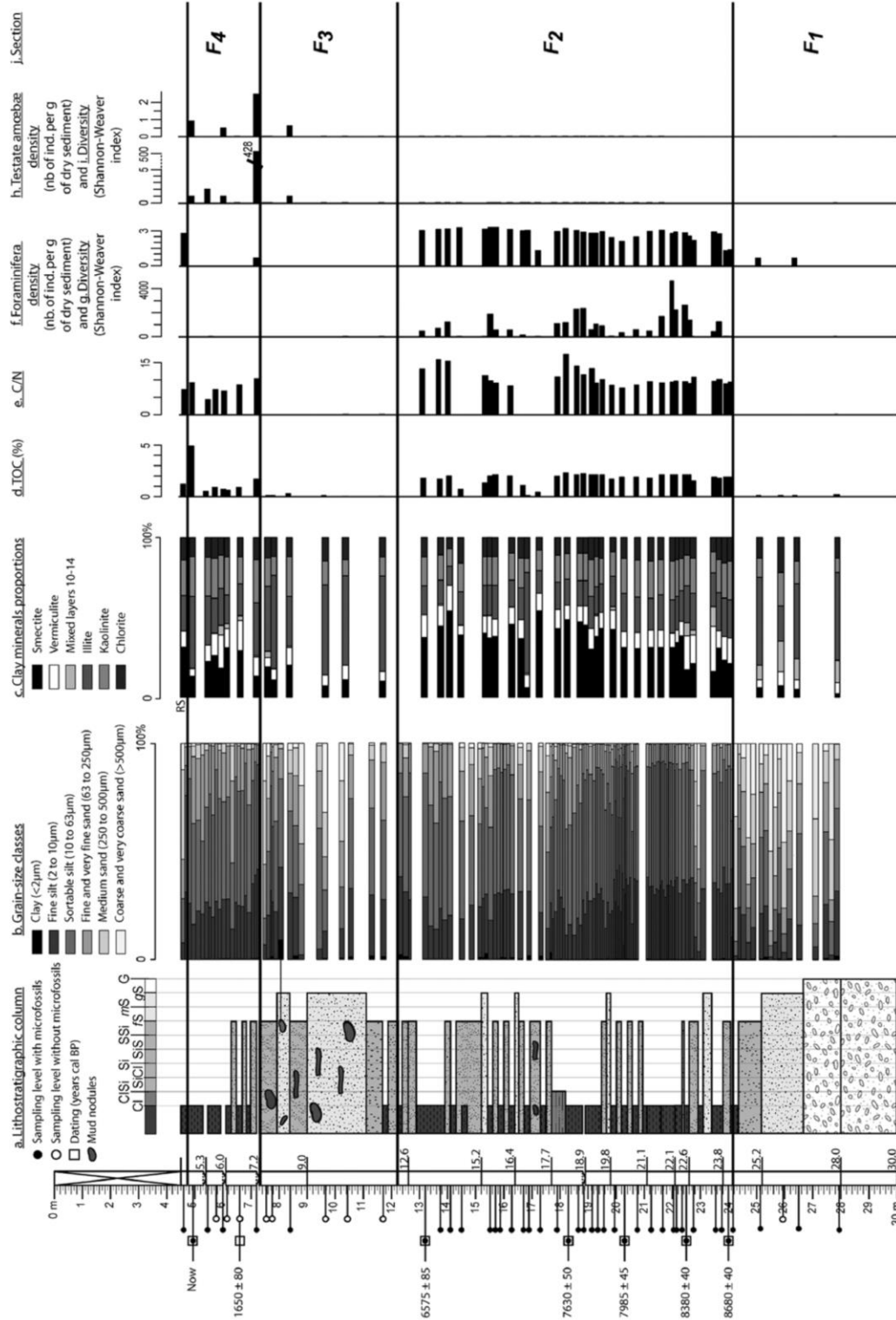


Figure 2. Along core analyses: (a) reconstruction of the lithostratigraphic column, (b) proportion of the grain size classes (Cl: clay, CiSi: clayey-silt, Si: silty clay, SiS: silty sand, SSi: sandy silt, SiS: fine sand, mS: medium sand, gS: gravelly sand, G: gravels), (c) clay mineral proportions, (d) total organic carbon (TOC in %), (e) TOC/N ratio, (f) foraminifera density (number of individuals per gram of dry sediment), (g) foraminifera diversity (Shannon-Weaver index), (h) testate amoebae density (number of individuals per gram of dry sediment), (i) testate amoebae diversity (Shannon-Weaver index), and (j) the four sections (F₁ to F₄) of the evolution of the Nantes Island environment.

Table 1. Dating results of the six samples selected all along the core, obtained by the ^{14}C dating technique.

Depth (cm)	Measured age (BP)	Calibrated age (BP)
497	106.8±0.3	0
660	1780±30	1570–1730
1319	5770±30	6490–6660
1832	6790±30	7580–7680
2030	7170±40	7940–8030
2249	7560±40	8340–8420
2400	7860±40	8590–8770

using IntCal13 (Reimer et al., 2013). The age–depth model obtained was then discussed in light of the results obtained from the sediment and faunal characteristics.

Statistical analysis

The contingency, proportion and density were calculated based on microfaunal counting. The diversity index (H' – Shannon–Weaver index) was calculated as follows (Eq. 1):

$$H' = -\sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i \quad (1)$$

where i is the species and P_i is species proportions compared with the total number of species.

All of the biological and sedimentological data were treated with the integrated suite R (R-Development-Core-Team, 2014) with the following packages: Base (descriptive statistics), Vegan (diversity calculation), Rioja (construction of diagrams with timescale), Bacon (Blaauw and Christen, 2011; age–depth modelling).

Results

Lithology and sediment characteristics

Lithology, grain size and dating. The total length of the drilling was 30 m (Figure 2a). The top 4.5 m is composed of clearings and was not studied further. The base of the core (from 30 to 26.70 m) comprises gravely sediment, followed by coarse to fine sand (from 26.70 to 24.2 m). These levels are grouped in Section F₁. Another section with coarse sediment is also observed from 12.2 to 7.2 m (Section F₃), while laminated sediment with sizes ranging from clayey-silt to fine sand are observed (Section F₂) between these two sections. Three intervals with fine grain size sediments are observed in Section F₂ (between 22.3 and 21 m, 19.5 and 18.2 m, and then 13.9 and 12.9 m). The top section (from 7.2 to 4.5 m), meanwhile, is initially laminated and then the grain size rapidly decreases in size, reaching clayey-silt (Section F₄).

The 177 core sediment analyses revealed that the grain size ranges from clay to sand (Figure 2b). A total of 94 samples (more than 50% of the total sample) have mixed sand–silt–clay and clayey-silt sediment. A total of 18 samples are sand in size and 19 are clayey-sand. No pure clay sediments were measured.

A total of 41 samples present a bi-modal distribution. The coarsest mode ranges from 123 to 554 μm , while the fine particle mode ranges from 8.5 to 57 μm . The ^{14}C ages (Table 1) are stratigraphically consistent and indicate that the sediments are Holocene in age, with a maximum age of 8770 cal. yr BP at a depth of 24.0 m.

Clay mineralogy. Six clay minerals were observed: smectite, illite, kaolinite, chlorite, vermiculite, and mixed-layers 10–14 (Figure 2c and Supplementary Data 1, available online). The chlorite

proportion is almost constant throughout the core ($13\% \pm 2\%$). The other clay minerals are grouped into three associations distributed along the core as follows:

- Between the bottom of the core to 24.2 m, the clay fraction is dominated by illite (~45%), associated with mixed-layers and kaolinite. The vermiculite and smectite proportions are small (~7% and ~5%, respectively). This association corresponds to Section F₁.
- Between 24.2 and 12.2 m, smectite is dominant (~35%) and associated with illite (~21%) and kaolinite (~18%). The mixed-layer mineral proportions are small (less than 9%). This association corresponds to Section F₂.
- Between 12.2 and 4.5 m, higher proportions of illite (~37%) and kaolinite (~20%) are observed than in the underlying sections. These dominant minerals are associated with smectite (~18%). This clay mineral association corresponds to Sections F₃ and F₄.

OM quality and quantity. The TOC is variable and ranges from 0% to 5% (Figure 2d). Almost no TOC (0.12%) is measured in the lowest section of the core. This corresponds to Section F₁, with the coarsest sediments. All along the second section with coarse sediment (F₃), the TOC proportions are slightly higher, but never exceed 1%. In Section F₂, the sediment contains a mean TOC of 1.78%. A total of 33 samples (~80%) have a detectable proportion of N and enable the C/N ratio to be calculated (Figure 2e). The C/N ranges from 4.28 at 5.45 m to 17.33 at 18.32 m. For most of the sample, the C/N ranges from 9 to 12.

Microfaunal analysis

Microfaunal content. Among the 50 selected samples, 41 contained specimens of foraminifera and/or testate amoebae. A total of 10,726 individuals were extracted and identified at a species level: 10,384 are foraminifera and 342 testate amoebae. These specimens belong to 71 species of foraminifera and 23 species of testate amoebae. The main species are illustrated in Figures 3–6. The counting is set out in Supplementary Data 1, available online.

The density of the foraminifera is highly variable along the core, ranging from 0 to 4600 specimens per gram of sediment (Figure 2f). No faunas are observed in the two coarsest sediment sections, F₁ and F₃. Three levels of high density are observed: from 22.7 to 21.6 m, 19.8 to 18 m, and at around 16.0 m. Testate amoebae are only observed in the upper section of the core between 8.4 m and the top (Figure 2h). The highest density reaches 428 individuals per gram of sediment (at 7.2 m). The mean density for the other samples where testate amoebae occur is 1.25 specimens per gram of sediment. Save for only one sample, the levels where testate amoebae occur correspond to the levels with an absence of foraminifera.

The diversity of the foraminifera ranges from 0 to 3.3 (Figure 2g), while that of the testate amoebae ranges from 0 to 2.5 (Figure 2i). This diversity is high for the foraminifera between 24.2 and 12.2 m (Section F₂), but is lower before and after that section. One sample close to 17.7 m has slightly lower diversity compared with its neighbouring samples. The top sediment sample reveals a great diversity of foraminifera, reaching 2.8. The diversity of the testate amoebae (above 8.5 m) reached 2.5 in only one sample at 7.20 m.

Haynesina germanica, with 20% of the total counted foraminifera, is the most common species. The other most frequent foraminifera species are as follows: *Ammonia tepida* (7.8%), *Brizalina variabilis* (7.5%), *Bolivina pseudoplicata* (7.4%) and *Fissurina lucida* (7.1%). The most frequent testate amoebae species are as follows: *Centropyxis constricta* (29.7%), *Centropyxis aerophila*

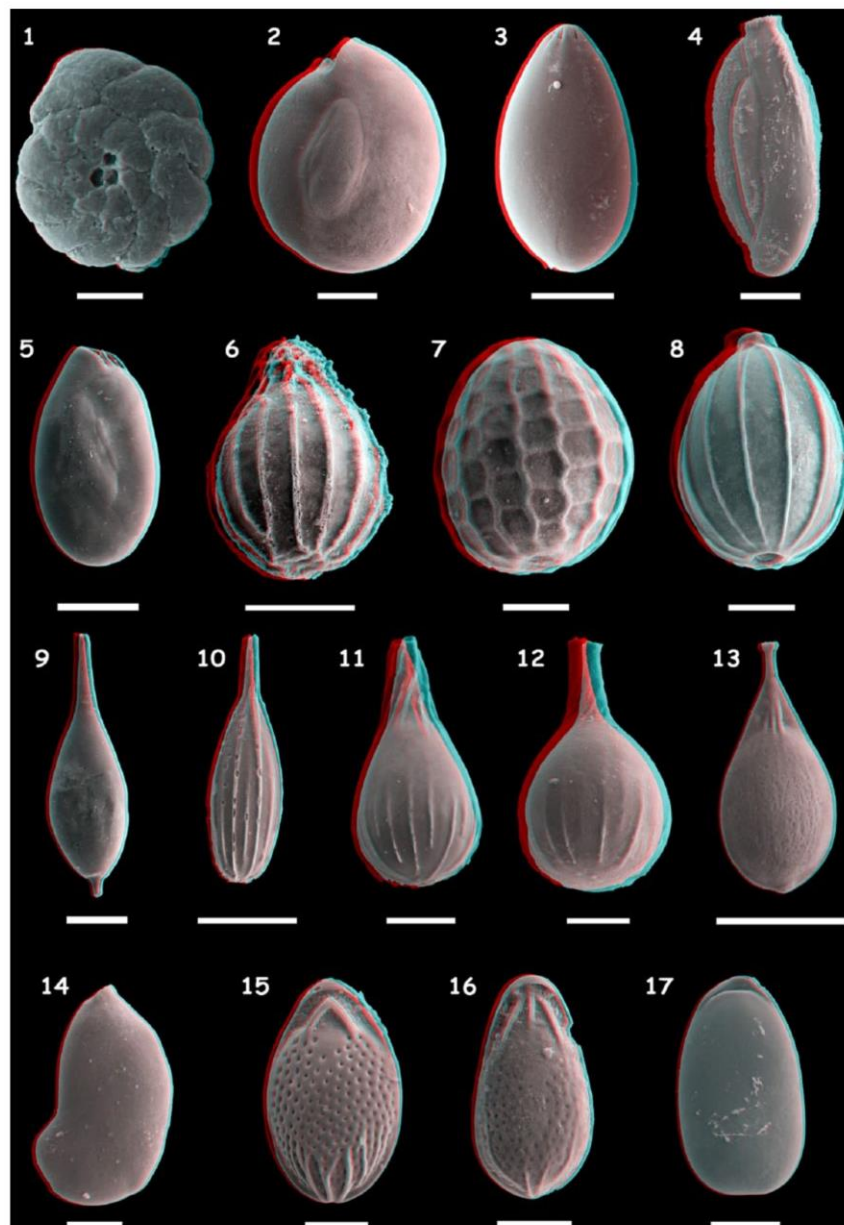


Figure 3. Anaglyphic (online coloured version only) SEM (scanning electron microscope) pictures showing foraminifera diversity of Nantes Island (1/2). 1: *Remaneica plicata* (50 μ m); 2: *Miliolinella subrotunda* (50 μ m); 3: *Globulina minuta* (50 μ m); 4: *Adelosina longirostra* (50 μ m); 5: *Quinqueloculina seminula* (100 μ m); 6: *Homalohedra williamsoni* (100 μ m); 7: *Favulina scalariformis* (50 μ m); 8: *Lagena cf. sulcata* (50 μ m); 9: *Hyalinonetrion cf. clavatum* (100 μ m); 10: *Lagena gracilis* (100 μ m); 11: *Lagena sulcata spirata* (50 μ m); 12: *Lagena sulcata* (50 μ m); 13: *Vasicostella* sp. (100 μ m); 14: *Astacolus crepidulus* (50 μ m); 15: *Fissurina cf. semimarginata* (50 μ m); 16: *Fissurina semimarginata* (50 μ m); and 17: *Parafissurina* sp. (50 μ m).

(9.6%), *Centropyxis aculeata* (7.5%), *Diffflugia* sp. (7.2%), *Cyclopyxis kahli* (6.9%) and *Centropyxis ecornis* (6.9%).

Ecological groups

The foraminifera and testate amoebae species are subdivided into eight EGs (Supplementary Data 2, available online): freshwater, tidal channel under continental influence, salt marsh, tidal flat, tidal channel, marine infralittoral, marine circalittoral, and widespread estuarine species. The marine infralittoral group has been further subdivided into four sub-groups: epiphytes, dysoxic/anoxic tolerant infauna, OM rich and low O₂ content tolerant

infauna/epifauna, and opportunist oxic epifauna. The tidal channel under continental influence, salt marsh, tidal flat and tidal channel groups are all estuarine EGs.

The EGs evolve over time and are grouped into three periods (Figure 6). The Sections F₁, F₃ and F₄ are composed of only one or two EGs, whereas Section F₂ comprises all of the EGs but with variations in their relative proportions. The estuarine EGs are dominant at the bottom of the section. Moving up to 20.3 m, the proportion of the marine EGs increases (from 23% to 63%). Then, from 20.3 to 16.88 m, an alternation of the dominance of estuarine (mainly salt marsh and tidal channel under continental influence) and marine dominated EGs is observed. The samples at 20.3 and

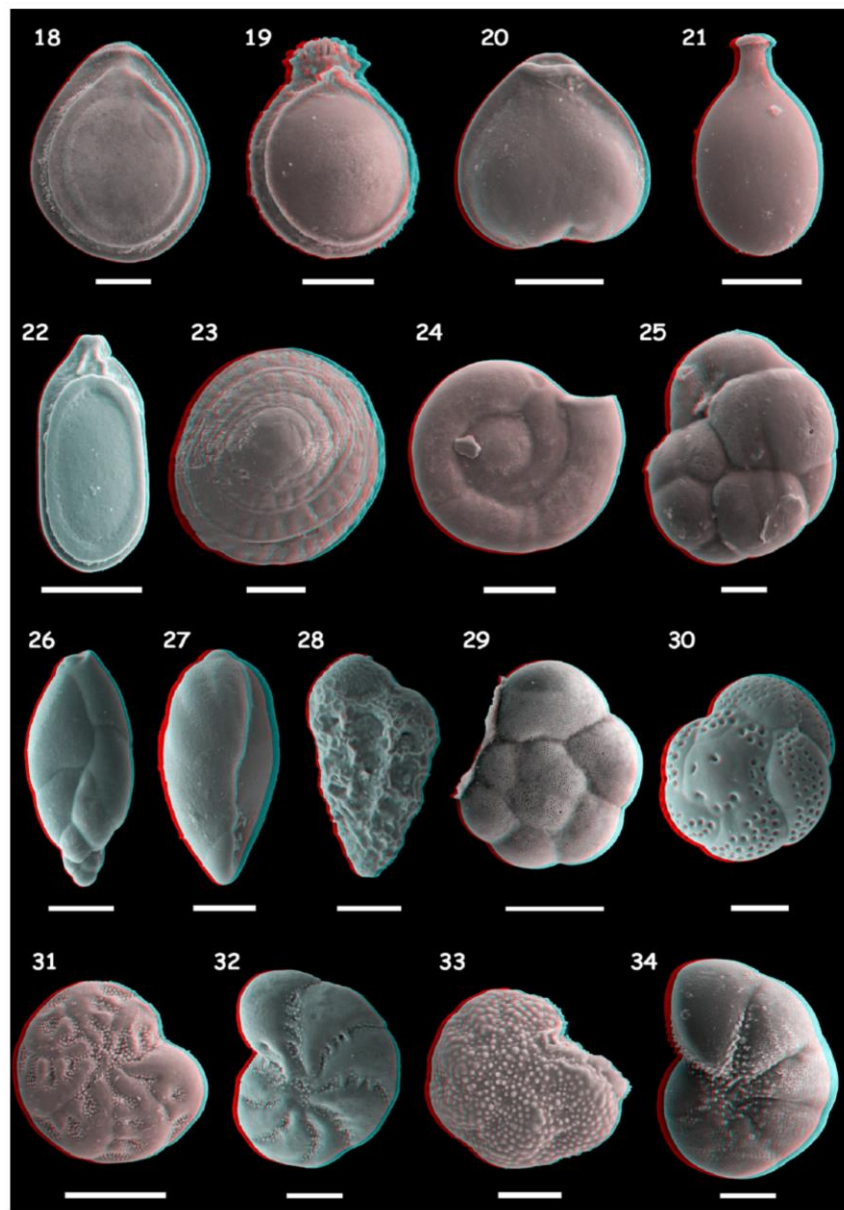


Figure 4. Anaglyphic (online coloured version only) SEM (scanning electron microscope) pictures showing foraminifera diversity of Nantes Island (2/2). 18: *Fissurina fasciata carinata* (50 μm); 19: *Paliolatella orbignyana* (50 μm); 20: *Lagenosolenia plena* (50 μm); 21: *Lagenosolenia seguenziana* (50 μm); 22: *Lagenosolenia lagenoides* (100 μm); 23: *Patellina corrugata* (50 μm); 24: *Cornuspira involvens* (50 μm); 25: *Cassidulina crassa* (20 μm); 26: *Stainforthia fusiformis* (50 μm); 27: *Bulliminella elegantissima* (50 μm); 28: *Bolivina pseudoplicata* (50 μm); 29: *Ammonia tepida* (100 μm); 30: *Rosalina bradyi* (50 μm); 31: *Elphidium earlandi* (100 μm); 32: *Criboelphidium gerthi* (50 μm); 33: *Criboelphidium margaritaceum* (50 μm); and 34: *Haynesina germanica* (50 μm).

16.88 m reveal an exceptionally high proportion of the tidal channel under continental influence EG. From 16.88 m up to the upper sample of this section, the proportion of each EG is roughly constant, with the marine EGs dominating (more than 56%) in association with the salt marsh EG. This increase in the proportion of the marine EG is due to the rise in the amount of the marine circalittoral and dysoxic/anoxic tolerant infauna EGs.

The highest proportion of the epiphytic EG is always associated with the highest percentage of the salt marsh and tidal channel under continental influence EGs.

Section F₄ comprises only the freshwater EG that is characterized by testate amoebae. The uppermost samples (RS in Figure 6)

have an association of EGs that are similar to those described in the section 'Study area'.

Interpretation and discussion

Environmental evolution versus faunal preservation

Large and diversified foraminifera assemblages have been described all along the core, whereas testate amoebae only occur in the upper section. The easiest explanation is an environmental change that caused a shift from a marine to a continental environment. This shift from foraminifera to testate amoebae is the same used by Lloyd (2000) for an Holocene environmental reconstruction. Moreover,

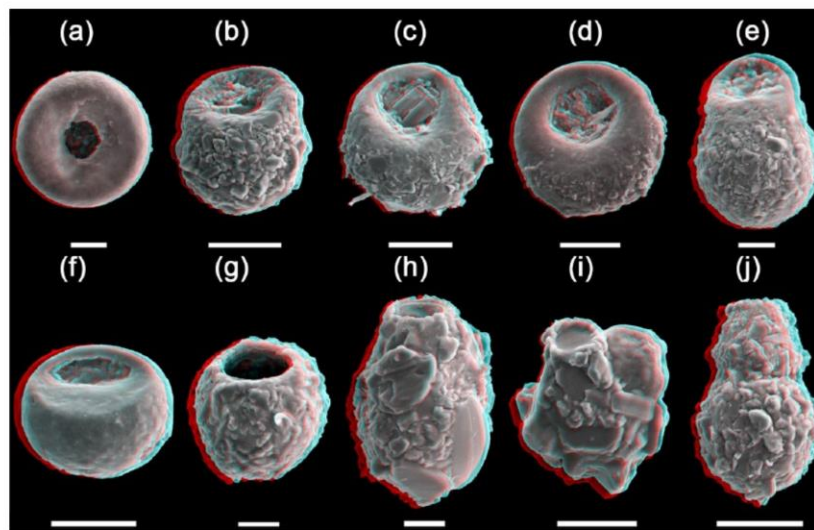


Figure 5. Anaglyphic (online coloured version only) SEM (scanning electron microscope) pictures showing testate amoebae diversity of Nantes Island. (a): *Cyclopyxis kahli* (20 μm); (b): *Centropyxis aerophila* (50 μm); (c): *Centropyxis aculeata* (50 μm); (d): *Centropyxis ecornis* (50 μm); (e): *Centropyxis lobostoma* (20 μm); (f): *Plagiopyxis declivis* (50 μm); (g): *Diffflugia globulosa* (20 μm); (h): *Diffflugia cf. tenuis* (20 μm); (i): *Diffflugia sp.* (50 μm); and (j): *Pontigulasia sp.* (50 μm).

Gehrels et al. (2001) observed that the vertical range of testate amoebae in salt marshes is small, attributed to a strong correlation with environmental changes. Duleba and Debenay (2003) specified, not surprisingly, that salinity was the main stress factor, which introduced the shift between foraminifera and testate amoebae. Nevertheless, the poor preservation of testate amoebae in the deepest sections could be also envisaged. In our study, the largely dominant genera *Diffflugia* and *Centropyxis* (dominant as well in Lloyd's (2000) study, and associated with two other agglutinated genus, *Phryganella* and *Pontigulasia*) are constituted of agglutinated shells, composed of minerals from the surroundings and cemented by an organic lining. Thanks to this strong structure (Armynot du Châtelet et al., 2013; Ogdén and Hedley, 1980), they have a good chance of being preserved. In contrast, the *Arcella* and *Euglypha* genera, which are far less abundant, may be dissolved (Mitchell et al., 2008; Ooms et al., 2011; Swindles and Roe, 2007) or degraded because of sediment dehydration (Roe et al., 2002). As a consequence, they would not be well preserved in a fluvial environment such as the Loire estuary. A large diversity of a testate amoebae shell type could only be correctly preserved in a calm environment such as a lake (Wall et al., 2010). As a consequence, both environmental evolution and faunal preservation are responsible for testate amoebae changes throughout the core. The most robust testate amoebae shells (agglutinating forms) would be the only ones adapted for past environmental reconstruction in such a dynamic environment.

Agglutinated and calcareous foraminifera could also be prone to dissolution (Boltovskoy and Wright, 1976) and mechanical deterioration in coarse sediment (Armynot du Châtelet et al., 2009). In the present study, foraminifera are observed in all of the sections. Only the coarse sediment grains sections have logically lower densities. Within the other sections, the foraminifera are well preserved with a great diversity and density that makes them of high value for environmental reconstruction purposes.

Evolution of environment – OM and sediment size constraints

In a study of surface sediments from Skagerrak and Kattegat (Scandinavia), Alve and Murray (1999) showed that there is no obvious relationship between sediment grain size, organic content

and the composition of foraminifera assemblages. In contrast, Armynot du Châtelet et al. (2009) in the Canche estuary (English Channel, Northern France) evidenced that both sediment grain size and total organic content appear to be limiting factors. In the present study, critical thresholds such as those defined by Murray (2001) are often reached all along the core. For example, both density and diversity are very low along the sections with the coarsest sediments (F_1 and F_3). These sections reflect high-energy environments that may inhibit OM sedimentation and favour the washing of bacteria biofilms or algal mats. Such environmental conditions prevent foraminifera from feeding, settling and developing in accordance with the strategy described by Murray (1986) and Schönfeld (2002).

All along the section (F_2), the clayey, silty and sandy layers rapidly alternate. Diversity and density (and the number of EGs) are high in this section. As a consequence, such tidal sediment layers do not limit the development of foraminifera and testate amoebae.

The second limiting factor may be the OM content and its quality, as depicted by the TOC proportion and the C/N ratio. Fresh OM from microalgae, which are protein-rich and cellulose-poor, has atomic C/N values that are commonly between 4 and 10, whereas vascular land plants, which are protein-poor and cellulose-rich, create OM that usually has C/N ratios of 20 and greater (Meyers, 1994). The proportions of OM that originate from these two general sources can consequently be distinguished by their C/N ratios. The average C/N value of the OM present in the core is intermediate between the two end-members (4.28 and 17.33), and therefore indicates a mixed contribution from algae and higher plants. Within the intermediate section, the C/N values indicate that OM derived as well from algae and higher plants. Through the interpretation of this proxy, pulses of continentalization or return of marine conditions alternatively could be evidenced. Nevertheless, the occurrence of N-rich layers between 6500 and 1650 yr BP may reflect as well early agriculture activities, as it has been observed through pollen evidence in close areas (Visset et al., 2001, 2002) and in Europe (Jalut, 1995; Lopez-Garcia and Lopez-Saez, 2000; Puertas, 1997; Richard, 1994). Finally, in the upper part of the core, the C/N values are low and may reflect algae influence. However, as these sediments

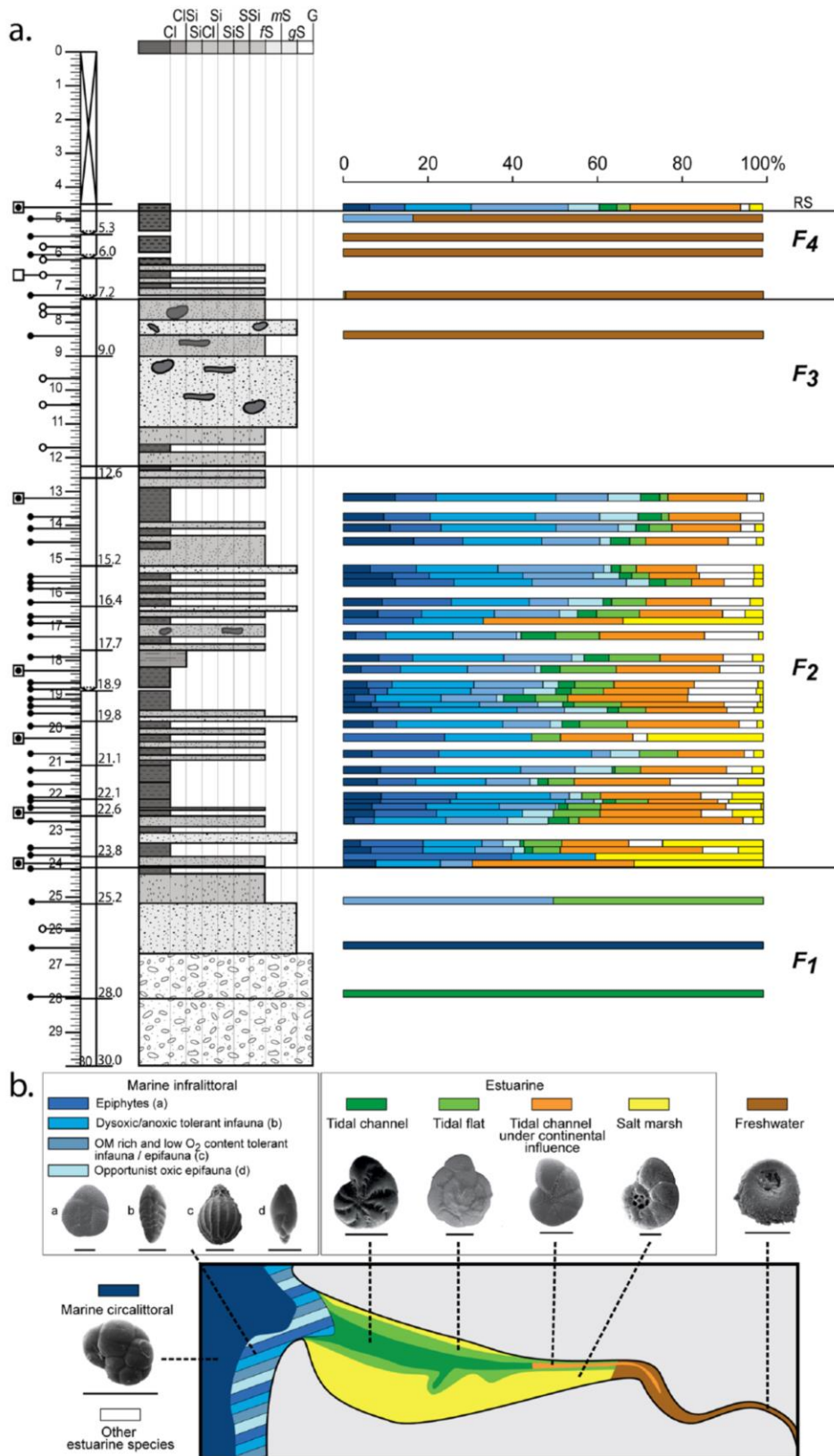


Figure 6. Diagram of the evolution of the microfauna composition (a) subdivided into ecological groups from freshwater to marine cirralittoral and (b) their geographical distribution within an estuary. Most of the key species are illustrated (see text legend of Figures 3–5). Scale bar of the SEM pictures = 100 μ m.

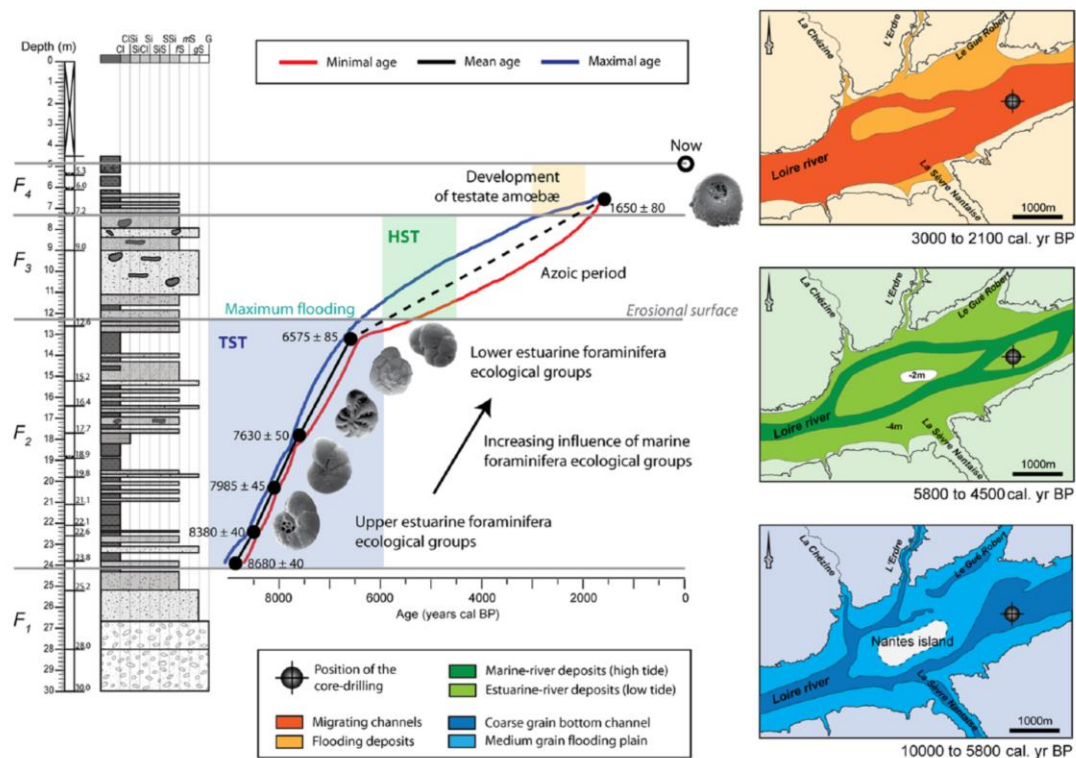


Figure 7. Diagram of the Nantes Island infilling evolution with age–depth model, microfauna evolution, and reconstructed maps of Nantes Island zone (modified after Arthuis and Nauleau, 2008). HST: Highstand System Tract, TST: Transgressive System Tract.

are the most recent, an increase of agriculture influence cannot be excluded and the use of N-rich fertilizers may be responsible for the decrease in the C/N ratio observed. As a conclusion, C/N probably reflects episodes of continentalization throughout the core, with a specific anthropogenic influence in the most recent part of the record.

In the intermediate part of the core, the highest biological densities are associated with the highest C/N values. Even if the highest C/N cannot be considered as a direct causation of highest densities, and TOC and C/N may be responding to an independent environmental factor that also impacts microfossil assemblage, this observation concurs with the findings of a previous study in the Canche salt marshes (Armynot du Châtelet et al., 2009), which evidenced a gradient of density and diversity related to C/N. Low TOC proportions (<2%) and C/N <12 are associated with the lowest foraminifera density and the highest species richness. In contrast, when the TOC is high and the C/N is >12, the density is high and the species richness is medium. In the present study, intervals of both high biological densities and high C/N values correspond to an increase in the proportion of salt marsh and tidal marsh EGs. They are followed by a fall in C/N, a decrease of foraminiferal density and an increase of the marine EG.

The low diversity of foraminifera in Section F₄ is registered parallel to the occurrence of testate amoebae. This association suggests the transition from an estuarine to a freshwater environment under river influence.

In the uppermost sample, labelled RS, the similarity to the assemblages from the intermediate section (F₂) is indicative of reworked sediment. This occurred during the recent settlement of the city of Nantes by consolidating the island border with the sediment dredged from the main river channel.

Evolution of the environment – Clay mineralogy

Topographic variations in the watershed, changes in runoff intensity/weathering conditions, transport and the petrographic nature of the bedrocks can influence the clay assemblages. Some anthropological processes (e.g. farming) or climatic phenomena (storms, floods, deglaciations) may also modify the origin and transport patterns of the terrigenous clay fraction (Bout-Roumazeilles et al., 2013a, 2013b; Montero-Serrano et al., 2011). As a consequence, the variations in the clay mineral composition can be used to reconstruct temporal fluctuations of detrital clay mineral supplies.

The clay mineral distribution is contrasted throughout the watershed area because of rather different petrographic bedrocks. The northern part of the Loire River watershed drains Paleozoic formations, which are mainly composed of micaschists. These deeply altered formations are typically enriched in kaolinite that is associated with illite (Esteoule-Choux, 1967). Similarly, kaolinite is also derived from the alteration of Paleozoic granites and gneiss from the northeastern part of the watershed (Delfau and Le Berre, 1981). In contrast, the southern watershed, drained by the Sèvre Nantaise River, is composed of mid-Miocene and Pliocene sand and sandy marl. The clay fraction of these formations is dominated by a high concentration of smectite, which represents ca. 50% of the clay content, in association with illite and kaolinite in the Faluns formations, and up to 90% with 10% kaolinite in the red sand formation (Esteoule-Choux, 1967). This area is also characterized by local important content of vermiculite that is derived from the alteration of Paleozoic amphibolite and gabbros (Esteoule-Choux, 1967).

The lowest section (F₁) is enriched in illite and mixed-layers. This enrichment is explained by the physical alteration from the metamorphized bedrocks. The second section (F₂) is enriched in smectite associated with kaolinite and illite. This clay association

suggests an input from the mid-Miocene sediment deposits located in the southern part of the watershed and drained by the Sèvre Nantaise River. The third section (F_3) is characterized by a high content of illite associated with kaolinite and a low proportion of smectite. Such clay mineral associations would at first glance indicate an origin from the northern part of the watershed. Nevertheless, the relatively high content of illite compared with kaolinite may also suggest that sediments are reworked. This is in accordance with the formerly described coarse sediments. The upper section (F_4) is composed of kaolinite and illite associated with lower proportions of vermiculite and smectite. This assemblage suggests a mixed origin of clay-size particles from both the northern and southern parts of the watershed.

Reconstruction of the Loire environment along the Holocene

The age–depth model (Figure 7) was calculated between depths of 24 and 4.97 m. The sediment deposit ranges from 8850 to 10 cal. yr BP.

The earliest sediment deposits (Section F_1) are constituted of coarse particles associated with illite and chlorite clay minerals. These sediments are probably produced by soil erosion and the reworking of the metamorphized Paleozoic bedrock, triggered by high hydrodynamics. As many Atlantic estuaries, this rocky substrate bedrock corresponds to the Holocene basement described by Proust et al. (2010) close to Saint-Nazaire (50 km downstream). Moreover, the scarcity and the great variability of foraminifera EGs observed during this period testify to the high hydrodynamics and are of a dominant marine influence. These sediments probably correspond to reworked fluvial sediments deposited during the period of low sea level along the Pleistocene glacial stage (Lowstand Systems Tract, LST; Posamentier and Allen, 1999). These earliest deposits (Section F_1) probably correspond to the early Holocene (defined by Walker et al., 2012), prior to 8850 cal. yr BP.

The second section (F_2) extends from 8850 (24.2 m) to 5850 cal. yr BP (12.2 m). The sediment deposits are typical of an estuary, and are composed of an alternation of clay and fine sand layers, with high foraminiferal density and diversity (Figure 5). The clay fraction is enriched in smectite, which could have two origins: an increase of the runoff of the Sèvre Nantaise River; and/or increased marine influence, as continentally derived smectite would easily flocculate with an increase in water salinity. These deposits are characteristic of a tidal regime, with a regular deposit of fine particles in which estuarine foraminifera EGs could develop. Marine fauna EGs also regularly occurred, depending on the speed of the infilling. By the same way Llyod (2000), in an isolated basin in Scotland (UK), observed high diversity from 9100 to 6700 BP. Variations of diversity were, however, less marked than those observed in Loire estuary. The C/N, always of intermediate value during that period, confirm these typical estuarine conditions. This section, deposited during the mid Holocene, is characterized by a TST deposit under a tidal dynamic. This period is marked by the transgression associated with the increase in the available space for the sediment infilling. These observations corroborate the study of Perez-Belmonte (2008) that described an oceanic invasion of the Golfe du Morbihan (65 km from the Loire estuary) that occurred from 9000 to 5000 cal. yr BP during the end of the Flandrian transgression, conducting the establishment of the TST. These observations also corroborate the large consensus after studies of Ters (1986) that defined TST from 11.7 to 6 years BP along the French Atlantic coasts. The TST is controlled by glacio-eustatism (Posamentier and Allen, 1999). The end of the TST is marked by the Maximum Flooding Surface (MFS).

The third section (F_3) is characterized by sandy deposits of continental origin subjected to erosion, which make an incision

in the former TST, and corresponds to an HST. Indeed, from 5850 to 2100 cal. yr BP, the sediment clay fraction is composed of high levels of illite. This may be interpreted as reflecting a high erosion regime or intense reworking, due to the decrease in the speed of the sea level rise, which is inferior to the sedimentation rate. This section is almost azoic, which fits with the notion of high hydrodynamics. The migration of the channel implies a lack of the deposit that could occur all along this period, from 11.2 m (5100 cal. yr BP) to 7.5 m (2350 cal. yr BP). This erosive period extends during the mid to late Holocene. By the same way, Perez-Belmonte (2008) in the Golfe du Morbihan observed that after ca. 5000 cal. BP, the established HST is subjected to frequent erosive episodes because of external and internal forcing. During that period, the coastline shifted towards the ocean (Posamentier and Allen, 1999). This shift is associated with a migration of the main sediment depositional zone, located on the shelf, off the estuaries that flow towards the Bay of Biscay (Poirier, 2010; Traini, 2009). This change implied change in the environmental conditions and forced the foraminiferal fauna to migrate or disappear, replaced by testate amoebae. These observations are the same for Llyod (2000) where diversity is low and fauna is dominated by brackish fauna. Controlling factors could be of (1) climatic origin (recurrence of storms; Chaumillon et al., 2010 and references therein), (2) the reduction of the available space after the transgression that thus limit the conservation of recently deposited sediments (Clavé et al., 2001), and (3) human activity as for example here testified by C/N results (Poirier, 2010).

The last section (F_4) extends from 2100 cal. yr BP (7.2 m depth) to the top of the analysed sediments. The sediments are composed of a succession of clayey and sandy layers. The combination of the development of testate amoebae, the absence of foraminifera, the decrease in illite and increase of smectite and kaolinite proportions support the hypothesis of a continentalization of the environment. The environment is under the strong influence of freshwater. In the small basin described by Llyod (2000), testate amoebae are occurring from 700 BP. In Loire estuary, testate amoebae are occurring earlier, probably because the study area is far more inland.

The samples labelled RS in Figures 2 and 7 have sediment and faunal characteristics that are similar to the sediment observed in Section F_2 . As a consequence, they probably correspond to reworked sediments dredged from the main channel and deposited as embankments.

Conclusion

The main stages of the Holocene Loire Valley evolution in Nantes are as follows:

- *Up to 8850 cal. yr BP.* A high water dynamic period due to an early Holocene transgression, the erosion of the metamorphic substratum, deposits of coarse particles, and rare transported microfaunal specimens. The sediments are structured in an LST.
- *From 8850 to 5850 cal. yr BP.* An estuarine dynamic period with abundant and diverse typical foraminifera species. The sediments show an alternation of clayey/sand deposits. The marine influence is increasing. The sediment deposit is structured in a TST.
- *From 5850 to 2100 cal. yr BP.* A fall in the sea level rise and the available space for sedimentation. There is migration of the channels and intense movement of the sediment. The sediments are structured in an HST. Fauna are rare in this highly dynamic context.
- *From 2100 cal. yr BP to the present.* Continentalization. Testate amoebae are settling in a freshwater environment.

Funding

This present work was financially supported by the European community (*Fonds européen de développement régional* (FEDER)), the Service Régional de l'Archéologie des Pays de la Loire, the Conseil Régional des Pays de la Loire, the Conseil Général de Loire Atlantique, Nantes city.

References

- Alve E and Murray JW (1999) Marginal marine environments of the Skagerrak and Kattegat: A baseline study of living (stained) benthic foraminiferal ecology. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 146: 171–193.
- Armynot du Châtelet E, Bout-Roumzeilles V, Riboulleau A et al. (2009) Sediment (grain size and clay mineralogy) and organic matter quality control on living benthic foraminifera. *Revue de micropaléontologie* 52: 75–84.
- Armynot du Châtelet E, Debenay J-P, Degré D et al. (2005) The use of benthic foraminifera as sea-level indicators? Case study of the Aiguillon cove [Utilisation des foraminifères benthiques comme indicateurs de paléo-niveaux marins? Étude du cas de l'anse de l'Aiguillon]. *Comptes Rendus Palevol* 4: 209–223.
- Armynot du Châtelet E, Guillot F, Recourt P et al. (2010) Influence of sediment grain size and mineralogy on testate amoebae test construction. *Comptes Rendus Geoscience* 342: 710–717.
- Armynot du Châtelet E, Noiriol C and Delaine M (2013) Three-dimensional morphological and mineralogical characterization of testate amoebae. *Microscopy and Microanalysis* 19: 1511–1522.
- Arthuis R and Nauleau J-F (2008) La Loire à Nantes: bilan sédimentaire, conséquences géomorphologiques et archéologiques. Préliminaires à l'étude du paysage. Rapport PCR "Des Ponts-de-Cé à l'Estuaire, interactions Homme/Milieu de la Loire et ses affluents", Tome II. Nantes: SRA-Inrap GO.
- Asioli A, Medioli FS and Patterson RT (1996) Thecamoebians as a tool for reconstruction of paleoenvironments in some Italian lakes in the Foothills of the southern Alps (Orta, Varese and Candia). *Journal of Foraminiferal Research* 26: 248–263.
- Bernhard JM (1986) Characteristic assemblages and morphologies of benthic foraminifera from anoxic, organic-rich deposits: Jurassic through Holocene. *Journal of Foraminiferal Research* 16: 207–215.
- Beyens L and Chardez D (1995) An annotated list of testate amoebae observed in the Arctic between the longitudes 27°E and 168°W. *Archiv für protistenkunde* 144: 137–142.
- Blaauw M and Christen JA (2011) Flexible paleoclimate age-depth models using an autoregressive gamma process. *Bayesian Analysis* 6: 457–474.
- Boltovskoy E and Wright R (1976) *Recent foraminifera*. The Hague: W. Junk.
- Booth RK, Jackson ST and Gray CED (2004) Paleoecology and high-resolution paleohydrology of a kettle peatland in upper Michigan. *Quaternary Research* 61: 1–13.
- Bout-Roumzeilles V, Combourieu-Nebout N, Desprat S et al. (2013a) Tracking atmospheric and riverine terrigenous supplies variability during the last glacial and the Holocene in central Mediterranean. *Climate of the Past* 9: 1065–1087.
- Bout-Roumzeilles V, Cortijo E, Labeurie L et al. (1999) Clay mineral evidence of nepheloid layer contribution to the Heinrich layers in the Northwest Atlantic. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 146: 211–228.
- Bout-Roumzeilles V, Riboulleau A, Armynot du Châtelet E et al. (2013b) Clay mineralogy of surface sediments as a tool for deciphering river contributions to the Cariaco Basin (Venezuela). *Journal of Geophysical Research – Oceans* 118: 750–761.
- Brady HB (1884) Report on the Foraminifera dredged by H.M.S. Challenger during the years 1873–1876. Scientific results of the voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873–1876. *Zoology* 9: 1–814.
- Brindley GW and Brown G (1980) *Crystal Structures of Clay Minerals and Their X-Ray Identification*. London: Mineralogical Society.
- Cash J and Hopkinson J (1905) *The British Freshwater Rhizopoda and Heliozoa*. London: Printed for the Ray Society.
- Charman DJ (2001) Biostratigraphic and palaeoenvironmental applications of testate amoebae. *Quaternary Science Reviews* 20: 1753–1764.
- Chaumillon E, Tessier B and Reynaud JY (2010) Stratigraphic records and variability of incised valleys and estuaries along French coasts. *Bulletin de la Société Géologique de France* 181: 75–85.
- Ciffroy P, Reyss J-L and Siclet F (2003b) Determination of the residence time of suspended particles in the turbidity maximum of the Loire estuary by ⁷Be analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57: 553–568.
- Cimerman F and Langer MR (1991) *Mediterranean Foraminifera*. Ljubljana: Slovenska akademija znanosti in umetnosti, 118 pp.
- Clarke KJ (2003) *Guide to the Identification of Soil Protozoa – Testate Amoebae*. Ambleside: Freshwater Biological Association (Special Publication 12), 40 pp.
- Clavé B, Massé L, Carbonel P et al. (2001) Holocene coastal changes and infilling of the La Perroche marsh (French Atlantic coast). *Oceanologica Acta* 24(4): 377–389.
- Corliss BH and Chen C (1988) Morphotype patterns of Norwegian Sea deep-sea benthic foraminifera and ecological implications. *Geology* 16: 716–719.
- Dalrymple RW (2006) Incised valleys in time and space: An introduction. In: Dalrymple RW, Leckie DA and Tillman RW (eds) *Incised valleys in time and space*. Tulsa, OK: SEPM Special Publication (Society for Sedimentary Geology), pp. 5–12.
- Dalrymple RW (2010) Tidal depositional systems. In: James NP and Dalrymple RW (eds) *Facies Models 4* (GEOtext 6). St John's: Geological Association of Canada, pp. 201–231.
- Delfau M and Le Berre P (1981) *Définition de zones favorables à la prospection du kaolin dans le massif armoricain*. Orléans: BRGM Orléans.
- Duleba W and Debenay J-P (2003) Hydrodynamic circulation in the estuaries of Estação Ecologica Jureia-Itatins, Brazil, inferred from foraminifera and thecamoebian assemblages. *Journal of Foraminiferal Research* 33: 62–93.
- Duleba W, Debenay J-P, Beck-Eichler B et al. (1999) Holocene environmental and water circulation changes: Foraminifer morphogroups evidence in Flamengo Bay (SP, Brazil). *Journal of Coastal Research* 15: 554–571.
- Edwards RJ and Horton BP (2000) Reconstructing relative sea-level change using UK salt-marsh foraminifera. *Marine Geology* 169: 41–56.
- Eichler PPB, Castelao GP, Pimenta FM et al. (2004) Foraminifera and thecamoebians as indicator of hydrodynamic process in a choked coastal lagoon, Laguna Estuarine System, SC, Brazil. *Journal of Coastal Research* 39: 1144–1148.
- Ellison RL (1995) Paleolimnological analysis of Ullswater using testate amoebae. *Journal of Paleolimnology* 13: 51–63.
- Esteoule-Choux J (1967) *Contribution à l'étude des argiles du massif armoricain. Argiles des alterations et argiles des bassins sédimentaires tertiaires*. Rennes: Université de Rennes.
- Etcheber H, Taillez A, Abril G et al. (2007) Particulate organic carbon in the estuarine turbidity maxima of the Gironde, Loire and Seine estuaries: Origin and lability. *Hydrobiologia* 588: 245–259.

- Gehrels WR, Roe HM and Charman DJ (2001) Foraminifera, testate amoebae and diatoms as sea-level indicators in UK saltmarshes: A quantitative multiproxy approach. *Journal of Quaternary Science* 16: 201–220.
- Goubert E, Neraudeau D, Rouchy JM et al. (2001) Foraminiferal record of environmental changes: Messinian of the Los Yesos area (Sorbas Basin, SE Spain). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 175: 61–78.
- Haynes JR (1981) *Foraminifera*. New York: John Wiley and Sons, 43 pp.
- Hayward BW, Scott GH, Grenfell HR et al. (2004) Estimation of tidal elevation and salinity histories of sheltered harbours and estuaries using benthic foraminifera. *The Holocene* 14: 218–232.
- Jalut G (1995) Analyse pollinique de sédiments holocènes de l'étang de Capestang (Hérault). In: Guilaine J (ed.) *Temps et espace dans le bassin de l'Aude du Néolithique à l'âge du Fer*. Toulouse: Centre d'Anthropologie, pp. 293–303.
- Jones RW and Charnock MA (1985) 'Morphogroups' of agglutinating foraminifera. Their life positions and feeding habits and potential applicability in (paleo)ecological studies. *Revue de Paléobiologie* 4: 311–320.
- Lee JJ and Anderson OR (1991) *Biology of foraminifera*. London; San Diego, CA; New York; Boston, MA; Sydney; Tokyo; Toronto: Academic Press.
- Lee JJ, Leedale GF and Bradbury P (2000) *An Illustrated Guide to the Protozoa*. Lawrence, KS: Allen Press Inc.
- Leidy J (1879) *Fresh-Water Rhizopods of North America*. Washington, DC: Government Printing Office.
- Leorri E, Gehrels WR, Horton BP et al. (2010) Distribution of foraminifera in salt marshes along the Atlantic coast of SW Europe: Tools to reconstruct past sea-level variations. *Quaternary International* 221: 104–115.
- Lloyd J (2000) Combined foraminiferal and thecamoebian environmental reconstruction from an isolation basin in NW Scotland: Implications for sea-level studies. *Journal of Foraminiferal Research* 30: 294–305.
- Lopez-Garcia P and Lopez-Saez JA (2000) Le paysage et la phase épipaléolithique-mésolithique dans les pré-Pyrénées aragnoises et le bassin moyen de l'Èbre à partir de l'analyse palynologique. In: *Les derniers chasseurs-cueilleurs d'Europe occidentale (13000–5500 av. J.-C.): Actes du colloque international de Besançon, 23–25 October 1998*. Besançon: Presses-Universitaires Franc-Comtoises, pp. 59–69.
- Magno MC, Bergamin L, Finioia MG et al. (2012) Correlation between textural characteristics of marine sediments and benthic foraminifera in highly anthropogenically-altered coastal areas. *Marine Geology* 315–318: 143–161.
- Medioli FS and Scott DB (1988) Lacustrine thecamoebians (mainly arcellaceans) as potential tools for palaeolimnological interpretations. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 62: 361–386.
- Menier D (2003) *Morphologie et remplissage des vallées sud-armoricaines: Apports de la stratigraphie sismique*. Lorient: Université de Bretagne Sud, 204 pp.
- Meyers PA (1994) Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter. *Chemical Geology* 114: 289–302.
- Mitchell EAD, Payne RJ and Lamentowicz M (2008) Potential implications of differential preservation of testate amoeba shells for paleoenvironmental reconstruction in peatlands. *Journal of Paleolimnology* 40: 603–618.
- Montero-Serrano J-C, Bout-Roumazeilles V, Carlson AE et al. (2011) Contrasting rainfall patterns over North America during the Holocene and Last Interglacial as recorded by sediments of the northern Gulf of Mexico. *Geophysical Research Letters* 38: L14709.
- Murray JW (1986) Living and dead Holocene foraminifera of Lyme Bay, Southern England. *Journal of Foraminiferal Research* 16: 347–352.
- Murray JW (2001) The niche of benthic foraminifera, critical thresholds and proxies. *Marine Micropaleontology* 41: 1–7.
- Murray JW (2006) *Ecology and Applications of Benthic Foraminifera*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Neville LA, McCarthy FMG and MacKinnon MD (2010) Seasonal environmental and chemical impact on thecamoebian community composition in an oil sands reclamation wetland in Northern Alberta. *Palaeontologia Electronica* 13: 13A (14 pp.).
- Nguyen-Viet H, Bernard N, Mitchell EAD et al. (2008) Effect of lead pollution on testate amoeba communities living in *Sphagnum fallax*: An experimental study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69: 130–138.
- Ogden CG and Hedley RH (1980) *An Atlas of Freshwater Testate Amoebae*. Oxford: Oxford University Press.
- Ooms M, Beyens L and Temmerman S (2011) Testate amoebae as estuarine water-level indicators: Modern distribution and the development of a transfer function from a freshwater tidal marsh (Scheldt estuary, Belgium). *Journal of Quaternary Science* 26: 819–828.
- Ottmann F, Alix Y, Limasset JC et al. (1968) Sur 'le lit ancien' de la Loire dans son cours inférieur. *Bulletin du BRGM* 1: 26–56.
- Perez-Belmonte L (2008) *Caractérisation environnementale, morphosédimentaire et stratigraphique du Golfe du Morbihan pendant l'Holocène terminal: Implications évolutives*. Lorient: Université de Bretagne Sud, 219 pp.
- Poirier C (2010) *Enregistrement couplé par la macrofaune et la microfaune des variations environnementales récentes en Baie de Marennes-Oléron*. La Rochelle: Université de la Rochelle, 213 pp.
- Posamentier H and Allen G (1999) *Siliciclastic Sequence Stratigraphy: Concepts and Applications* (SEPM Concepts in Sedimentology and Paleontology 7). Tulsa, OK: Society of Paleontologists and Mineralogists, 210 pp.
- Proust JN, Renault M, Guennoc P et al. (2010) Sedimentary architecture of the Loire River drowned valleys of the French Atlantic shelf. *Bulletin de la Société Géologique de France* 181: 129–149.
- Puertas O (1997) *Évolution de la végétation depuis le Dryas récent dans la plaine littorale de Montpellier (Hérault, France) à partir de l'analyse pollinique. Dynamique naturelle et anthropisation du milieu*. Thèse de Doctorat, Université de Franche-Comté, 337 pp.
- R-Development Core Team (2014) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <http://www.R-project.org>.
- Reimer PJ, Bard E, Bayliss A et al. (2013) IntCal13 and Marine13 radiocarbon age calibration curves 0–50000 years cal BP. *Radiocarbon* 55:1869–1887.
- Richard H (1994) Indices polliniques d'une néolithisation précoce sur le premier plateau du Jura (France). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, série II* 318: 993–999.
- Roe HM, Charman DJ and Gehrels WR (2002) Fossil testate amoebae in coastal deposits in the UK: Implications for studies of sea-level change. *Journal of Quaternary Science* 17: 411–429.
- Schönfeld J (2002) A new benthic foraminiferal proxy for near-bottom current velocities in the Gulf of Cadiz, northeastern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 49: 1853–1875.
- Scott DB, Medioli FS and Schafer CT (2001) *Monitoring in Coastal Environments using Foraminifera and Thecamoebian Indicators*. New York: Cambridge University Press.

- Sen Gupta BK (1999) Chapter 1: Introduction to modern Foraminifera. In: Sen Gupta BK (ed.) *Modern Foraminifera*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 371 pp.
- Severin KP (1983) Test morphology in benthic foraminifera as discriminator of biofacies. *Marine Micropaleontology* 8: 65–76.
- Sorrel P, Tessier B, Demory F et al. (2010) Sedimentary archives of the French Atlantic coast (inner Bay of Vilaine, south Brittany): Depositional history and late Holocene climatic and environmental signals. *Continental Shelf Research* 30: 1250–1266.
- Swindles GT and Roe HM (2007) Examining the dissolution characteristics of testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) in low pH conditions: Implications for peatland palaeoclimate studies. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 252: 486–496.
- Ters M (1986) Variations in Holocene sea level on the French Atlantic coast and their climatic significance. In: Rampino M, Sanders J, Newman W et al. (eds) *Climate: History, Periodicity and Predictability*. New York: Van Nostrand Reinhold, pp. 204–237.
- Ters M, Planchais N and Azema C (1968) L'évolution de la basse vallée de la Loire, à l'aval de Nantes, à la fin du Wurm et pendant la transgression flandrienne. *Bulletin de l'Association française pour l'étude du Quaternaire* 5: 217–246.
- Thinon I, Menier D, Guennoc P et al. (2008) *Carte géologique à 1/250 000 de la marge continentale, feuille Lorient* (ed JN Proust and P Guennoc). Orléans: BRGM, CNRS.
- Traini C (2009) *L'estuaire de la Vilaine: Évolution naturelle et anthropisation (Morbihan, France)*. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Sud.
- Traini C, Menier D, Proust JN et al. (2013) Transgressive systems tract of a ria-type estuary: The late Holocene Vilaine River drowned valley (France). *Marine Geology* 337: 140–155.
- Trentesaux A, Recourt P, Bout-Roumazielles V et al. (2001) Carbonate grain-size distribution in hemipelagic sediments from a laser particle sizer. *Journal of Sedimentary Research* 71: 858–862.
- Van Hengstum PJ, Reinhardt EG, Beddows PA et al. (2008) Thecamoebians (testate amoebae) and foraminifera from three anchialine cenotes in Mexico: Low salinity (1.5–4.5 psu) faunal transitions. *Journal of Foraminiferal Research* 38: 305–317.
- Vazquez Riveiros N, Babalola AO, Boudreau REA et al. (2007) Modern distribution of salt marsh foraminifera and thecamoebians in the Seymour-Belize Inlet Complex, British Columbia, Canada. *Marine Geology* 242: 39–63.
- Visset L, Cyprien AL, Carcaud N et al. (2002) The onset of diversified agriculture at the end of the Mesolithic period in the Val de Loire (Armorican Loire, France). *Comptes Rendus Pale* 11: 51–58.
- Visset L, Hauray G, Charrieau L et al. (2001) Paléo-environnement urbain: Histoire du comblement des vallées de la métro- pole nantaise, du Tardiglaciaire à la fin de l'Holocène. *Annales de Bretagne et des Pays de l'Ouest* 108(1): 147–165.
- Walker MJC, Berkelhammer M, Björck S et al. (2012) Formal subdivision of the Holocene Series/Epoch: A Discussion Paper by the Working Group of INTIMATE (Integration of ice-core, marine and terrestrial records) and the Subcommittee on Quaternary Stratigraphy (International Commission on Stratigraphy). *Journal of Quaternary Science* 27(7): 649–659.
- Wall AAJ, Gilbert D, Magny M et al. (2010) Testate amoeba analysis of lake sediments: Impact of filter size and total count on estimates of density, species richness and assemblage structure. *Journal of Paleolimnology* 43: 689–704.
- Zaitlin BA, Dalrymple RW and Boyd R (1994) The stratigraphic organization of incised-valley systems associated with sea-level change. In: Dalrymple RW, Boyd RJ and Zaitlin BA (eds) *Incised-Valley Systems: Origin and Sedimentary Sequences*. Tulsa: SEPM (Special Publication 51), pp. 45–60.



Original article

The mineral composition of the tests of ‘testate amoebae’ (Amoebozoa, Arcellinida): The relative importance of grain availability and grain selection

Composition minérale des tests de thécamoebiens (Amoebozoa, Arcellinida) : importance relative de la disponibilité et de la sélection des grains

Eric Armynot du Châtelet^{a,*}, Nadine Bernard^b, Maxence Delaine^{a,b},
Jean-Luc Potdevin^a, Daniel Gilbert^b

^a Université de Lille, UMR LOG 8187 CNRS, ULCO Laboratoire d’Océanologie et Géosciences, Bâtiment SN5, 59655 Villeneuve-d’Ascq, France

^b Laboratoire de Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Franche-Comté, La Bouloie, 25030 Besançon cedex, France

Abstract

Nine peatlands were selected according to their various geological setting in the eastern part of France. The diversity of mineral particles, including xenosomes (agglutinated particles) and idiosomes (secreted particles), were analysed, together with associated morphological characteristics, for 7 species of ‘testate amoeba’ (order Arcellinida). The combined use of an Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an EDS device and microprobe analyses is suitable for conducting an elemental analysis and subsequently enabled the determination of 24 different minerals. Such mineral diversity has never been recorded before. We conclude that the testate amoebae select grains according to their size from those available within their immediate environment. Availability in turn reflects the geological surroundings and the stability of the different kinds of grains, while their size seems to be a function of the distance from the source.
© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Sphagnum peatlands; Testate amoebae; Mineral composition; Size; Selection

Résumé

Neuf tourbières ont été sélectionnées en fonction de leur environnement géologique dans la zone Est de la France. La diversité des particules minérales, incluant les xénosomes (particules agglutinées) et les idiosomes (particules sécrétées), et la morphologie associée ont été analysées pour 11 espèces de thécamoebiens (ordre des Arcellinida). L’utilisation combinée d’un microscope électronique à balayage équipé d’une sonde EDS et de microanalyses est adaptée pour déterminer la composition élémentaire de 24 minéraux différents. Une telle diversité minérale n’a jamais été détectée au préalable. Il est établi que les grains sont sélectionnés en fonction de leur taille, de leur disponibilité et de leur stabilité dans l’environnement. Les particules reflètent l’environnement géologique et leur taille semble être fonction de la distance à la source.
© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Tourbières à sphaignes ; Thécamoebiens ; Composition minérale ; Taille ; Sélection

1. Introduction

Arcellinids [testate amoebae that belong to the Amoebozoa (Adl et al., 2012)] are ubiquitous protists living in various

environments like peatlands, rivers, lakes or brackish-water settings (Scott et al., 2001). Peatlands are depositional basins for the long-range transport of a wide range of mineral particles transported by wind (Bao et al., 2012). Compared to other organisms, testate amoebae have a high species diversity, they are widely distributed and react quickly to environmental changes. However, not all environmental parameters that govern species distribution are yet fully understood. Many

* Corresponding author.

E-mail address: eric.armynot@univ-lille1.fr (E. Armynot du Châtelet).

factors control the abundance and assemblage composition of testate amoeba, including nutrition, dissolved oxygen conditions, pH, salinity, substrate, temperature, or subaerial exposure (Scott et al., 2001). Among them, one largely unexplored factor concerns the characteristics of the grains (size and mineralogical composition) used to construct the tests of testate amoebae.

Based on their chemical composition testate amoebae are classified into four shell types (Mitchell et al., 2008): one first group comprising proteinaceous shells; a second group with shells composed of secreted plates (idiosomes) of biosilica (Aoki et al., 2007) or, sometimes of calcium carbonate (Yamaoka and Mizuhira, 1987); a third group with idiosomes with thick organic coating; and a fourth group with shells built from recycled organic or mineral particles (xenosomes).

In the case of xenosome-bearing tests, the specimens have the ability to select grains of different shapes and sizes to form their three dimensional tests. As a consequence, the nature of the agglutinated tests may depend on their sedimentological environment (Armynot du Châtelet et al., 2010). The Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) device (ESEM-EDS) technique has previously been demonstrated to be efficient for analyzing the grains of two specimens of the testate amoeba species *Diffugia oblonga* (Armynot du Châtelet et al., 2013b).

The objectives of the present study are as follows:

- to apply the known ESEM-EDS techniques to other species with different shell characteristics and composition and then define the mineral diversity within the test, including agglutinated foreign particles (xenosomes) and secreted particles (idiosomes);
- to evaluate the size and shape of those minerals. For the different types of particle (idiosomes and/or xenosomes), these data allow us to explore the influence of the available minerals on the test construction [the volume and length of the test, as well as the size of the pseudostome (aperture)];
- to use these data in an attempt to estimate the influence of the geological settings and the distance from the source for the minerals agglutinated in the test;
- to use these data to explore different hypotheses for explaining the process of grain selection by the different species and to propose a framework for further studies.

2. Material and methods

2.1. Study area and sampling

Nine peatlands were selected in eastern France (Fig. 1 and Table 1). These areas are located at least at 18 km away from

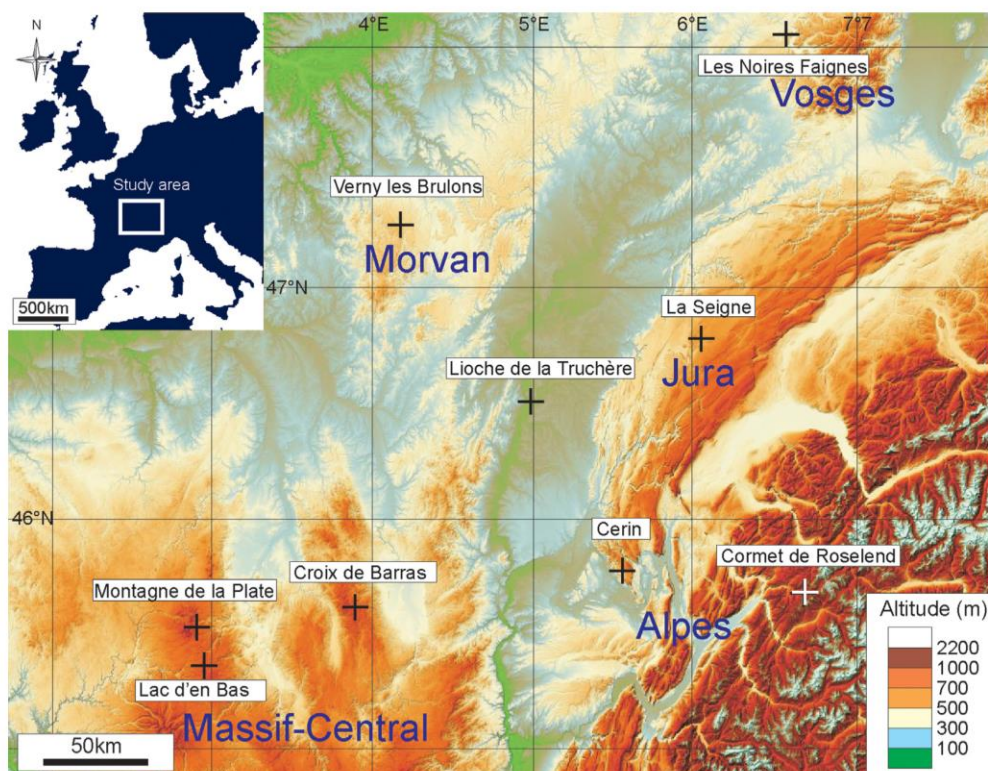


Fig. 1. Localization of the peatlands within French mountains.

The topographic base map is extracted from <http://www.geoportail.fr>.

Table 1
Location of the sampling peat bogs, altitude (m), trophic conditions.

Name of the peat bog	Latitude	Longitude	Altitude	Trophic conditions	Name and number of each specimen
Cerin	45.7770	5.5624	770	Ombrotrophic & Minerotrophic	<i>Trigonopyxis arcua</i>
Cornet de Roselend	45.6948	6.6879	2035	Ombrotrophic & Minerotrophic	<i>Centropyxis aerophila</i>
Croix de Barras	45.6203	3.8574	1360	Ombrotrophic	<i>Bullinularia indica</i>
La Seigne	46.8136	6.0546	840	Ombrotrophic	<i>Cyclopyxis euristoma</i>
Lac d'en Bas	45.3814	2.9238	1210	Ombrotrophic & Minerotrophic	<i>Centropyxis aerophila</i> var. <i>sphagnicola</i> / <i>Heleopera rosea</i>
Les Noires Faignes	48.0881	6.5421	380	Minerotrophic	<i>Nebela collaris</i>
Lioche la Truchère	46.5257	4.9709	200	Minerotrophic	<i>Nebela collaris</i>
Montagne de la Plate	45.5332	2.8601	1500	Ombrotrophic	<i>Trigonopyxis arcua</i>
Verny-des-Brûlons	47.3187	4.1239	560	Ombrotrophic & Minerotrophic	<i>Physochila griseola</i> (×2)

any anthropogenically-disturbed system that might complicate the natural development of the studied material. These peatlands were also selected within different geological settings in order to investigate as wide a range of particles as possible.

Samples were collected from the living top segment (0–3 cm) of the *Sphagnum capillifolium* peat. The sampling occurred at the end of the growth period between September 27th and October 1st, 2010. In the laboratory, the wet *S. capillifolium* clumps were squeezed by hand in order to release water containing testate amoebae. The testate amoebae were collected using a paintbrush. The specimens were determined using Ogden and Hedley (1980) and Clarke (2003).

2.2. Mineralogy of the agglutinated grains

A total of 11 specimens belonging to 8 species were isolated (1–2 per site) (Table 1). The number of specimens was limited by the time-consuming elemental analyses needed to study the mineralogical diversity of each specimen. The chemical determination of the minerals (idiosomes and xenosomes) was carried out by analysing the elemental composition of a point on the test using an Environmental Scanning Electron Microscope (FEI Quanta 200) equipped with an EDS device (ESEM-EDS), an electron probe micro-analyzer (EPMA CAMECA SX100), and Raman microspectrometry (LabRam HR 800 UV).

With ESEM-EDS, it is possible to work on natural rough surfaces when polishing is not possible and where 3D observation is necessary for species and grain characteristic (size and shape) identification. The testate amoebae were simply positioned on stubs and carbon-coated, and the tests were first imaged by using secondary electrons for the general shape. They were then imaged for elemental mapping (Si, Al, Na, Mg, Mn, K, Ca, Ti, Fe, P and S) under low-vacuum conditions using a 20 kV beam. Chemically coded color imaging helped with separating the grains according to their chemical compositions, while conventional backscattered electron (BSE)-imaging helped in localizing heavy-element-rich grains because of their stronger backscattering efficiency. The mineral species were determined after 31-point elemental analyses.

Forty other precise point elemental measurements were carried out on the same 11 specimens using an EPMA (CAMECA SX100) equipped with four wavelength dispersive

spectrometers (WDS). X-ray profiles and quantification were obtained at 15 kV and 20 nA.

As a first step, the use of the two techniques (EPMA and ESEM-EDS) allows the possible mineral species for a grain to be suggested according to its elemental composition. The second step involves computing the structural formula of this mineral species using the elemental composition of the grain. The comparison between the computed structural formula and the theoretical composition of the mineral species allows us to estimate the accuracy of our mineralogical identifications (Deer et al., 1992). The accuracy of these identifications is important for recognizing the potential sources of grains from the surroundings.

Raman microspectrometry is a good and complementary technique for specifying the nature of the minerals and, for example, distinguishing between common natural polymorphs like calcite or aragonite that would have the same EDS chemical composition. The Raman microspectrometer used has a laser of 532 nm.

2.3. Geometric characteristics of the grains and biovolume estimation

To characterize the grains, we used:

- the area: this corresponds to the visible surface of the grains. The precision of the ESEM does not allow area measurements $< 1 \mu\text{m}^2$;
- the circularity [calculated after Eq. (1)]: a circularity of 1 indicates a perfect circle; as the value approaches 0, it indicates an increasingly elongated shape;

$$\text{Circularity} = \frac{4 \times \pi \times \text{Area}}{\text{Perimeter}^2} \quad (1)$$

- the Feret's diameter: this is the longest distance between any two points along the selected boundary. It is preferred over the mean diameter calculated according to the area. This is because the particle surfaces are not perfect simple geometrical volumes (squares, spheres. . .) and the Feret's diameter better takes into account the more elongated shapes.

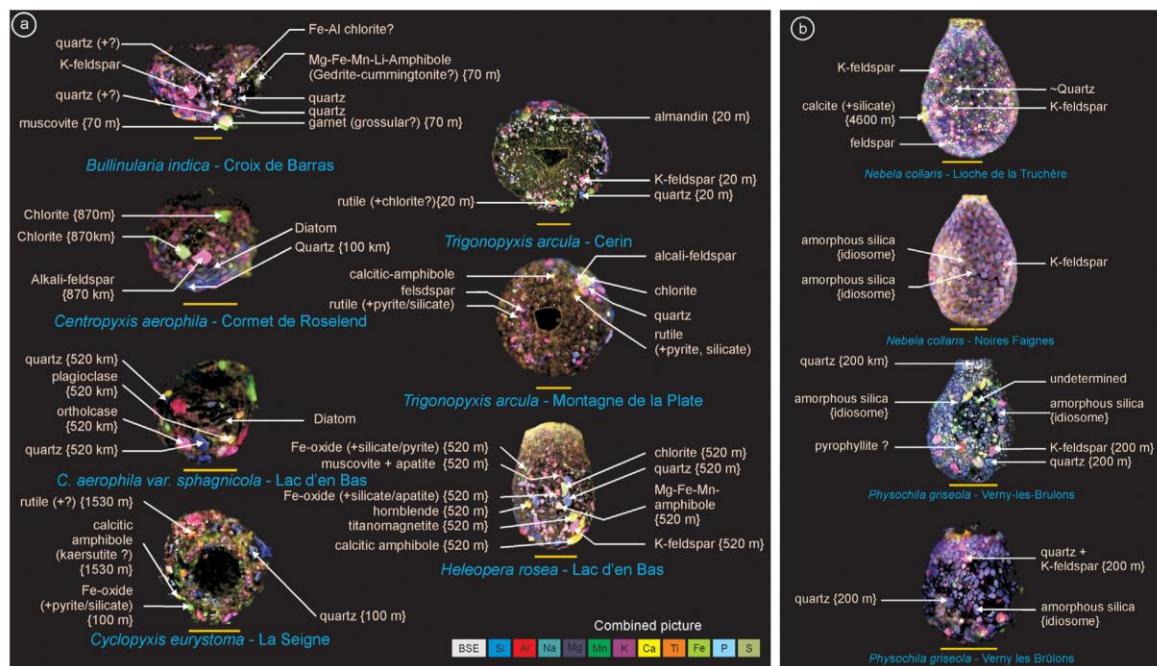


Fig. 2. Mineral diversity as observed in the 11 selected specimens mapped with Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an Energy Dispersive Spectroscopy device (ESEM-EDS) technique. Back Scattered Electron image is superimposed to ESEM-EDS image treatment for mineral determination. Mineral species are identified from the grain elemental analyses and their computations as structural formula. Combined picture is a superimposition of the map of the detected element (Si, Al, Na, Mg, Mn, K, Ca, Ti, Fe, P and S). Scale bar is 30 μ m. The minimal distance to the source is indicated between brackets. When no distance is specified, the origin of the mineral is from the vicinity of the peatlands: a: specimens agglutinating only xenosomes; b: specimens agglutinating both xenosomes and idiosomes.

The proportion of each determined mineral per specimen was assessed using the association of the ESEM-EDS mapping and image analysis on the BSE images. This technique could only be used on surfaces that are as flat as possible [see Armynot du Châtelet et al. (2013a) for extensive use of the technique on foraminifera]. This surface is unfortunately often reduced in size as the testate amoebae are not flat and the geometry may introduce some bias to the metric data of the grains. A second consequence was that only the elemental composition, and not the geometric characteristics, could be determined for minerals located too close to the boundary.

The biovolumes of the 11 specimens were estimated after measurements were obtained from SEM images taken from different angles around the specimens. The shapes of specimens were approximated to geometrically simple objects such as spheres, ellipsoids and tori.

2.4. Sources of minerals

The distances from the source of the observed minerals were estimated from the geological settings reported in the different geological maps and associated publications [Montagne de la Plate: (Brousse et al., 1990a,b); Verry-les-Brûlons: (Caillère and Lorenz, 1973); Cormet de Roselend: (Antoine et al., 1992, 1993); Cerin: (Bernier, 1985; Bernier et al., 1994; Kerrien et al., 1990); Lioche de la Truchère: (Jauzein et al., 1972), La Seigne:

(Coutterand, 2010; Falsan and Chantre, 1879; Goguel and Caire, 1967), Croix de Barras: (Etlicher, 1986; Hottin et al., 1998a,b), Noires Faignes: (Durand et al., 1988; Vincent et al., 1989), Lac d'en Bas: (Lapadu-Hargues, 1964)]. The geological background is described in supplementary material, table* S1.

2.5. Software used

The ESEM images were treated using the Image-J v1.43u software (available as freeware from <http://rsb.info.nih.gov/ij>) to extract the size characteristics of the agglutinated grains. All of the statistical analyses were carried out using the integrated suite of the R software and the *base* package.

3. Results

3.1. Diversity of mineral species

As the specimens and the constituent grains were covered by an organic layer, and as the specimens have a rounded shape and are not flat enough, the results of the elemental analyses have different degrees of precision. Unlike previous successful applications of Raman microspectrometry on another protist group, foraminifera (Armynot du Châtelet et al., 2013a), its application on testate amoebae was unsuccessful as the organic cover (and the specimen) burned under the laser beam.

Table 2

Mineral analyses with microprobe and ESEM-EDS techniques. The results are given in terms of the weight percentages of the different oxides. The species on which the minerals are analyzed are provided. The degree of certainty for the mineral determination is given: very good confidence (bold), good confidence (normal), poor confidence (italics).

Peat bog	Analysis technique	Species	Mineral	Al ₂ O ₃	CaO	FeO	K ₂ O	MgO	MnO	Na ₂ O	P ₂ O ₄	SiO ₂	SO ₂	TiO ₂	Total oxides weight
Cerin	Microprobe	<i>Trigonopyxis arcuata</i>	K-feldspar	20.46	0.84	1.45	9.06	1.40	0.05	0.38	–	41.86	–	0.33	75.93
Cerin	Microprobe	<i>Trigonopyxis arcuata</i>	Quartz	0.87	0.41	0.29	0.08	0.06	0.00	0.16	–	90.68	–	0.12	92.70
Cerin	Microprobe	<i>Trigonopyxis arcuata</i>	Rutile (+ chlorite)	3.67	0.58	1.17	0.63	0.51	–0.03	0.24	–	7.59	–	73.61	88.05
Cerin	Microprobe	<i>Trigonopyxis arcuata</i>	Garnet (<i>Almandin</i>)	16.68	1.21	33.60	0.72	0.66	0.03	0.69	–	28.29	–	0.16	82.49
Cerin	ESEM-EDS	<i>Trigonopyxis arcuata</i>	K-feldspar	32.10	2.78	2.12	10.68	1.94	0.00	1.66	0.00	48.46	0.00	0.00	99.74
Cerin	ESEM-EDS	<i>Trigonopyxis arcuata</i>	Quartz	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	99.97	0.00	0.00	99.97
Cerin	ESEM-EDS	<i>Trigonopyxis arcuata</i>	Rutile	3.80	0.48	0.00	0.60	0.50	0.00	0.00	0.00	6.60	0.00	88.02	99.98
Cornet de Rosselend	ESEM-EDS	<i>Centropxyxis aerophila</i>	Chlorite	21.72	2.43	30.68	1.92	9.06	0.00	1.94	0.00	27.35	1.23	0.00	96.33
Cornet de Rosselend	ESEM-EDS	<i>Centropxyxis aerophila</i>	Alcali-feldspar	31.34	4.27	3.35	14.31	1.26	1.68	1.19	0.00	42.20	0.00	0.00	99.61
Cornet de Rosselend	ESEM-EDS	<i>Centropxyxis aerophila</i>	Chlorite	26.96	1.82	18.37	0.77	19.23	0.00	2.08	0.00	28.72	0.00	0.00	97.94
Cornet de Rosselend	ESEM-EDS	<i>Centropxyxis aerophila</i>	Quartz	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.02	0.00	96.95	0.00	0.00	99.97
Croix de Barras	Microprobe	<i>Bullinularia indica</i>	Muscovite	19.24	0.76	2.71	6.39	1.18	0.05	0.28	–	28.27	–	0.25	59.17
Croix de Barras	Microprobe	<i>Bullinularia indica</i>	Dirty quartz	6.25	1.78	0.90	0.35	0.29	0.05	0.51	–	40.00	–	0.40	50.67
Croix de Barras	Microprobe	<i>Bullinularia indica</i>	Dirty quartz	5.39	0.28	2.21	1.96	0.53	–0.01	0.20	–	67.02	–	0.13	77.76
Croix de Barras	Microprobe	<i>Bullinularia indica</i>	Quartz	0.51	1.20	0.39	0.12	0.04	0.00	0.22	–	36.12	–	0.02	38.64
Croix de Barras	Microprobe	<i>Bullinularia indica</i>	K-feldspar	29.66	0.04	4.32	9.68	2.31	–0.01	0.18	–	55.45	–	0.17	101.85
Croix de Barras	Microprobe	<i>Bullinularia indica</i>	Fe-Al-chlorite	30.25	0.95	18.58	0.81	0.46	0.02	4.88	–	20.44	–	0.15	77.24
Croix de Barras	Microprobe	<i>Bullinularia indica</i>	Amphibole (<i>Gedrite-Cummingtonite</i>)	26.27	1.09	6.90	2.77	2.05	0.01	0.49	–	47.51	–	2.04	89.19
Croix de Barras	ESEM-EDS	<i>Bullinularia indica</i>	Garnet	5.83	22.34	14.18	0.00	1.26	0.00	0.00	0.00	49.65	0.00	5.15	98.41
Croix de Barras	ESEM-EDS	<i>Bullinularia indica</i>	Quartz	1.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	98.12	0.00	0.00	99.97
La Seigne	ESEM-EDS	<i>Cyclopyxis euristoma</i>	Quartz	4.36	0.96	2.20	1.48	1.21	0.00	0.00	0.00	89.52	0.00	0.00	99.73
La Seigne	ESEM-EDS	<i>Cyclopyxis euristoma</i>	Dirty Rutile	8.34	1.49	1.51	2.67	0.81	0.00	0.70	0.00	16.80	0.60	66.78	99.70
La Seigne	ESEM-EDS	<i>Cyclopyxis euristoma</i>	Amphibole (<i>Kaersutite</i>)	14.00	22.68	9.26	1.22	7.42	0.00	0.39	0.00	39.26	0.00	4.72	98.95
La Seigne	ESEM-EDS	<i>Cyclopyxis euristoma</i>	Fe-oxide	18.59	2.82	41.21	2.32	2.87	0.00	2.39	1.12	22.19	1.59	0.00	95.09
Lac d'en Bas	Microprobe	<i>Centropxyxis aerophila</i> var. <i>sphagnicola</i>	Quartz	0.26	1.44	0.34	0.06	0.05	0.00	0.03	–	85.40	–	0.08	87.73
Lac d'en Bas	Microprobe	<i>Centropxyxis aerophila</i> var. <i>sphagnicola</i>	Orthoclase	2.33	0.62	0.15	8.96	0.03	0.00	0.12	–	60.05	–	0.00	72.35
Lac d'en Bas	Microprobe	<i>Heleopera rosea</i>	Chlorite	16.60	0.47	18.83	0.82	10.19	0.17	0.09	–	23.92	–	0.04	72.09
Lac d'en Bas	Microprobe	<i>Heleopera rosea</i>	Spinel (Titanomagnetite)	2.00	0.06	58.57	0.04	3.62	0.89	–0.02	–	2.03	–	18.41	85.66

Table 2 (Continued)

Peat bog	Analysis technique	Species	Mineral	Al ₂ O ₃	CaO	FeO	K ₂ O	MgO	MnO	Na ₂ O	P ₂ O ₄	SiO ₂	SO ₂	TiO ₂	Total oxides weight
Lac d'en Bas	Microprobe	<i>Heleopera rosea</i>	Amphibole (M-Fe-Mn-Li Amphibole)	20.99	0.37	11.08	2.25	3.12	0.07	0.19	–	48.41	–	1.38	88.80
Lac d'en Bas	Microprobe	<i>Heleopera rosea</i>	Amphibole (Hornblende)	9.44	19.73	6.16	0.12	9.08	0.08	0.63	–	39.13	–	3.12	87.83
Lac d'en Bas	ESEM-EDS	<i>Centropxyxis aerophila</i> var. <i>sphagnicola</i>	Plagioclase (Oligoclase)	22.00	5.96	2.68	1.71	0.57	0.00	9.07	0.00	57.37	0.28	0.00	99.62
Lac d'en Bas	ESEM-EDS	<i>Centropxyxis aerophila</i> var. <i>sphagnicola</i>	Quartz	3.65	4.40	1.94	1.98	0.00	0.00	0.64	0.00	86.86	0.00	0.28	99.76
Lac d'en Bas	ESEM-EDS	<i>Heleopera rosea</i>	Amphibole (Kaesultite)	7.86	25.91	7.77	0.00	7.94	0.00	0.14	0.00	44.62	0.00	4.87	99.12
Lac d'en Bas	ESEM-EDS	<i>Heleopera rosea</i>	K-feldspar	19.19	1.05	0.41	18.72	0.00	0.00	0.11	0.00	60.47	0.00	0.00	99.93
Lac d'en Bas	ESEM-EDS	<i>Heleopera rosea</i>	Quartz	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	99.97	0.00	0.00	99.97
Lac d'en Bas	ESEM-EDS	<i>Heleopera rosea</i>	Fe oxyde (+ silicate/apatite)	5.92	0.58	26.51	0.60	1.35	2.53	1.67	2.00	14.59	0.00	41.29	97.04
Lac d'en Bas	ESEM-EDS	<i>Heleopera rosea</i>	Muscovite + apatite	35.57	1.02	1.57	9.65	2.30	0.00	1.62	2.29	45.79	0.00	0.00	99.80
Lac d'en Bas	ESEM-EDS	<i>Heleopera rosea</i>	Fe-oxyde (+ silicate/pyrite)	6.44	1.08	62.77	0.65	4.93	0.00	4.40	2.78	9.97	0.00	0.00	93.02
Les Noires Faignes	Microprobe	<i>Nebela collaris</i>	Quartz	0.20	1.73	0.27	0.21	0.08	–0.01	0.46	–	41.23	–	0.03	44.36
Les Noires Faignes	Microprobe	<i>Nebela collaris</i>	Quartz	0.16	1.91	0.35	0.15	0.10	0.01	0.53	–	25.04	–	0.03	28.42
Les Noires Faignes	ESEM-EDS	<i>Nebela collaris</i>	K-feldspar	16.15	1.78	1.57	6.73	0.44	0.00	1.26	0.00	71.87	0.00	0.00	99.80
Lioche de la Truchère	Microprobe	<i>Nebela collaris</i>	Dirty quartz	4.66	0.84	1.57	1.36	0.68	0.02	0.61	–	27.92	–	0.05	38.66
Lioche de la Truchère	ESEM-EDS	<i>Nebela collaris</i>	K-feldspar	29.34	1.07	2.11	10.28	2.55	0.00	1.75	0.00	52.64	0.00	0.00	99.74
Lioche de la Truchère	ESEM-EDS	<i>Nebela collaris</i>	K-feldspar	21.87	1.97	3.02	6.44	2.30	0.00	1.24	0.00	62.22	0.00	0.59	99.64
Lioche de la Truchère	ESEM-EDS	<i>Nebela collaris</i>	Calcite + (silicate)	1.99	76.89	0.49	0.00	1.83	0.00	3.05	0.00	15.67	0.00	0.00	99.93
Lioche de la Truchère	ESEM-EDS	<i>Nebela collaris</i>	Feldpath	16.15	1.99	2.99	2.81	3.93	0.00	1.84	5.50	61.64	2.32	0.00	99.18
Montagne de la Plate	Microprobe	<i>Trigonopyxis arcula</i>	Quartz	0.56	1.83	0.06	0.06	0.15	0.01	0.23	–	68.27	–	0.19	71.55
Montagne de la Plate	Microprobe	<i>Trigonopyxis arcula</i>	Feldpath	5.80	1.74	2.93	1.75	3.74	0.03	0.94	–	32.03	–	0.07	49.29
Montagne de la Plate	ESEM-EDS	<i>Trigonopyxis arcula</i>	Chlorite	23.20	1.28	29.90	0.06	14.47	0.00	2.02	0.00	25.16	0.25	0.29	96.62
Montagne de la Plate	ESEM-EDS	<i>Trigonopyxis arcula</i>	Rutile + (pyrite, silicate)	3.82	2.65	3.93	1.22	2.32	0.00	3.82	0.00	11.73	1.63	68.11	99.22
Montagne de la Plate	ESEM-EDS	<i>Trigonopyxis arcula</i>	Amphibole (Kaesultite)	5.01	24.80	6.99	0.44	8.91	0.00	2.44	0.00	46.90	1.14	2.35	98.98

Table 2 (Continued)

Peat bog	Analysis technique	Species	Mineral	Al ₂ O ₃	CaO	FeO	K ₂ O	MgO	MnO	Na ₂ O	P ₂ O ₄	SiO ₂	SO ₂	TiO ₂	Total oxides weight
Montagne de la Plate	ESEM-EDS	<i>Trigonopyxis arcuata</i>	Alcali-feldspar	26.33	2.51	9.11	6.73	4.76	0.00	2.02	0.00	46.47	0.87	0.00	98.79
Montagne de la Plate	ESEM-EDS	<i>Trigonopyxis arcuata</i>	Rutile + (pyrite, silicate)	4.16	3.55	2.06	0.00	1.46	0.00	2.57	0.00	20.17	1.81	63.60	99.39
Verny-des-Brûlons	Microprobe	<i>Physochila griseola</i>	Quartz	0.64	0.15	0.32	0.11	0.08	0.02	0.06	–	96.98	–	0.12	98.50
Verny-des-Brûlons	Microprobe	<i>Physochila griseola</i>	Feldpath alcalin	23.77	0.53	1.70	6.95	0.31	0.00	0.69	–	52.91	–	0.14	87.11
Verny-des-Brûlons	Microprobe	<i>Physochila griseola</i>	Quartz	0.46	0.90	0.10	0.35	0.23	–0.01	0.41	–	80.96	–	0.04	83.55
Verny-des-Brûlons	Microprobe	<i>Physochila griseola</i>	Quartz	0.59	1.51	0.14	0.37	0.34	0.02	0.69	–	73.59	–	0.02	77.46
Verny-des-Brûlons	Microprobe	<i>Physochila griseola</i>	Dirty quartz	5.27	1.85	2.80	1.82	0.90	0.01	0.60	–	74.89	–	0.11	88.41
Verny-des-Brûlons	Microprobe	<i>Physochila griseola</i>	Non determined	8.09	1.22	33.87	0.71	0.52	0.07	0.22	–	40.93	–	0.13	85.95
Verny-des-Brûlons	Microprobe	<i>Physochila griseola</i>	<i>Pyrophyllite ?</i>	27.46	1.36	0.08	0.12	0.30	0.00	0.34	–	53.90	–	0.00	83.69
Verny-des-Brûlons	Microprobe	<i>Physochila griseola</i>	Quartz	1.02	1.98	0.17	0.52	0.17	0.01	0.43	–	71.03	–	0.01	75.56
Verny-des-Brûlons	Microprobe	<i>Physochila griseola</i>	Quartz	0.21	1.01	0.07	0.33	0.16	–0.01	0.66	–	72.97	–	–0.02	75.62
Verny-des-Brûlons	Microprobe	<i>Physochila griseola</i>	Quartz + (K-feldspar)	5.20	3.61	1.42	5.53	0.56	–0.01	1.12	–	53.05	–	0.02	70.69

ESEM-EDS: Environmental Scanning Electron Microscope equipped with an Energy Dispersive Spectroscopy device.

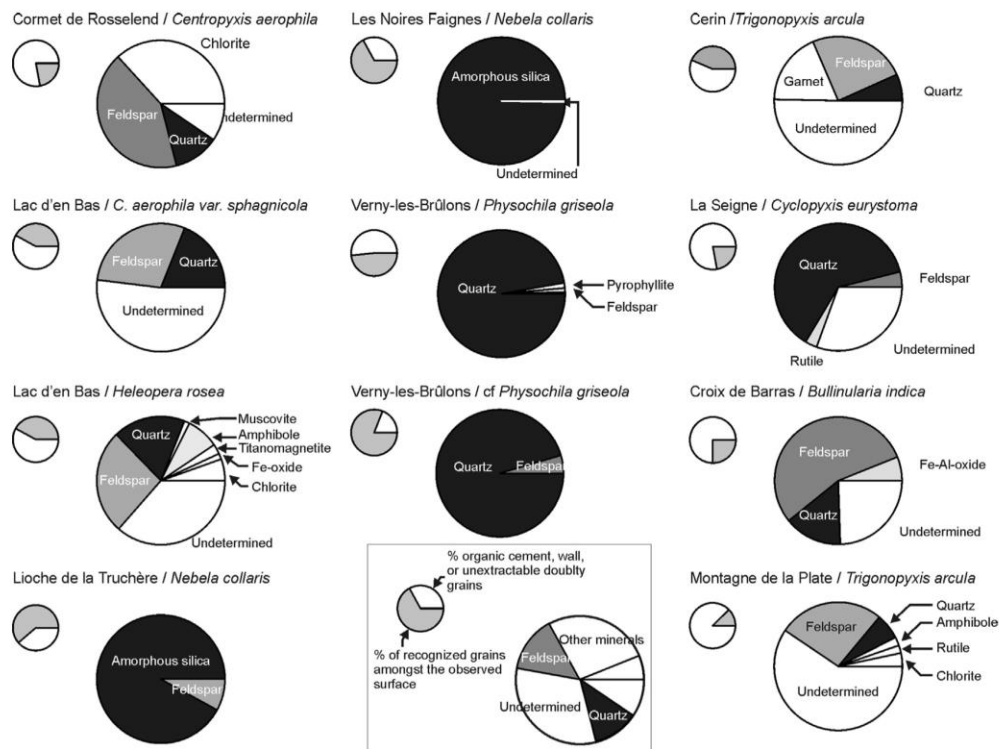


Fig. 3. Proportion of minerals in each of the 11 studied specimens. The small pies indicate the ratio between the proportion of recognized grains among the analyzed surface and the larger pie indicates the mineral proportions within this surface. When a grain is recognized but the mineral species remains unknown, we indicate that it is undetermined.

A total of 24 minerals, a mixture of silicates, oxides and carbonates (Table 2), was determined. For the xenosomes, the minerals/mineral groups or mineral series determined with certainty are amphiboles, quartz, spinel, Ca-carbonates, chlorites, Fe-oxides, garnet, mica (muscovite), feldspars (orthoclase, plagioclase, oligoclase) and rutile (Table 2 and Fig. 2a and b). The failure of the use of the Raman microspectrometer, because of the too little size of grains on a rough surface, did not allow us to discriminate the various carbonate grains; however, the main carbonate mineral is likely to be calcite. The two garnet grains at the Cerin and Croix de Barras peat bogs could be almandin and grossulaire-andradite (Table 2). For the identifiable amphiboles (after Hawthorne and Oberti, 2007; Tindle and Webb, 1994), these were one gedrite-cummingtonite in Croix de Barras, one hornblende in Lac d'en Bas, two kaersutite (with $Ti > 0.5$ but $Na + K > 0.5$) in La Seigne and Lac d'en Bas, and one kaersutite (with low Ti) in Montagne de la Plate. One grain at Verny-les-Brûlons could be pyrophyllite, however its chemical composition is ambiguous.

For most of the idiosomes, the organic coating reduced the quality of the analyses by diminishing the total oxide weight. Nevertheless, we recorded a Si mineral, which might be quartz but more probably represents amorphous silica. Both of the specimens of *Nebela collaris* and both specimens of *Physochila griseola* recycle the scales of the other testate amoebae and

so they have a mixed composition of these idiosomes and the previously described xenosomes.

The proportions of the mineral types are highly variable between specimens. Quartz and feldspars are often dominant (Fig. 3). *Trigonopyxis arcula* from the Cerin peat bog agglutinated a large proportion of garnet while *Centropyxis aerophila* agglutinated numerous grains of chlorite. Some specimens have agglutinated a few different minerals. An example is *C. aerophila var. sphagnicola* in Lac d'en Bas, which utilised only 2 mineral, quartz and feldspar, whereas *Heleopera rosea* from the same peat bog agglutinated grains of quartz and feldspars as well as grains of muscovite, amphibole, titanomagnetite, fe-oxide and chlorite (Fig. 3).

3.2. Grain size and shape

3.2.1. Size

For the specimens that only agglutinate xenosomes, the median grain surface area is between $2.5 \mu\text{m}^2$ (*T. arcula* from Montagne de la Plate) and $21.1 \mu\text{m}^2$ (*Bullinularia indica* from Croix de Barras) (Fig. 4). For specimens that agglutinate either xenosomes or idiosomes, the median surface area spanned a similar range, from $3.1 \mu\text{m}^2$ (*P. griseola*, Verny-les-Brûlons) to $29.6 \mu\text{m}^2$ (*N. collaris*, Les Noires Faignes). The surface area range varied among the species: low for *T. arcula* from

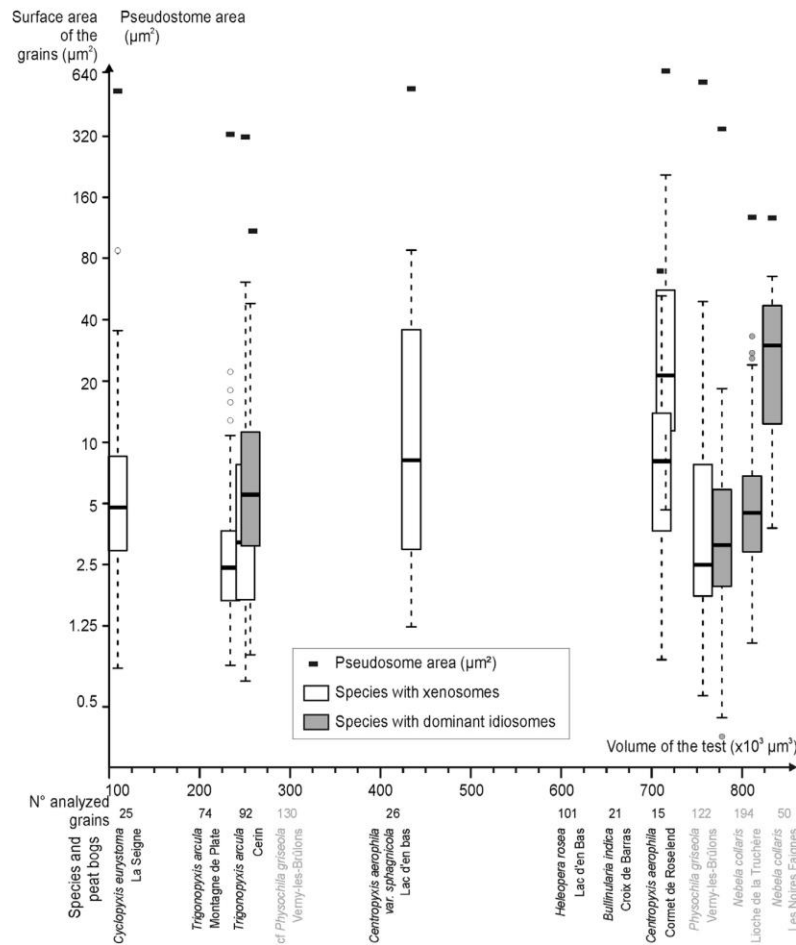


Fig. 4. Box and whisker plots for the global distribution of the surface area of the xenosomes (white) and idiosomes (grey). The surface areas are sorted by species and plotted against the biovolume. The pseudostome area is indicated as a black point.

Montagne de la Plate and high for *C. aerophila* var. *sphagnicola* from Lac d'en Bas (Fig. 4).

All agglutinated xenosomes or idiosome grain surface areas were smaller than the areas of the pseudostome (test aperture) of each species (Fig. 4). No trend was observed between the biovolume and the surface area of the grains (Fig. 4). There was also no trend observed between the surface area of the grains and the maximum length of the test (supplementary material, Fig. S1).

The grains were then pooled according to their mineral nature (Fig. 5). The largest grains were orthoclase and quartz for both test types (xenosomes and mixed xenosomes and idiosomes). For the xenosome-bearing tests, however, the mean surface area was larger for most of the other minerals (Fig. 5).

The size of the two dominant minerals (quartz and feldspar in a broad sense) was then plotted separately for the xenosomes and mixed xenosomes and idiosome tests and according to the biovolume of the tests (Fig. 6). The median grain size is smaller for feldspar than for quartz, ranging from ca. 2 to 8 µm and

ca. 3 to 80 µm, respectively. The size range is also smaller for feldspar than for quartz grains (Fig. 6). No precise trend could be extracted from the comparison between these two mineral surface areas and the volume of the tests.

3.2.2. Shape

The median circularity of the grains ranges between 0.73 (*C. aerophila* var. *sphagnicola*) and 0.84 (*N. collaris*) (supplementary material, Fig. S2). The shape is mostly rounded. No grain's shape is close to either a circle or a rod. The Feret's diameter ranges are usually short and under 5 µm except for three specimens: *N. collaris* (Noires Faignes), *B. indica* and *C. aerophila* var. *sphagnicola*. For *C. aerophila* var. *sphagnicola*, a low circularity and the high Feret's diameter of some of the grains indicate more elongate shapes than for other specimens. These elongated particles are the autochthonous frustules from the diatoms living in the Lac d'en Bas peat bog.

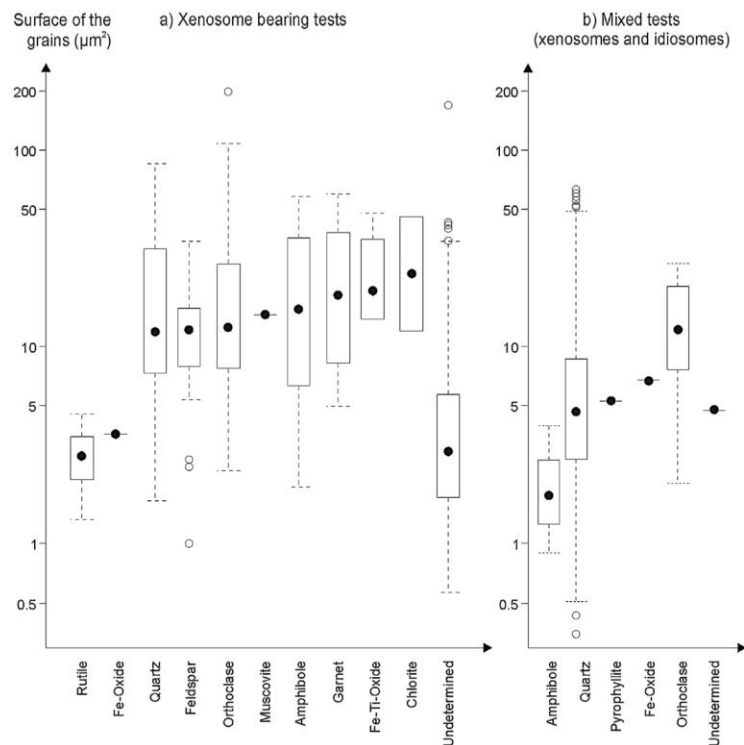


Fig. 5. Distribution of the surface of the xenosomes (a) and idiosomes (b) sorted by mineral nature.

3.3. Origin of the particles

In most cases, the closest outcrop could provide all of the minerals (Fig. 7). In the case of *Caerophila* (Cornet de Rose-land) and *Diffugia globulosa* (La Seigne), the shortest distances varied depending on the mineral. In La Seigne, the amphibole and rutile grains were probably inherited from the glacial deposit situated 1530 m away, whereas the nearest Fe-oxide source was only 100 m away.

Not surprisingly, the largest grains (up to a median surface of $30 \mu\text{m}^2$) originated from the nearest outcrops, while the smallest (median of a few μm^2) was provided by outcrops up to 1530 m away (La Seigne) (Fig. 7).

4. Discussion

4.1. Analytical techniques

Improved techniques made the analyses of testate amoeba tests more precise and allowed us to recognise additional constituent mineral grains, both precipitated and agglutinated. In the earliest study, field cell-chemistry and chromatography were used to investigate the organic component of the test (e.g. Moraczewski, 1971). Subsequent studies involved acid treatment of the test and analysis of the residual material to determine the mineral components. Using these techniques, and with the additional use of “RX-spectrography” (X-Ray diffraction analysis), Saucin-Meulenberg et al. (1973) determined the occurrence

of silicic material in *Arcella* sp., *A. hemisphaerica*, *Diffugia acuminata*, and *Pontigulasia bigibbosa* tests, and in *Plagiopyxis callida* and *P. declivis*. Stout and Walker (1976), meanwhile, observed the surface of *Diffugia*, *Centropyxis*, *Cyclopyxis* and *Euglypha* with an X-ray micro-analyzer, distinguishing between major constituents (mostly Si and Al only in the case of *Diffugia*), significant constituents (Al, K, and Ca), and trace constituents (Na, Cl, Ca and Al).

The use of SEM coupled with EDS enabled the determination of both the shape and chemical composition of the grains. EDS was first used by Yamaoka and Mizuhira (1987) to analyze the elemental composition of scales in *Cochliopodium* sp., which are idiosomes containing calcium. Investigation of the cellular ultrastructure allowed the authors to explore the role of the Golgi vesicles with respect to the use of calcium for the scale construction. Ogden (1988) used the same technique to analyze the organic structure of some *Diffugia* species that were able to construct their shell in the absence of available minerals. The author observed the occurrence of Ca, Mg, Fe and P. Elemental analysis was used extensively by Armynot du Châtelet et al. (2010) to determine the mineral composition of xenosomes and finally revealed that the mineral composition of testate amoebae depends on what is available in the environment and not on the preferences of particular species. In the present study, the testate amoeba shells were composed mainly of the major elemental constituents of minerals, with the addition of Mn, Ti, P and S in some cases. This variety of elements reflected the presence of many different minerals. However, some of them were

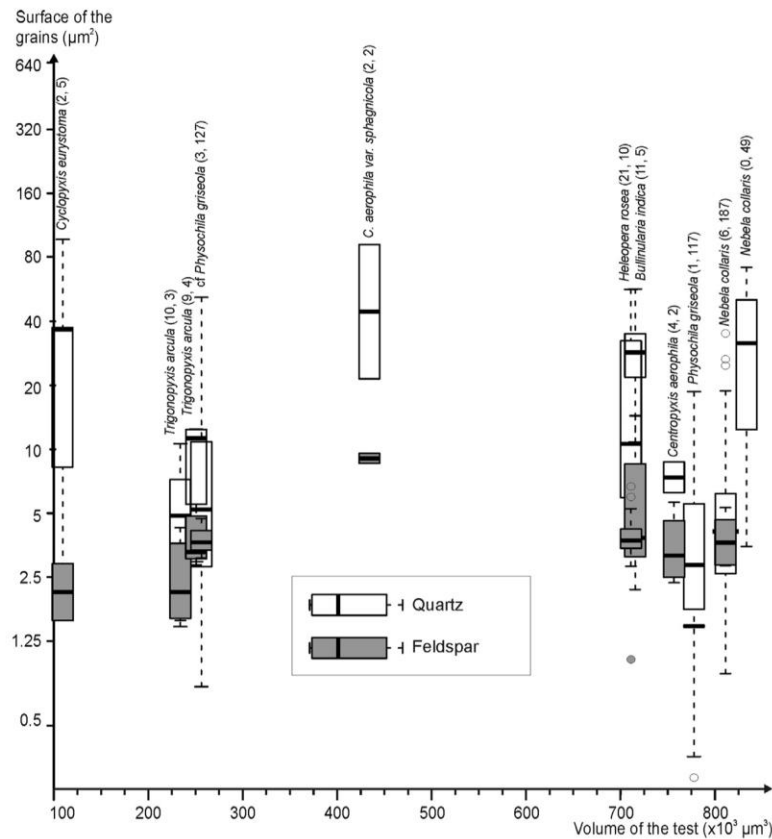


Fig. 6. Surface of quartz and feldspar (dominant minerals) sorted by species and classified against the biovolume of the specimens. The values in the brackets are the number of analyzed feldspar and quartz.

determined with a low level of confidence. The main reasons for this are that we worked on non-polished rough surfaces and some mineral particles were very small with high relief, reducing signal detection. In conclusion, even if the combined use of ESEM-EDS and EPMA is efficient for a chemical analysis and subsequently for mineralogy determination, working on natural materials may sometimes reduce the quality of the measurements and cause difficulties in determining the mineral species of the grain. As the technique is costless, however, measurements could be repeated.

4.2. Test mineral composition

We observed that the xenosome composition was highly variable among sites and species. Despite our preliminary sampling strategy, which did not allow us to establish the nature of grain selection by different species, we were able to put forward three possibilities for mineral selection that will need to be tested.

(1) **The grains available to the testate amoebae in their immediate environment, which will depend on the geological context of the collection site and the distance from the source rocks.** This is the first time that a study on testate amoebae has described such a large panel of 24 minerals/mineral groups or mineral series, classified within 13 categories. Early

studies often described quartz as the main mineral forming the test. For example, [Ogden \(1984\)](#) in his description of 11 testate amoeba structures mentioned the occurrence of various chemical elements such as Si, Al, Ca, P, and Fe, but only specified the occurrence of quartz. Quartz is certainly dominant because of its abundance compared to most other minerals available in earth surface sediments. Nevertheless, in the present study, K-feldspar, garnet and chlorite could also be present in significant amounts. ESEM-EDS and microprobe analyses emerged as essential techniques for determining the chemical composition of the testate amoeba shell surfaces. For the determination of minerals on the testate amoebae, other techniques like Raman microspectrometry analyses may be advantageously combined with the two former approaches, as previously conducted on foraminifera agglutinated tests ([Armynot du Châtelet et al., 2013a](#)). However, this could only be done if the minerals were larger than those measured in the present study and the organic cover lining was limited.

All of the grains available within the surrounding environment may potentially be observed within the testate amoeba shell, whether they are natural particles or perhaps also have an anthropogenic origin. A limit to this investigation is our observation that the minimal distance between the potential source and the sampling site does not exceed 1500 m. This short

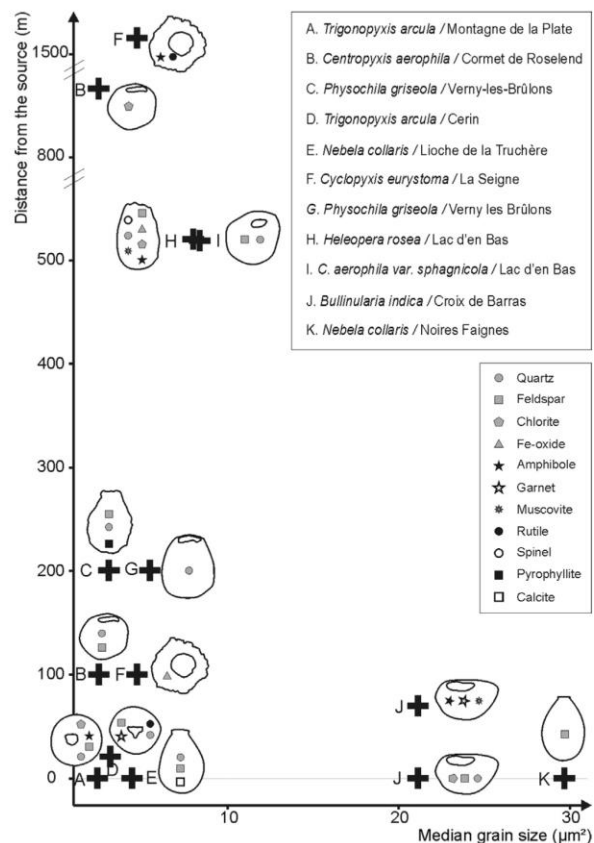


Fig. 7. Distance from the source against the median grain size of the different minerals observed on the surface of each specimen. When different source distances are possible, the specimens are drawn twice with the right mineral at the corresponding distance.

distance is the consequence of the dominance of classical minerals from the geological setting (correct observations are limited to particle surfaces $> 1 \mu\text{m}^2$). Some of the grains that are observed may come from further away, even if we find similar minerals closer.

(2) The chemical stability of grains, which (in combination with the distance from their source) will influence their availability and physical properties such as size and surface characteristics. Although Ca-carbonate grains are numerous in the surrounding outcrops of the Cerin, La Seigne and Lioche de la Truchère peatlands, it is worth noting that they were rarely observed in the testate amoeba tests. Within the acid conditions of the peatlands, Ca-carbonate is unstable and may be dissolved rapidly [see experimental studies on other calcite-bearing shell protists; (Le Cadre et al., 2003)]. In this study, foraminifera shells were dissolved in 15 days by lowering the pH from 8 to 7.

Indeed, all of the observed xenosomes with a Ca-carbonate composition were often altered and did not present a well-crystallized shape. These surface characteristics may explain why Ca-carbonate is probably avoided by testate amoebae for constructing their test. This observation has already been highlighted by Armynot du Châtelet et al. (2013b) in a small pond

of northern France, where specimens of *D. oblonga* agglutinated a majority of quartz grains, whereas the environment was largely dominated by limestone remains rich in calcite minerals. In these conditions, testate amoebae would preferentially select siliceous minerals. On the contrary, when the pH is more suitable for Ca-carbonate (Calcite) stability, testate amoebae may more easily incorporate them, as observed by Armynot du Châtelet et al. (2010) on specimens from Annecy Lake (France) within a limestone geological context and where the pH is close to 8.

(3) The active selection by the testate amoebae of grains with particular physical or chemical properties, in the present case size. This hypothesis had been advanced early by Eckert and McGee-Russell (1974), who explained after SEM and TEM observations of *Diffflugia lobostoma* that grains were selected according to their size. In transit through the cytoplasm they were organized in rosette structures. In the same period, Netzel (1972) observed in specimens of *Diffflugia oviformis* that all of the idiosomes and xenosomes are first prepared within the mother theca before division and transferred a second time to the daughter cell and incorporated in an organic layer. For these transfers, we suppose that these grains should have a size that is inferior to the pseudostome size. No measurement of either the size of grains or the size of the pseudostome had been made at the time. After the results of Golemansky and Ogden (1980), it appears that the size of the plates of *Centropyxiella arenaria* are 1/2 to 1/4 of the diameter of the aperture. More recently, with the 3D technique of microtomography and a full characterization of the surface and volume of a grain, Armynot du Châtelet et al. (2013b) observed that grains agglutinated on *D. oblonga* had a size that was inferior to the pseudostome size.

With a larger range of species, we observed in the present study that, whatever the species and geological context, this may provide a very wide range of particles, and incorporated grains were always smaller than the pseudostome.

5. Conclusion

The combination of ESEM-EDS and microprobe analyses is suitable for analyzing testate amoeba surfaces. Xenosomes (mineral grains) are easily recognizable, with a high level of confidence on their determination. Idiosomes are comprised of amorphous silica and covered by an organic layer that reduces the quality of analyses.

Whatever the species, the size of the particles used is inferior to the size of the pseudostome. These particles reflect the geological surroundings and their size seems to be related to the distance from their source.

These preliminary results were based on only one or two specimens selected at each peatland. Accordingly, a larger statistical database should be developed in the future to check whether individuals of specific species are dependent on particle fluxes. After testing these hypotheses, additional studies could be envisaged focusing more specifically on the influence of atmospheric particle transport and deposition and, subsequently, to determine if testate amoebae use anthropogenic grains and if they originate from short or long distances.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgments

The authors thank Philippe Recourt (ESEM-EDS), Sandra Ventalon (Raman microspectrometry) and Séverine Belayet (Electronic microprobe) for their technical help. We are also indebted to Andy Gooday and grateful to two other anonymous reviewers, as well as the editor-in-chief Taniel Danelian for their thorough review and constructive suggestions.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found in the online version available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.revmic.2015.05.001>.

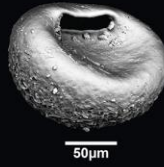
References

- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukes, U., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenerath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, J., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012. The revised classification of Eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 59, 429–493.
- Antoine, P., Barféty, J.-C., Vivier, G., Debelmas, J., Desmons, J., Fabre, J., Loubat, H., Vautrelle, C., 1992. Notice explicative. Carte géologique de la France (1/50 000), feuille Bourg-Saint-Maurice (727). Bureau de Recherche Géologique et Minière, Orléans.
- Antoine, P., Barféty, J.C., Vivier, G., Gros, Y., Fudral, S., Landry, P., Fabre, J., 1993. Carte géologique de la France (1/50 000), feuille Bourg-Saint-Maurice (727). Bureau de Recherche Géologique et Minière, Orléans.
- Aoki, Y., Hoshino, M., Matsubara, T., 2007. Silica and testate amoebae in a soil under pine-oak forest. *Geoderma* 142, 29–35.
- Armynot du Châtelet, E., Bout-Roumazeilles, V., Coccioni, R., Frontalini, F., Guillot, F., Kaminski, M.A., Recourt, P., Riboulleau, A., Trentesaux, A., Tribouillard, N., Ventalon, S., 2013a. Environmental control on shell structure and composition of agglutinated foraminifera along a proximal-distal transect in the Marmara Sea. *Marine Geology* 335, 114–128.
- Armynot du Châtelet, E., Guillot, F., Recourt, P., Ventalon, S., Tribouillard, N., 2010. Influence of sediment grain size and mineralogy on testate amoebae test construction. *Comptes Rendus de Geosciences* 342, 710–717.
- Armynot du Châtelet, E., Noirielle, C., Delaine, M., 2013b. 3D morphological and mineralogical characterisation of testate amoebae. *Microscopy and Microanalysis* 19, 1–12.
- Bao, K., Xing, W., Yu, X., Zhao, H., McLaughlin, N., Lu, X., Wang, G., 2012. Recent atmospheric dust deposition in an ombrotrophic peat bog in Great Hinggan Mountain, Northeast China. *Science of the Total Environment* 431, 33–45.
- Bernier, P., 1985. Les formations carbonatées du Kimméridgien et du Portlandien dans le Jura méridional (stratigraphie, micropaléontologie, sédimentologie). Université Claude-Bernard, Lyon.
- Bernier, P., Gaillard, C., Barale, G., Bourseau, J.-P., Buffetaut, E., Gall, J.-C., Wenz, S., 1994. The underlying substrate of the Cerin lithographic limestones. *Geobios* 27, 13–24.
- Brousse, P., Rançon, J.-P., Le Garrec, M.-J., Tempier, P., Suire, J., Veyret-Mekdjian, Y., D'Arcy, D., Perichaud, J.-J., 1990a. Notice explicative. Carte géologique de la France (1/50 000), feuille La Tour-d'Auvergne (740). Bureau de recherches géologiques et minières, Orléans.
- Brousse, P., Suire, J., Tempier, P., Le Garrec, M.J., Veyret-Mekdjian, Y., Medhizadeh, H., Mervoyer, B., Musengié, M., 1990b. Carte géologique de la France (1/50 000), feuille La Tour-d'Auvergne (740). Bureau de recherches géologiques et minières, Orléans.
- Caillière, S., Lorenz, J., 1973. Carte et notice de la géologie de la France - 1/50 000 - 497 Saulieu. Bureau de recherches géologiques et minières, Orléans.
- Clarke, K.J., 2003. *Guide to the Identification of Soil Protozoa - Testate Amoebae*. Centre for Ecology and Hydrology, Ambleside, Cumbria.
- Coutterand, S., 2010. Étude géomorphologique des flux glaciaires dans les Alpes nord-occidentales au Pléistocène récent du maximum de la dernière glaciation aux premières étapes de la déglaciation. Université de Savoie, Chambéry.
- Deer, W.A., Howie, R.A., Zussman, J., 1992. *An Introduction to the Rock-forming Minerals*, second ed. Wiley, New York.
- Durand, M., Vincent, P.-L., Minoux, G., 1988. Carte géologique de la France (1/50 000), feuille Épinal (339). Bureau de recherches géologiques et minières, Orléans.
- Eckert, B.S., McGee-Russell, S.M., 1974. Shell structure in *Diffugia lobostoma* observed by scanning and transmission electron microscopy. *Tissue Cell* 6, 215–221.
- Etlicher, B., 1986. Les massifs du Forez, du Pilat et du Vivarais. Régionalisation et dynamique des héritages glaciaires et périglaciaires en moyenne montagne cristalline. Université de Saint-Étienne, Saint-Étienne.
- Falsan, A., Chantre, E., 1879. Monographie géologique des anciens glaciers et du terrain erratique de la partie moyenne du bassin du Rhône. Annales Société Agrégé Histoire Naturelle Université Lyon 2, Lyon.
- Goguel, J., Caire, A., 1967. Carte et notice de la géologie de la France (1/50 000), feuille Salins-les-Bains (556). Bureau de recherches géologiques et minières, Orléans.
- Golemansky, V., Ogden, C.G., 1980. Shell structure of three littoral species of testate amoebae from the Black Sea (Rhizopoda Protozoa). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Geology* 38, 1–6.
- Hawthorne, F.C., Oberti, R., 2007. Classification of the Amphiboles. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 67, 55–88.
- Hottin, A.-M., Chèvremont, P., Marteau, P., Etlicher, B., 1998a. Carte géologique de la France (1/50 000), feuille Ambert (719). Bureau de recherches géologiques et minières, Orléans.
- Hottin, A.M., Chèvremont, P., Marteau, P., Ménillet, F., Moulin, M., Dominique, P., Blès, J.-L., Dosso, M., 1998b. Notice explicative, carte géologique de la France (1/50 000), feuille Ambert (719). Bureau de recherches géologiques et minières, Orléans.
- Jauzein, A., Perthuisot, J.-P., Perthuisot, M., 1972. Notice et carte géologique de la France (1/50 000), feuille Tournus (602). Bureau de recherches géologiques et minières, Orléans.
- Kerrien, Y., Juventin, G., Lorenchet de Montjamont, M., Monjuvent, G., Gailard, C., 1990. Carte géologique de la France (1/50 000), feuille Belley (700). Bureau de recherches géologiques et minières, Orléans.
- Lapadu-Hargues, P., 1964. Carte géologique de la France (1/80 000), feuille Brioude, troisième ed. Bureau de recherches géologiques et minières, Orléans.
- Le Cadre, V., Debenay, J.-P., Lesourd, M., 2003. Low pH effects on ammonia beccarii test deformation: implications for using test deformations as a pollution indicator. *Journal of Foraminiferal Research* 33, 1–9.
- Mitchell, E.A.D., Payne, R.J., Lamentowicz, M., 2008. Potential implications of differential preservation of testate amoeba shells for paleoenvironmental reconstruction in peatlands. *Journal of Paleolimnology* 40, 603–618.
- Moraczewski, J., 1971. La composition chimique de la coque d'*Arcella discoides* Ehrbg. *Acta Protozoology* 8, 423–437.
- Netzel, H., 1972. Die Schalenbildung bei *Diffugia oviformis* (Rhizopoda, Testacea). *Zeitschrift fuer Zellforschung* 135, 55–61.
- Ogden, C.G., 1984. Shell structure of some testate amoebae from Britain (Protozoa, Rhizopoda). *Journal of Natural History* 18, 341–361.
- Ogden, C.G., 1988. Morphology of the organic shell matrix of *Diffugia* (Rhizopoda) in culture, including modification by the addition of agglutinate particles. *Archiv fuer Protistenkunde* 136, 365–376.
- Ogden, C.G., Hedley, R.H., 1980. *An Atlas of Freshwater Testate Amoebae*. British Museum (Natural History), Oxford University Press, Oxford, London, Glasgow.

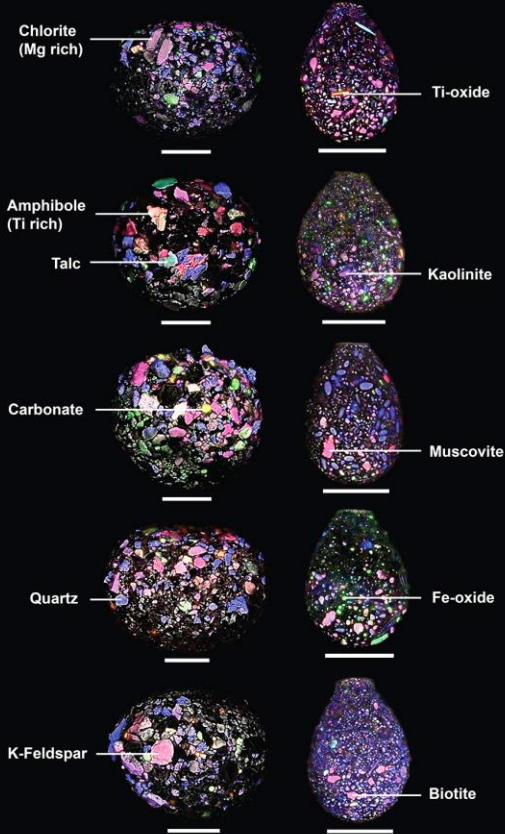
- Saucin-Meulenberg, M., Bussers, J.C., Jeuniaux, C., 1973. Composition chimique de la thèque de quelques thécamoebiens (Protozoaires). *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique* 107, 107–113.
- Scott, D.B., Medioli, F.S., Schafer, C.T., 2001. *Monitoring in Coastal Environments Using Foraminifera and Thecamoebian Indicators*. Cambridge University Press, New York.
- Stout, J.D., Walker, G.D., 1976. Discrimination of mineral particles in test formation by the amoebae. *Transactions of the American Microscopical Society* 95, 486–489.
- Tindle, A.G., Webb, P.C., 1994. Probe-AMPH – a spreadsheet program to classify microprobe-derived amphibole analyses. *Computer Geoscience* 20, 1201–1228.
- Vincent, P.-L., Durand, M., Guillaume, C., Vogt, J., Allemmoz, M., 1989. Notice explicative, carte géologique de la France (1/50 000), feuille Épinal (339). Bureau de recherches géologiques et minières, Orléans.
- Yamaoka, I., Mizuhira, V., 1987. X-ray microanalysis of the mineral components in the scales of an amoeba, *Cochliopodium* sp. (Testacea). *Cell and Tissue Research* 247, 633–637.

Diversity of mineral and organic objects agglutinated by *Bullinularia indica* and *Nebela cf. collaris*

Maxence DELAINE,
Eric ARMYNOT DU CHATELET,
Daniel GILBERT, François GUILLOT,
Philippe RECOURT and Nadine BERNARD

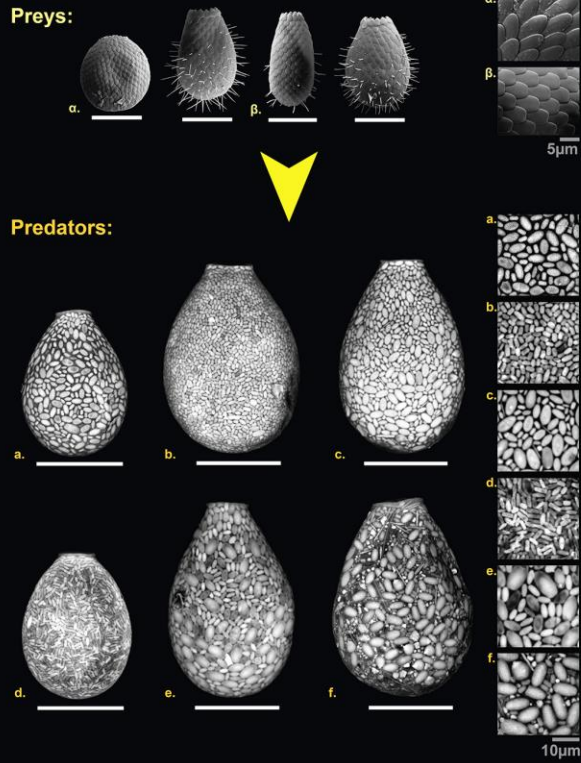


Mineral grains

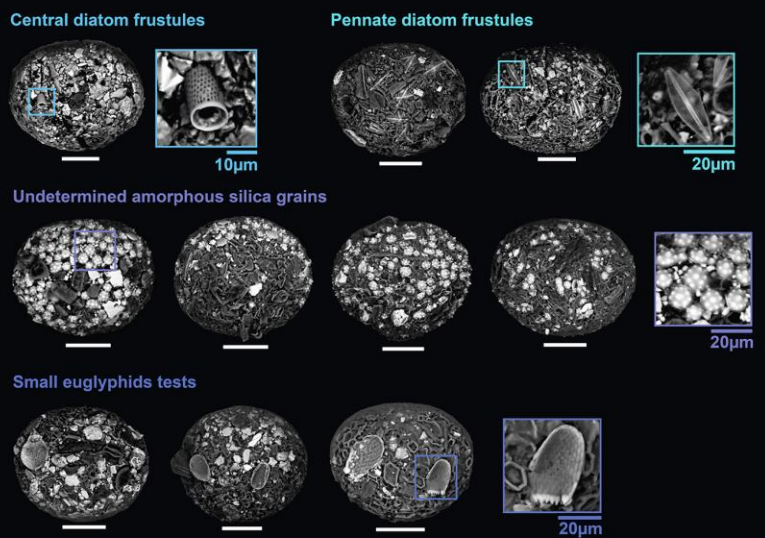


Composite SEM-EDS pictures obtained by superposition of EDS maps showing mineral variability

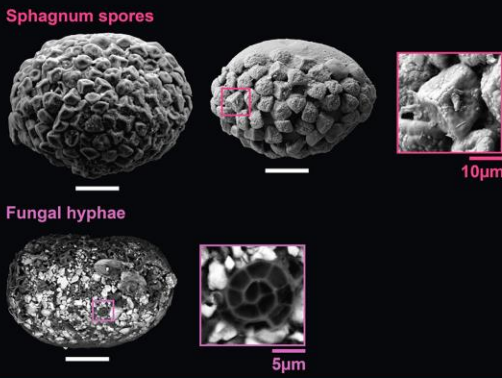
Amorphous silica grains resulting from predation processes



Amorphous silica grains



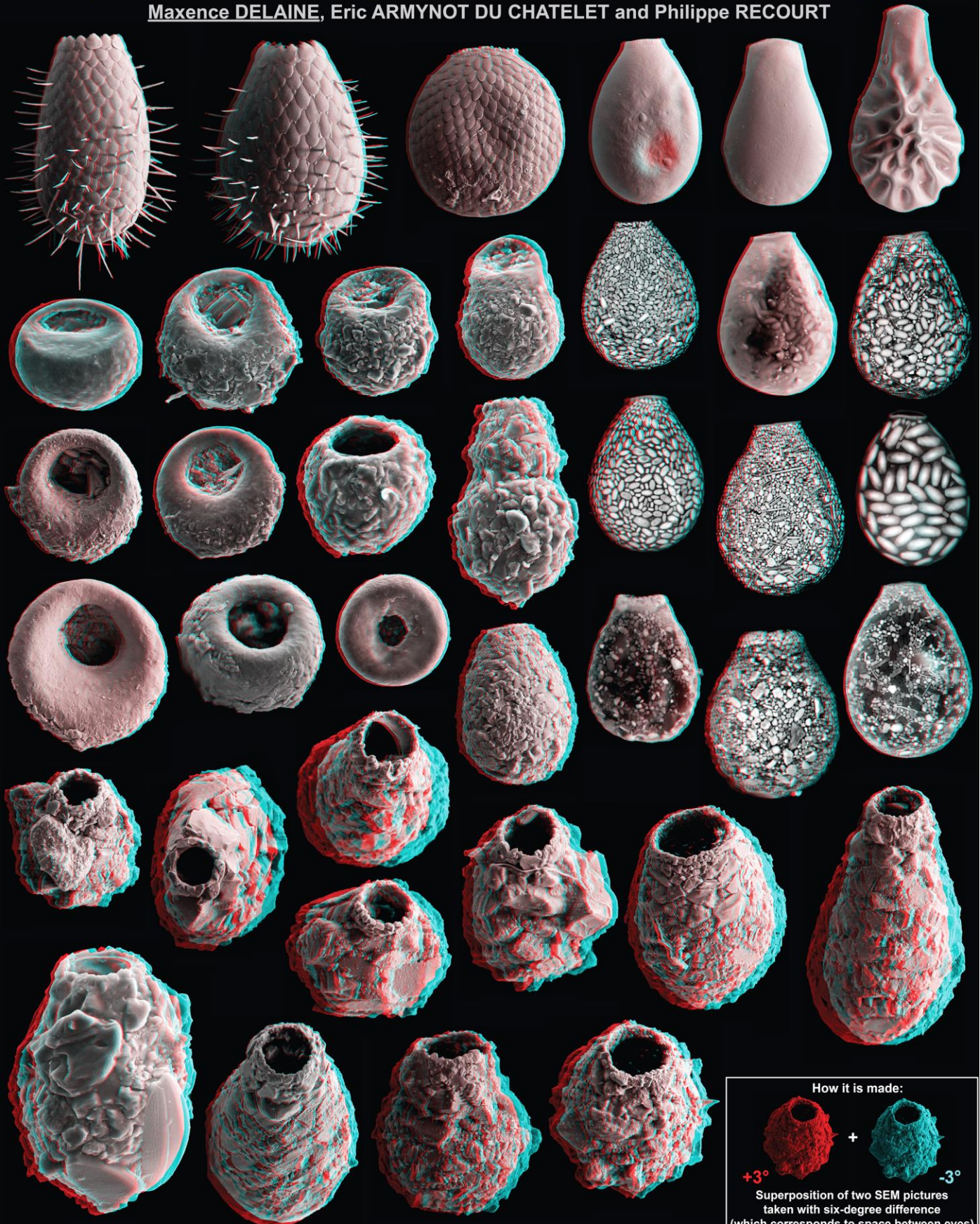
Organic grains



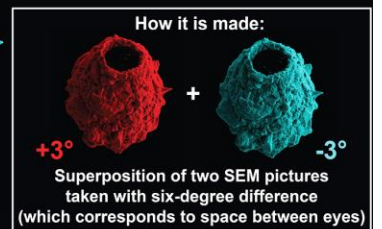
Shells presented on this document were imaged (after carbon coating) via ESEM-EDS. Size of the white scale bars is 50µm. Origin of the specimens: *Sphagnum capillifolium* and *Sphagnum magellanicum* from Le Russey peatland (Jura mountains, France).

Anaglyphic SEM pictures: a new method which improves presentation and description of testate amoebae's shell morphology

Maxence DELAINE, Eric ARMYNOT DU CHATELET and Philippe RECOURT



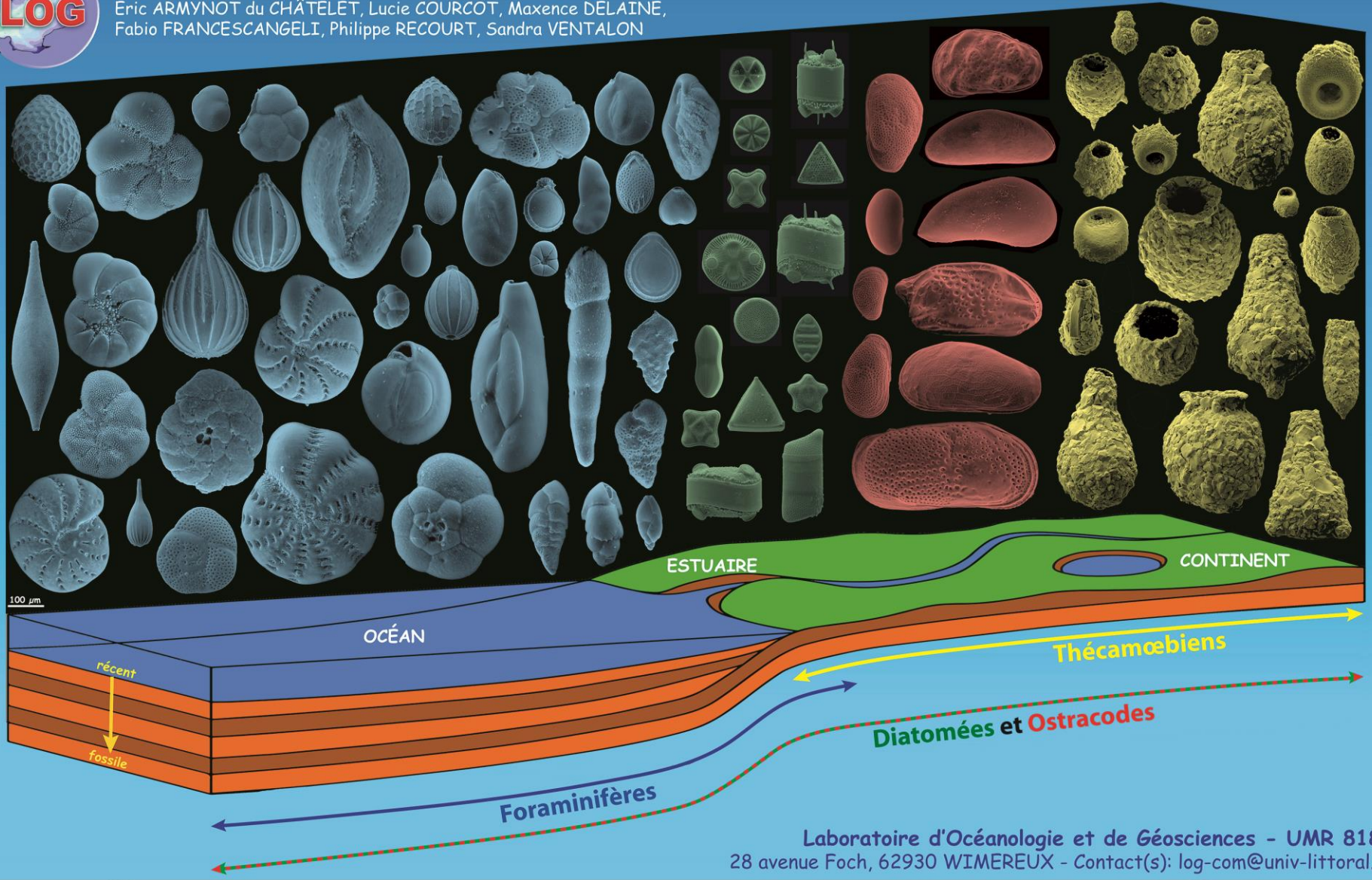
Sizes are between 50 and 500µm. Proportionality between shells is not respected.





MICRO-ORGANISMES : L'INCROYABLE DIVERSITÉ !

Eric ARMYNOT du CHÂTELET, Lucie COURCOT, Maxence DELAINE,
Fabio FRANCESCANGELI, Philippe RECOURT, Sandra VENTALON



Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences - UMR 8187
28 avenue Foch, 62930 WIMEREUX - Contact(s): log-com@univ-littoral.fr





MICRO-ORGANISMES, À QUOI ÇA SERT?

Eric ARMYNOT du CHÂTELET, Lucie COURCOT, Maxence DELAINE, Fabio FRANCESCANGELI, Philippe RECOURT, Sandra VENTALON

Foraminifères

Thécamoebiens

Réseau trophique

Les micro-organismes se nourrissent des bactéries et des résidus de matière organique. Eux-mêmes sont consommés par les maillons supérieurs de la chaîne trophique.

Environnement

Les espèces se construisent, vivent et meurent contraintes par leur environnement. Les observer permet de comprendre cet environnement.

Paléo-environnement

Les espèces évoluent au cours de l'histoire, du climat, ... les fossiles indiquent les changements de l'environnement.

Climatologie

Les isotopes de l'oxygène des carbonates sont utilisés comme paléo-thermomètres

Datations

Les isotopes du carbone des coquilles servent à donner une date.

Ostracodes

Diatomées

Pollution

Les espèces réagissent aux gradients de pollutions. Ce sont de bons indicateurs de la qualité de l'environnement.

Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences – UMR 8187

28 avenue Foch 62930 WIMEREUX - Contact : log-com@univ-littoral.fr

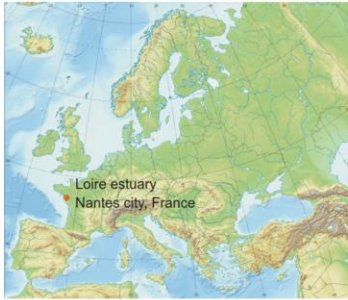


Benthic foraminifera and testate amoebae as tracers for Holocene estuarine sediment infilling: a multi-proxy approach

Maxence DELAINE, Eric ARMYNOT du CHATELET, Viviane BOUT-ROUMAZELLES, Evelyne GOUBERT, Valérie LE CADRE, Philippe RECOURT, Alain TRENTESAUX and Rémy ARTHUIS



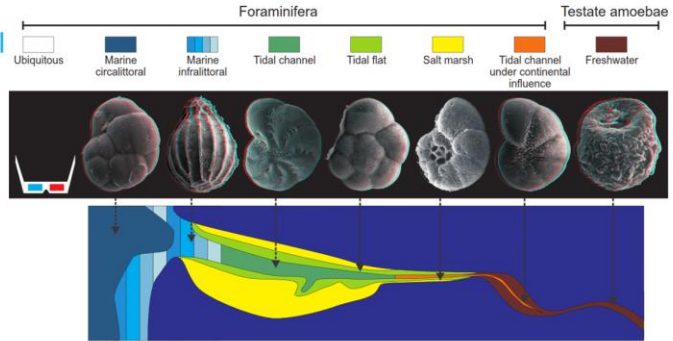
Institut national de recherches archéologiques préventives



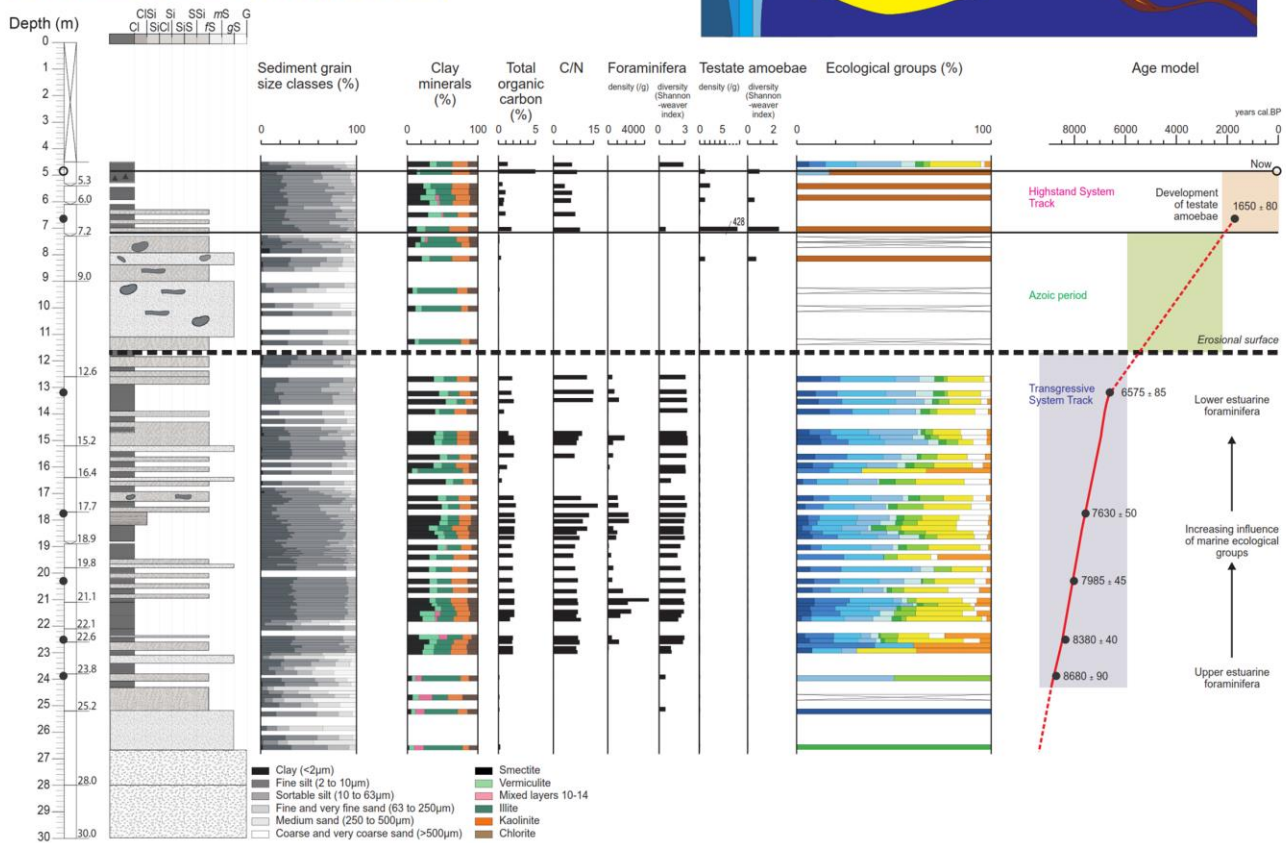
Objective

Foraminifera and testate amoebae are jointly used with sediment characteristics (sediment size, calcium carbonate, C, H, N, and S proportions, and clay mineralogy) to reconstruct the Holocene sediment-infilling of the Loire river in Nantes (France).

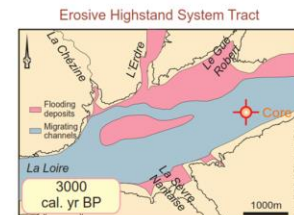
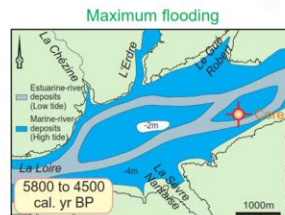
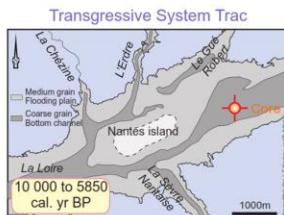
Ecological model



Environmental and ecological study



Environmental reconstruction: infilling of the Loire Valley during Holocene



From 8850 to 5850 cal. yr BP, estuarine fauna settled in a laminated sediment that alternates between clay and sand. The smectite associated with kaolinite and illite suggests increased input from the Sèvre Nantaise River and a rise in salinity. The fauna progressively shifts from estuarine to marine, indicating a rise in the sea level.

From 5850 cal. yr BP, the pace of the sea level rise slowed and channels migrated, implying intense erosion.

After 2100 cal. yr BP, the fauna was dominated by testate amoebae, indicating a continentalization of the environment. The top samples reflect recent human activity and urbanization.

Résumé

Composition des thèques d'amibes xénosomiques : utilisation potentielle comme bio-indicateur des dépôts de particules d'origine atmosphérique

Mots clés : Thécamœbiens, Amibes, Thèques, Bio-indicateurs, Particules atmosphériques, MEB-EDS, Sphaignes, Minéraux

Les amibes à thèque, également appelés thécamœbiens, sont des micro-organismes unicellulaires, qui construisent une enveloppe rigide, appelée thèque (Adl et al., 2012). Ces thèques ont des tailles, formes et natures très variées (Ogden & Hedley, 1980). Les récentes études sur la composition des thèques ont conduit à émettre l'hypothèse que les amibes xénosomiques (constituées de particules exogènes), peuvent constituer des bio-indicateurs pertinents de la diversité particulaire de l'environnement minéral, organique et biologique dans lequel elles évoluent.

L'objectif principal des recherches menées au cours de cette thèse vise donc à caractériser la composition des thèques d'amibes xénosomiques et à en évaluer leur utilisation potentielle en tant que bio-indicateurs des dépôts de particules d'origine atmosphérique. Pour cela, des thèques d'amibes ont été analysées in situ en conditions naturelles et après dépôts artificiels de particules minérales allochtones.

Ces travaux permettent de dégager plusieurs conclusions majeures :

(1) La taille des particules minérales intégrées dans la thèque xénosomique de *Bullinularia indica* est similaire à celle des particules minérales transportées dans l'atmosphère; (2) les particules minérales intégrées dans les thèques sont des silicates stables dans les conditions physico-chimiques régnant dans les tourbières, les bryophytes et les sols étudiés; (3) certains minéraux comme la phlogopite, même lorsqu'ils sont présents en de fortes concentrations, ne sont jamais intégrés par les amibes; (4) la combinaison des observations portant sur la taille, la forme et la nature des particules utilisées par des amibes xénosomiques permet de poser les bases de l'utilisation des amibes à thèques pour la bio-indication de la diversité particulaire atmosphérique récente ou ancienne.

Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., et al., 2012. *The revised classification of eukaryotes*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–93.

Ogden, C.G., Hedley, R.H., 1980. *An atlas of freshwater testate amoebae*. *British Museum (Natural History)*. Oxford University Press