



HAL
open science

**Etude de l'iridescence d'une bactérie marine,
Cellulophaga lytica : caractérisation physico-optique,
microbiologique et écologique**

Betty Kientz

► **To cite this version:**

Betty Kientz. Etude de l'iridescence d'une bactérie marine, Cellulophaga lytica : caractérisation physico-optique, microbiologique et écologique. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2012. Français. NNT : 2012LAROS378 . tel-01570861v2

HAL Id: tel-01570861

<https://theses.hal.science/tel-01570861v2>

Submitted on 21 Sep 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.

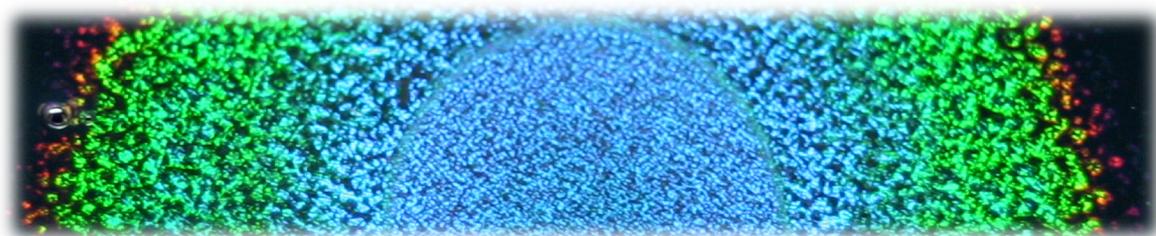
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

UMR 7266 CNRS
Laboratoire Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs)



THÈSE

présentée par :

Betty KIENZT

soutenue le 21 Novembre 2012
Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle
Discipline : Microbiologie et Biotechnologie marines

**Etude de l'iridescence d'une bactérie marine,
Cellulophaga lytica :**

Caractérisations physico-optique, microbiologique et écologique

Composition du jury :

Mr Yvan MARTIN	DR, Institut océanographique Paul Ricard (83)	Rapporteur
Mr Gurvan MICHEL	DR CNRS, Station biologique de Roscoff	Rapporteur
Mr Serge BERTHIER	Pr, Institut des nanosciences, Paris VI	Examineur
Mr Peter VUKUSIC	Pr, Université d'Exeter (Angleterre)	Examineur
Mme Marianne GRABER	Pr, Université de La Rochelle	Examineur
Mr Eric ROSENFELD	MCF-HDR, Université de La Rochelle	Directeur de thèse
Mr Tâm MIGNOT	CR CNRS, Laboratoire de Chimie Bactérienne (13)	Invité

Sommaire

Liste des publications	9
Introduction.....	11
Etat des connaissances	15
I. Les colorations dans la nature	17
I.1 Lumière et couleurs	17
I.2 Les colorations chimiques et biochimiques	19
I.2.a La pigmentation	19
I.2.b La fluorescence	20
I.2.c La bioluminescence	21
I.2.d Couleurs chimiques et biochimiques des bactéries	22
I.3 Les processus de coloration physique.....	23
I.3.a Nature des phénomènes.....	23
I.3.b Termes descriptifs des couleurs structurales.....	27
I.3.c Iridescence dans la nature.....	29
I.3.d Les types de structures iridescentes	29
I.4 Rôles associés à l'iridescence	32
I.4.a Fonctions communicatives.....	32
I.4.b Fonctions non-communicatives	32
I.5 Iridescence des organismes marins.....	35
II. Couleurs physiques des procaryotes	40
II.1 Premières descriptions.....	40
II.2 Termes descriptifs	42
II.3 Différentes méthodes d'observation.....	43
II.3.a Mention des angles d'illumination	43
II.3.b Observations visuelles	44
II.3.c Observations spectrales.....	45
II.4 Diverses iridescences bactériennes.....	47
II.4.a Phénomène en transillumination	47
II.4.b Apparence métallique en épi-illumination	49
II.5 Caractéristiques communes	49
II.5.a Morphologie des colonies.....	49
II.5.b Morphologie cellulaire	50
II.5.c Virulence, encapsulation et composition antigénique	50
II.6 Conditions favorisant l'iridescence.....	51

II.6.a	Milieux de culture.....	51
II.6.b	Température et temps d'incubation.....	51
II.7	Hypothèses sur les structures iridescentes en transillumination.....	52
III.	Caractéristiques de <i>Cellulophaga lytica</i>	54
III.1	Systématique.....	54
III.1.a	Le phylum <i>Bacteroidetes</i>	55
III.1.b	La classe <i>Flavobacteriia</i> et l'ordre <i>Flavobacteriales</i>	55
III.1.c	La famille <i>Flavobacteriaceae</i>	56
III.1.d	Le genre <i>Cellulophaga</i>	57
III.1.e	L'espèce <i>Cellulophaga lytica</i>	59
III.2	Mentions d'iridescence de <i>C. lytica</i>	62
III.3	Motilité « gliding ».....	64

Matériels et méthodes 67

I.	Isolement de bactéries marines.....	69
I.1	Sites de collecte et échantillons prélevés.....	69
I.2	Méthode d'isolement.....	70
II.	Espèces bactériennes et culture.....	72
II.1	Souches.....	72
II.1.a	Souches utilisées dans la comparaison des iridescences bactériennes.....	72
II.1.b	Souches issues du phylum <i>Bacteroidetes</i>	72
II.1.c	Souches <i>Cellulophaga lytica</i>	73
II.2	Conditions de culture.....	73
II.2.a	Culture des bactéries marines.....	75
II.2.b	Culture des bactéries terrestres.....	76
II.2.c	Facteurs abiotiques testés.....	76
II.3	Coloration de Gram.....	78
III.	Analyses génétiques.....	79
III.1	Identification des souches.....	79
III.1.a	Extraction et amplification de l'ADN.....	79
III.1.b	Séquençage et analyse des données.....	80
III.1.c	Séquençage de la souche <i>C. lytica</i> CECT 8139.....	80
III.2	Etude de phylogénie.....	81
IV.	Observations de l'iridescence.....	81
IV.1	Méthode d'inoculation.....	81
IV.1.a	Inoculation en strie.....	81
IV.1.b	Test en gouttes.....	82
IV.2	Observations macroscopiques de l'iridescence bactérienne.....	82

IV.2.a	Observation en épi-illumination.....	83
IV.2.b	Observation en transillumination.....	83
IV.3	Observations microscopiques.....	85
IV.3.a	Observation des colonies.....	85
IV.3.b	Variations de l'angle d'illumination.....	85
IV.3.c	Rotation de la caméra ou de l'échantillon.....	86
V.	Observation de la motilité « gliding ».....	86
V.1	Motilité des colonies.....	86
V.2	Motilité cellulaire.....	87
VI.	Microscopie électronique à transmission (MET).....	87
VI.1	Préparation des colonies pour la MET.....	88
VI.1.a	Réactifs.....	88
VI.1.b	Etapas de préparation des échantillons.....	89
VI.2	Préparation de coupes semi-fines et ultra-fines.....	91
VI.2.a	Coupes semi-fines.....	91
VI.2.b	Coupes ultra-fines.....	91
VI.3	Observation des coupes.....	92
VII.	Analyses physico-optiques de l'iridescence.....	93
VIII.	Analyses statistiques des images.....	94
VIII.1	Analyse des images de microscopie.....	95
VIII.1.a	Méthodologie pour la détection des paillettes.....	95
VIII.1.b	Propriétés colorimétriques de l'iridescence.....	96
VIII.1.c	Taille des paillettes.....	97
VIII.2	Analyses des images de MET.....	99

Chapitre 1. Isolement d'une bactérie marine iridescente et comparaison des iridescences bactériennes 103

I.	Démarche scientifique.....	105
	<u>Article 1</u>	107
II.	Données supplémentaires de l'article.....	109
III.	Analyses complémentaires de l'étude.....	113
III.1	Autres vidéos du phénomène.....	113
III.2	Méthodes de culture différentes.....	114
III.2.a	Culture sur milieux noirs.....	114
III.2.b	Culture sur membrane.....	114
III.3	Test d'étalement de la colonie.....	114
III.4	Observations microscopiques.....	116

III.4.a	Variations de l'illumination sur différents milieux.....	116
III.4.b	Rotation de la caméra	116
IV.	Principaux résultats et discussion	118
V.	Perspectives de l'étude.....	120
Chapitre 2. Influence de facteurs abiotiques dans		
l'iridescence de <i>C. lytica</i>..... 121		
I.	Démarche scientifique.....	123
	<u>Article 2</u>	125
II.	Analyses complémentaires de l'étude.....	127
II.1	Influence du Calcium et du Magnésium.....	127
II.2	Effet du dessèchement extrême de la gélose	128
III.	Principaux résultats et discussion	129
IV.	Perspectives de l'étude.....	131
Chapitre 3. Iridescence des <i>Bacteroidetes</i> et lien avec la		
motilité « gliding »..... 133		
I.	Démarche scientifique.....	135
	<u>Article 3</u>	137
II.	Données supplémentaires de l'article	160
III.	Principaux résultats et discussion	161
IV.	Perspectives de l'étude.....	164
Chapitre 4. Isolement et distribution de bacteries marines		
iridescentes..... 167		
I.	Démarche scientifique.....	169
	<u>Article 4</u>	171
II.	Principaux résultats et discussion	192
III.	Perspectives de l'étude	196
Chapitre 5. Caractérisation des structures responsables de		
l'iridescence de <i>C. lytica</i>..... 197		
I.	Démarche scientifique.....	199
	<u>Article 5</u>	201
II.	Données complémentaires de l'étude	225

III. Principaux résultats et discussion	226
IV. Perspectives de l'étude.....	229
Conclusions et perspectives générales	231
Références.....	239
Annexes.....	263
Annexe 1. Caractéristiques des souches mentionnées iridescentes.....	265
Annexe 2. Systématique des souches de cette étude	267
Annexe 3. Souches marines iridescentes isolées.....	268
Annexe 4. Plan du CD	273
Remerciements.....	275

Liste des publications

Kientz Betty, Peter Vukusic, Stephen Luke & Eric Rosenfeld (2012) **Iridescence of a marine bacterium and classification of prokaryotic structural colors.** *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (7): 2092-2099. DOI:10.1128/AEM.07339-11.

Impact factor 2011: 3.829

Kientz Betty, Pauline Marié & Eric Rosenfeld (2012) **Effect of abiotic factors on the unique glitter-like iridescence of *Cellulophaga lytica*.** *FEMS Microbiology Letters* 333 (2): 101-108. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02614.x

Impact factor 2011: 2.044

Kientz Betty, Adrien Ducret, Stephen Luke, Peter Vukusic, Tâm Mignot & Eric Rosenfeld. **Glitter-like iridescence within the *Bacteroidetes* especially *Cellulophaga* spp.: optical properties and correlation with gliding motility.** *PLoS One* (soumis le 15 Septembre 2012, en révisions mineures)

Impact factor 2011: 4.092

Kientz Betty, Céline Lavergne, Hélène Agogué, Pauline Marié & Eric Rosenfeld. **Isolation and distribution of iridescent *Cellulophaga lytica* and further iridescent marine bacteria in the Charente Maritime coast.** *Systematic and Applied Microbiology* (soumis le 11 Septembre 2012).

Impact factor 2011: 3.366

Kientz Betty, Peter Vukusic, Stephen Luke, Renaud Peteri, Cyrille Beaudry, David Simon, Tristan Renault & Eric Rosenfeld. **Iridescent structures of a marine bacterium *Cellulophaga lytica*.** En écriture.

INTRODUCTION

Les procaryotes jouent un rôle essentiel dans le milieu marin car ils participent à la dégradation de la matière organique et pour certains à leur synthèse (cyanobactéries). Les bactéries marines se retrouvent tant à la base qu'au sommet de la chaîne trophique : elles sont responsables de la dégradation ultime de la matière organique et remettent en circulation des nutriments dans la mer (Pomeroy, 1974 ; Carlson & Ducklow, 1995 ; Azam, 1998 ; Williams, 2000). Ces microorganismes colonisent une grande majorité de biotopes marins et sont capables de s'adapter aux diverses conditions existantes dans ces niches écologiques (températures basses, forte pression, variation d'exposition à la lumière, salinité élevée et compétition). Pour leur survie, les bactéries marines développent de nombreuses activités d'intérêt. Elles présentent donc un fort potentiel biotechnologique dans la recherche de ressources exploitables et valorisables pour l'homme (de Nys & Steinberg, 2002 ; Kelecom, 2002 ; Wagner-Döbler et al, 2002 ; Kornprobst, 2005 ; Mayer et al, 2009). Les champs d'applications sont divers dans la pharmaceutique (molécules antibiotiques, antitumorales, anti-inflammatoires et probiotiques), la cosmétique (principes actifs hydratants, réparateurs ou apaisants), l'agroalimentaire (gélifiants, enrobages ou micro-encapsulations) et l'industrie (matériaux, colles, pigments, antifouling et solvants).

Une prospection de bactéries marines possédant des activités d'intérêt est à l'origine de cette étude. Au cours d'une collecte sur un estran rocheux de l'île d'Oléron, des colonies présentant une coloration singulière ont été observées sur une boîte de Pétri. Issues de la surface d'une anémone, *Actinia equina*, les colonies de cette souche présentaient une coloration verte éclatante avec un effet pailleté. L'observation de diverses couleurs était favorisée par un éclairage intense et oblique dans une pièce noire. Les colorations variaient selon l'orientation de la boîte de Pétri ou selon les angles d'illumination. Les processus de coloration des bactéries sont le plus souvent décrits comme étant de nature pigmentaire, fluorescente ou bioluminescente. De par son intensité, le phénomène ne ressemblait pas à de la pigmentation. Plusieurs couleurs étant visibles, il ne s'agissait pas non plus de fluorescence. A l'obscurité, aucune couleur n'était émise, le processus de bioluminescence fut donc écarté. L'effet optique était aussi intense que les ailes iridescentes de certains papillons et oiseaux, il fut donc le phénomène supposé pour les colonies de la bactérie marine isolée.

L'iridescence est un processus de coloration structurale également dénommé couleur physique. Ce phénomène est induit lorsque des rayons lumineux entrent en contact avec des structures périodiques et de tailles nanométriques. En fonction des propriétés de la structure, certaines longueurs d'ondes vont interférer constructivement et se renforcer, une couleur intense est alors perçue. Selon l'angle d'incidence de la lumière ou l'orientation de l'observateur sur les structures, différentes couleurs sont visualisées. Tout le spectre du visible peut être observé (Fox, 1976 ; Berthier, 2003 ; Valeur, 2005). Différents types de structures sont responsables de ces couleurs intenses : multicouches (interférences sans diffraction) ou structures à deux ou trois dimensions (interférences avec diffraction). L'iridescence est majoritairement observée chez les insectes (coléoptères et papillons) et les oiseaux (plumes de paon, cou des pigeons et oiseaux du paradis). Le phénomène est sporadiquement visible chez d'autres organismes : plantes, serpents, macroalgues, poissons, diatomées, etc (Land, 1972 ; Vukusic et al, 2001 ; Vukusic & Sambale, 2003 ; Doucet & Meadows, 2009). L'iridescence est souvent associée à des fonctions de communications inter- et intra-espèce. Toutefois des rôles non-communicatifs ont été mentionnés et correspondent par exemple à de la : thermorégulation, photoprotection, répulsion d'eau et rigidité mécanique (Meadows et al, 2009 ; Seago et al, 2009).

Ce processus de coloration a très vite été soupçonné pour les colonies de la bactérie marine isolée. L'analyse de la littérature a de plus suggéré qu'il pouvait s'agir d'un phénomène très singulier. Dans un premier temps, nous avons identifié la souche comme appartenant à l'espèce *Cellulophaga lytica* membre du phylum *Bacteroidetes* et de l'ordre des *Flavobacteriales*. Aucune étude n'a été consacrée à l'apparence particulière des colonies. Dès lors, dans ce travail de thèse, nous avons choisi de caractériser en profondeur l'iridescence de la souche. Afin d'étudier le phénomène, des analyses alliant divers domaines de compétences (microbiologie, physiologie, biologie moléculaire, écologie, mathématique et informatique, physique et optique) ont été menées. Cette étude étant inédite de nombreuses questions majeures se sont posées. Ces questions sont résumées sous la forme d'un schéma introductif (Figure 1). Nous avons souhaité caractériser le phénomène au niveau macroscopique et microscopique et le comparer aux souches décrites iridescentes dans la littérature. Les analyses essentielles à cette étude ont consisté à prouver l'iridescence par méthode physique et élucider les structures responsables du phénomène. Une étude écologique a été entreprise afin d'évaluer l'occurrence du phénomène dans le milieu marin.

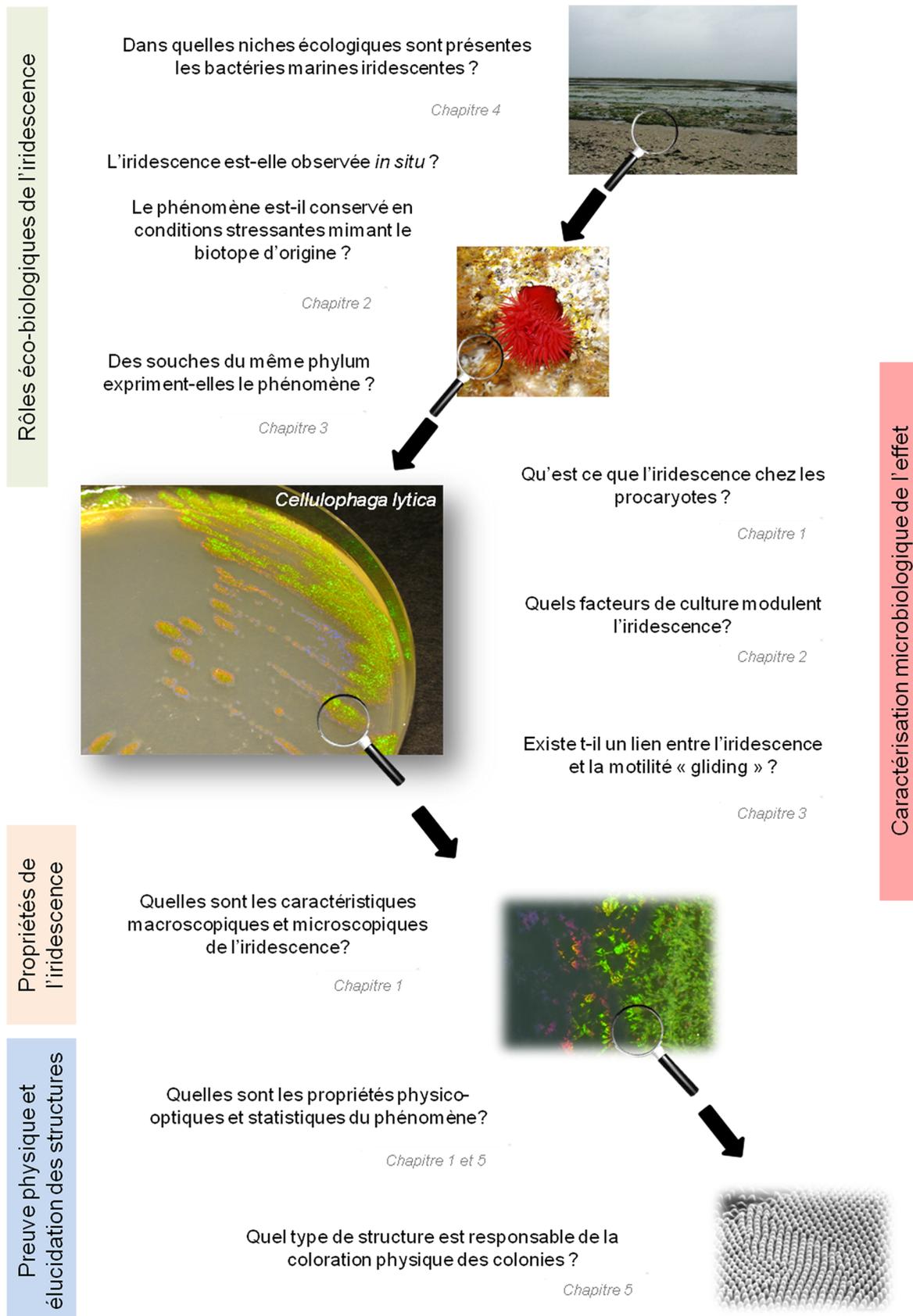


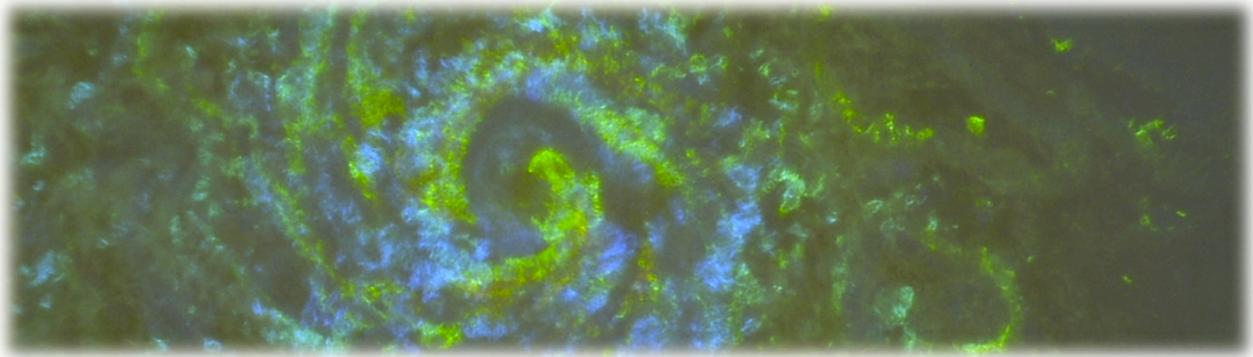
Figure 1. Questionnements sur l'étude de colonies iridescentes d'une bactérie marine.

Les expériences étant originales, des montages d'observation, de prise de photographies et de quantification ont été tout spécialement mis au point.

Le mémoire présenté s'organise de la façon suivante. Les données de la littérature sont renseignées dans la première partie « Etat des connaissances ». Cette partie volumineuse inclue pour la première fois une revue exhaustive de l'iridescence bactérienne. Par la suite, la totalité des informations relatives aux expérimentations menées est donnée dans la partie « Matériels et méthodes ». Ce mémoire s'articule ensuite autour des cinq articles publiés, soumis ou en écriture. Dans chaque chapitre, la démarche scientifique est décrite, puis l'article est inséré. Les données supplémentaires de l'article sont ensuite détaillées. Dans certains chapitres, des analyses complémentaires, non évoquées dans l'article, sont incorporées. Les résultats principaux sont discutés puis des perspectives de chaque étude sont proposées. Des conclusions et des perspectives générales finalisent ce manuscrit.

ETAT DES

CONNAISSANCES



I. Les colorations dans la nature

I.1 Lumière et couleurs

La lumière joue un rôle crucial dans la nature. Elle est indispensable à la majorité des processus de coloration et peut être décrite sous la forme d'une onde électromagnétique sinusoïdale. Une onde monochromatique est la plupart du temps caractérisée par sa longueur d'onde λ exprimée en mètres. Elle est reliée à la fréquence ν (exprimée en Hertz) par l'équation : $c = \lambda \times \nu$ (avec c la vitesse de l'onde en mètres par seconde). Dans ce manuscrit, pour plus de commodité, les longueurs d'ondes seront exprimées en nm.

La lumière blanche est polychromatique et composée de différentes longueurs d'ondes (Figure 2). Le domaine du visible regroupe les longueurs d'ondes perçues par les récepteurs rétiniens de l'œil, λ entre 400 nm et 800 nm. Plus précisément les couleurs associées sont : le violet (400 - 450 nm), l'indigo (450 - 470 nm), le bleu (470 - 500 nm), le vert (500 - 570 nm), le jaune (570 - 590 nm), l'orangé (590 - 620 nm) et le rouge (620 - 780 nm). Les infrarouges, les micro-ondes et les ondes radio sont des longueurs d'ondes plus grandes (> 780 nm). Les ultraviolets, les rayons X et les rayons gammas correspondent à des longueurs d'ondes plus petites (< 400 nm) (Valeur, 2005).

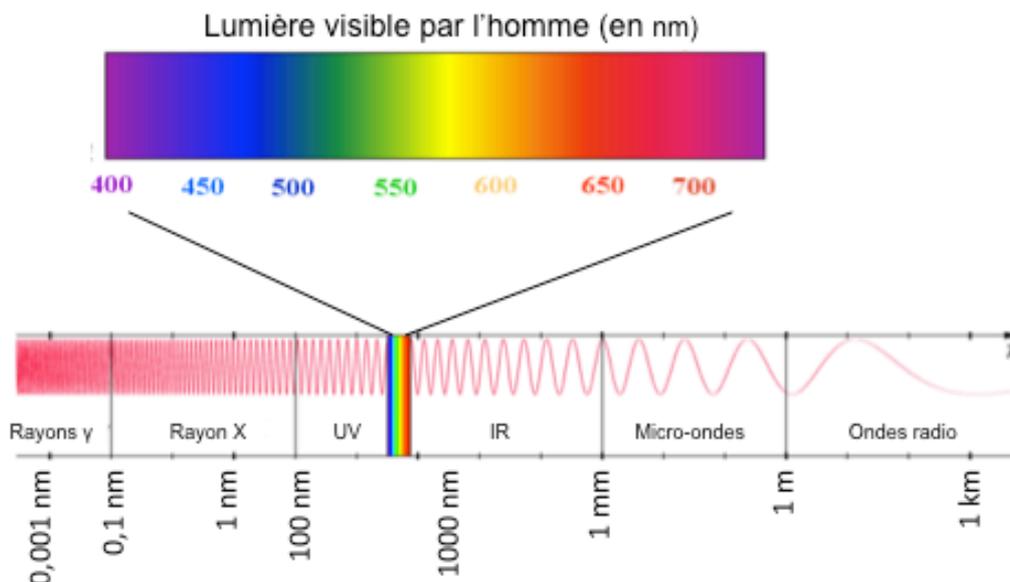


Figure 2. Spectre de la lumière et les différentes ondes qui la compose.

Différents phénomènes de colorations de source primaire ou secondaire existent dans la nature (Tableau 1). Deux phénomènes primaires induisent une coloration. Parmi ceux-ci, l'incandescence est caractérisée par l'émission de lumière d'un corps soumis à de très fortes températures (lumière de bougie, soleil et résistance électrique). La couleur dépend de la température : lumière rouge-jaune (1600 °C), lumière blanche (5000 °C) et lumière bleutée (8000 °C). La luminescence est la propriété de certains corps d'émettre des photons sans changement de température. Selon l'origine du phénomène, on distingue la photoluminescence (lampes fluorescentes), l'électroluminescence (diodes électroluminescentes), la chimioluminescence (bâtons lumineux) et la bioluminescence (lucioles). Les couleurs peuvent également provenir d'une source secondaire précédemment éclairée. On distingue les couleurs chimiques réalisées par des molécules (pigmentation et colorants) ou par une réaction biochimique (fluorescence et phosphorescence) et les couleurs physiques du à des structures particulières (réfraction, diffusion, interférences sans diffraction et interférences avec diffraction). Les phénomènes peuvent s'associer pour donner une coloration physico-chimique.

Tableau 1. Les différents processus de colorations (extrait de Valeur, 2005).

Origine de l'émission de lumière	Phénomène responsable de la couleur	Exemple
Source primaire	Incandescence	Lumière de bougie, soleil, résistance électrique
	Luminescence	Lampes et tubes fluorescents
	Photoluminescence	Diodes électroluminescentes
	Electroluminescence	Bâtons lumineux
	Chimioluminescence	Lucioles, méduses
	Bioluminescence	
Source secondaire (substance ou objet éclairés)	<u>Causes chimiques :</u>	
	Absorption	Pigments, colorants
	Absorption suivie d'émission	Objets fluorescent et phosphorescent
	<u>Causes physiques :</u>	
	Réfraction	Dispersion par un prisme
	Diffusion	Bleu du ciel, fumée de cigarette
Interférences sans diffraction	Bulles de savon, nacre, film d'huile sur l'eau	
Interférences avec diffraction	Ailes de certains papillons, CD	

I.2 Les colorations chimiques et biochimiques

Lorsqu'une molécule absorbe de l'énergie ses électrons peuvent passer dans des niveaux d'énergie supérieurs, elle est dite excitée. L'excitation de molécules entraîne des phénomènes de vibration et de rotation. Dans le cas d'une relaxation non radiative on parle de **pigmentation**, les molécules vont absorber certaines longueurs d'onde. D'autres molécules sont capables d'émettre un photon lorsqu'elles se désexcitent, on parle de **fluorescence**. Pour certaines, le retour à l'état fondamental par émission de photon est plus lent à s'effectuer et correspond à de la **phosphorescence**. L'émission de lumière dure même après l'excitation.

Lors de la description des couleurs exprimées par des organismes, les processus de coloration sont parfois confondus, en particulier la fluorescence et la bioluminescence. Comme nous allons le décrire ensuite, des termes ambigus ou non adaptés sont quelques fois employés et rendent impossible la compréhension du phénomène. Il est donc primordial de se renseigner auprès de plusieurs sources documentaires lorsque l'on recherche des informations sur le processus de coloration d'un organisme. C'est ainsi qu'après la recherche d'organismes phosphorescents dans la littérature scientifique, il est impossible de déterminer de façon certaine si le phénomène est observé chez des organismes vivants. En effet, les seuls articles évoquant la phosphorescence d'organismes marins ou terrestres sont très anciens et semblent se référer à de la bioluminescence (Watasé, 1896 ; Nutting, 1899 ; Moore, 1909 ; Wheeler, 1916). Les minéraux seraient donc les seuls à posséder cette propriété.

I.2.a La pigmentation

Les couleurs pigmentaires ont pour principe l'absorption de certaines longueurs d'ondes par des molécules, appelées pigments. Les longueurs d'ondes non absorbées donnent la couleur visible. Par exemple, les pics d'absorption de la chlorophylle *b* sont à 460 nm (bleu) et à 647 nm (rouge), nous percevons alors le vert non absorbé. L'objet est gris-noir si toutes les couleurs sont absorbées et blanc si inversement aucune longueur d'onde n'est absorbée. Les chromophores sont les structures caractéristiques des pigments, responsables de l'absorption de la lumière, ils possèdent des doubles liaisons conjuguées (alternance de simples et doubles liaisons). S'ajoute à cela des groupes fonctionnels, les auxochromes (groupements aromatiques, atomes d'oxygène et d'azote dans le cycle aromatique,...). Ils sont capables de modifier le maximum d'absorption (Hari et al, 1994).

La majorité des organismes possèdent des pigments. Ces molécules sont contenues dans les tissus (téguments, poils, plumes et écailles). Les différentes familles de pigments sont les caroténoïdes, les mélanines, les flavonoïdes, les quinones et les ptérines. Les mélanines sont responsables de la plupart des couleurs des poils des mammifères. Les caroténoïdes sont eux spécifiques au règne végétal mais peuvent être intégrés après ingestion dans les tissus d'organismes. L'un des rôles de la pigmentation est une protection face aux rayons lumineux dangereux (UVs). L'énergie des rayonnements UV est croissante selon l'ordre suivant : UVA (400 - 315 nm), UVB (315 - 280 nm) et UVC (280 - 100 nm). Il est admis que tous les UVs sont dangereux par des dommages directs de l'ADN (UVC et UVB) ou indirects lors de la libération de radicaux libres et de dérivés réactifs de l'oxygène (UVA). Par ailleurs, les espèces non-pigmentées sont souvent associées à des environnements sans lumière. La pigmentation peut également avoir une fonction de communication intra- et extra-spécifique.

I.2.b La fluorescence

Lors de l'absorption de lumière incidente, la fluorescence induit une réémission de l'énergie acquise sous forme de lumière. Les photons réémis possédant une énergie différente, la longueur d'onde émise n'est pas la même que celle absorbée, la couleur est différente. Les molécules fluorescentes ne produisent donc pas leur propre lumière, elles absorbent les photons, contrairement à la bioluminescence (voir ci-après). Appelées fluorophores, les molécules impliquées sont des composés aromatiques possédant au minimum un noyau phénolique. L'augmentation du nombre de groupement aromatique déplace le spectre d'absorption et d'émission. Les substituants des cycles modifient également les caractéristiques de fluorescence. Certains fluorophores absorbent dans l'UV, la fluorescence réémise est alors plus facile à observer sous lampe UV.

Dans la nature, certains organismes émettent de la fluorescence : les champignons, fruits (banane contenant de la quinine), arthropodes (scorpions), papillons, ours polaire, coraux et méduses. De nombreux minéraux sont fluorescents. L'une des molécules fluorescentes très connue est la protéine GFP (green fluorescent protein) extraite d'une méduse *Aequorea victoria* ; qui absorbe principalement à 395 nm et réémet à 509 nm (vert) (Yang et al, 1996 ; Youvan & Michel-Beyerle, 1996). Elle est employée dans de nombreuses expériences de microscopie.

Plusieurs fonctions biologiques sont attribuées aux molécules fluorescentes, mais encore peu d'études existent dans ce domaine (Alieva et al, 2008 ; Schnitzler et al, 2008). Elles permettraient une photoprotection des algues symbiotiques chez certains coraux fluorescents (Kawaguti, 1944 ; Salih et al, 2000) ou encore l'identification des espèces de coraux par certains poissons (Matz et al, 1999 ; 2006).

I.2.c La bioluminescence

A la différence de la pigmentation et de la fluorescence, ce procédé de coloration ne nécessite pas d'illumination. La luminescence par les organismes, bioluminescence, consiste à l'émission de photons lors de la désactivation d'une molécule excitée vers un état énergétique moins élevé. Elle est réalisée lors d'une réaction biochimique d'oxydo-réduction. La luciférase, une enzyme, catalyse la réaction d'oxydation de la Flavine mononucleotide réduite (FMNH₂) et d'un aldéhyde (RCHO) (complexe appelé luciférine) par de l'oxygène moléculaire, produisant une lumière bleue verte (Hasting, 1983 ; 1996) (Figure 3).



Figure 3. Réaction chimique à l'origine de la bioluminescence.

Ce procédé de production de lumière est rencontré chez divers organismes (Bautz, 2005 ; Lee, 2008). La plupart sont marins, mais il existe également des organismes terrestres (Widder, 2010). On recense plus de 700 espèces bioluminescentes : bactéries, protozoaires, cnidaires (méduses), champignons, coléoptères (lucioles), annélides, mollusques (calamars), arthropodes (crustacés planctoniques), ophiures et tuniciers. Les organes lumineux sont de deux types, le premier comprend des cellules glandulaires spécialisées qui permettent une luminescence extracellulaire ou intracellulaire. Dans un deuxième cas, la lumière est produite par des bactéries symbiotiques. Les rôles de la bioluminescence sont l'attraction des proies, la protection contre les prédateurs et les communications inter et intra-espèces (Morin, 1983 ; Young, 1983). Dans les profondeurs des océans, ce processus de coloration est très courant, il permet de communiquer dans un milieu sans lumière (Haddock et al, 2010).

I.2.d Couleurs chimiques et biochimiques des bactéries

Pigmentation

Chez les bactéries, de nombreuses couleurs pigmentaires sont observées lors d'isolement de colonies. Les pigments bactériens synthétisés dans la paroi cellulaire ou l'espace périplasmique sont les : pyrroles, phénazines, caroténoïdes, xanthophylles, quinines et les dérivés quinone. Une étude portant sur la présence de bactéries hétérotrophiques pigmentées en milieu marin a mis en évidence leur présence particulière au plus près des eaux de surface exposées à l'éclairement, avec une décroissance liée à la profondeur de l'eau. Dans cette étude les souches pigmentées appartenaient aux classes : *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Flavobacteria* et *Sphingobacteria*. Ces bactéries seraient donc influencées par les conditions environnementales telles la lumière ou les nutriments (Du et al, 2006). Les extrémophiles présentent souvent une pigmentation (Liu & Nizet, 2009).

Différents rôles des pigments bactériens sont avancés (Moss, 2002 ; Giraud & Verméglio, 2008 ; Losi & Gärtner, 2008 ; Maresca et al, 2008 ; Soliev et al, 2011). Par exemple, les caroténoïdes auraient un rôle protecteur contre les effets de la lumière et de l'oxydation par des radicaux libres (Vershinin, 1999). Les fonctions pigmentaires décrites sont par exemple :

- Protection contre les rayons UVs
- Protection contre les oxydants
- Activité antimicrobienne
- Acquisition de nutriments tel le fer
- Acquisition d'énergie par photosynthèse (bactéριοchlorophylle)

Bioluminescence

Les bactéries bioluminescentes ont un mode de vie libre ou associé (Hendrie et al, 1970 ; Nealson, 1978 ; Meighen, 1991 ; Nishiguchi et al, 1998 ; Haddock et al, 2010). Certaines sont commensales et vivent dans le tubes digestif de poissons et invertébrés (*Photobacterium sp.* et *Vibrio sp.*) ou sur la surface externe d'animaux marins comme des crustacés (*P. fischeri*, *P. phosphoreum* et *V. harvey*) ou encore d'animaux terrestres et d'eau douce (Reichelt & Baumann, 1973 ; Ruby & Nealson, 1976 ; Wei & Young, 1989). D'autres sont localisées dans des organes lumineux symbiontes (poissons pêcheurs et calamars). Dans certains cas les

bactéries bioluminescentes symbiotiques sont spécifiques comme c'est le cas de *Xenorhabdus luminescens* et un nématode. Dans toutes les symbioses, les bactéries prolifèrent en culture pure dans des tubes glandulaires qui sécrètent un milieu de culture. Les bactéries expriment une luminescence lorsqu'un seuil de densité de population a été atteint, par des mécanismes de *quorum sensing* (Bassler, 2002 ; Waters & Bassler, 2005 ; Nealson & Hastings, 2006). Les bactéries bioluminescentes sont communes dans les océans en particulier dans les eaux tempérés et chaudes (Dunlap & Kita-Tsukamoto, 2006).

Fluorescence

Parmi les espèces bactériennes capables de produire des substances fluorescentes, *Pseudomonas fluorescens* est l'une des plus connues (Georgia & Poe, 1931 ; Seleen & Starck, 1943). Les molécules fluorescentes sont des peptides complexes (sidérophores) telles les pyoverdines et pseudobactines. Elles ont la capacité de chélater le fer présent dans l'environnement (Meyer & Abdallah, 1978 ; Meyer, 2000 ; Cornelis & Matthijs, 2002). La structure de la pyoverdine est complexe, plusieurs groupements aromatiques la composent, elle absorbe à environ 400 nm et émet à 460 nm (bleu).

I.3 Les processus de coloration physique

I.3.a Nature des phénomènes

Le principe des couleurs physiques, appelées également couleurs structurales, repose sur l'interférence constructive de certaines longueurs d'onde et englobent différents phénomènes : la diffusion (bleu du ciel), les interférences sans diffraction (bulles de savon) et les interférences avec diffraction (surface d'un CD) (Tableau 1). Ces deux derniers processus intègrent une régularité de leurs structures. L'iridescence est définie lors d'un changement de coloration selon l'angle d'observation ou d'illumination. L'indice de réfraction et le coefficient d'absorption des milieux sont des paramètres importants. La réfraction (dispersion par un prisme) est également une couleur physique sans être directement liée à une structure.

La réfraction

Lorsqu'un faisceau lumineux change de milieu, il est dévié car sa vitesse varie. Dans le cas d'un prisme, chaque longueur d'onde composant la lumière blanche est déviée d'un angle fonction de cette même longueur d'onde (Figure 4). Une onde polychromatique peut ainsi être

décomposée en une succession d'ondes monochromatiques. Dans ce cas, les différentes couleurs du spectre lumineux sont alors visibles. Généralement l'indice de réfraction augmente quand la longueur d'onde diminue, les violets sont donc plus déviés que les rouges. Le phénomène de réfraction est également observé lors de la formation d'un arc-en-ciel. Les rayons lumineux subissent une réfraction, une réflexion à l'arrière, puis une seconde réfraction par des gouttes d'eau.



Figure 4. Décomposition de la lumière blanche à travers un prisme.

La diffusion

La diffusion est le phénomène par lequel un rayonnement est dévié dans de multiples directions par une interaction avec des objets. La diffusion Rayleigh intervient lorsque la taille des particules est très petite, inférieure à $\lambda/10$. C'est par ce processus que les molécules de dioxygène et de diazote de l'atmosphère terrestre provoquent la couleur du ciel et des couchers de soleil. La diffusion Rayleigh explique également les reflets bleutés de la neige et de la fumée. Lorsque la taille des particules est supérieure on parle de diffusion de Mie. Certaines couleurs comme par exemple le bleu de plumes d'oiseaux proviennent de la diffusion de microgranules de mélanines dans les barbes (ramification latérales) de leurs plumes (Shawkey et al, 2003) (Figure 5).



Figure 5. Couleur bleue générée par diffusion dans les plumes de *Sialia sialis*.

Interférences sans diffraction

Ce processus de coloration induit des couleurs interférentielles par des couches dont les indices de réfraction sont différents. Cette différence est essentielle mais peut être de seulement 0.2 à 0.5 (Parker, 1994). Les ondes vont interférer de manière constructive (Figure 6A). Le principe de ce phénomène peut être expliqué pour une monocouche (Figure 6B). Une onde arrivant sur la surface d'une lame à face parallèle y pénètre (réfraction) et une petite partie est réfléchiée. L'onde qui a pénétré subit le même phénomène sur la face arrière, elle est essentiellement transmise, mais également réfléchiée. L'onde réfléchiée subit alors à son tour une réfraction et une réflexion par la face avant. La partie transmise par cette face et la première onde réfléchiée sont d'intensités similaires et vont interférer. L'intensité des couleurs est relativement faible pour une seule couche. Pour des couches empilées, l'intensité s'élève (Figure 6C). Les dimensions associées sont de l'ordre de la longueur d'onde. Par exemple pour une couche de 480 nm d'épaisseur, une couleur bleue sera observée. C'est pour cela que diverses couleurs sont visibles selon l'orientation de la lumière ou de l'observation. Ce phénomène est responsable des irisations d'une bulle de savon, des bandes métallisées des billets de banques, de la couleur de la nacre ou de celle de certains insectes.

Interférences avec diffraction

Dans ce processus la lumière va interférer de manière constructive (Figure 6A) avec des éléments périodiques diffractant. Leur dimension doit être de l'ordre de la longueur d'onde. Le phénomène de diffraction de la lumière par des ouvertures et des objets génère de la couleur à partir de lumière blanche. L'exemple simple est l'éclairage d'un écran avec une fine fente de dimension équivalente aux longueurs d'ondes dans le visible (entre 750 nm et 400 nm). La tache lumineuse qui apparaît sur un autre écran (placé derrière le premier) est colorée, des franges irisées sont visibles de part et d'autres de la tache centrale (Figure 6D). Dans le cas où deux fentes voisines, parallèles et identiques sont éclairées, elles vont engendrer chacune d'elles une image de diffraction comme précédemment. Chaque fente se comporte comme une source secondaire et les ondes issues des deux fentes interfèrent. En effet, pour une longueur d'onde donnée, et selon la direction, certaines de ces ondes sont en phase, elles créent des interférences constructives et se renforcent. D'autres sont en opposition de phase et s'annihilent (interférences destructives) (Figure 6A). La diffraction de la lumière peut être réalisée par un réseau plan constitué de plusieurs fentes fines, parallèles, équidistantes et identiques ; tel une grille de diffraction. Dans le cas d'un réseau par transmission, la lumière va passer à travers le réseau et être diffractée par la suite (Figure 6E).

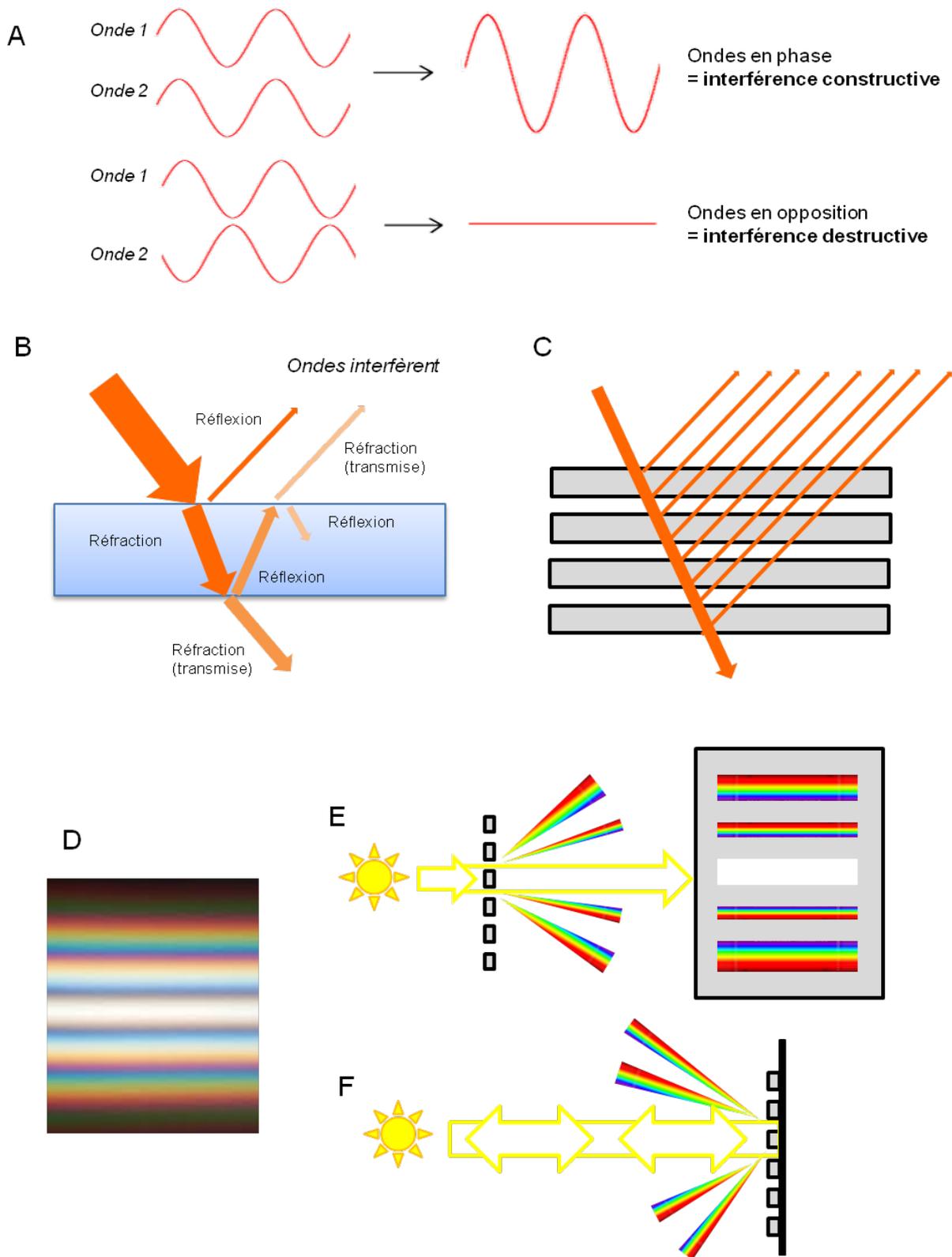


Figure 6. Principes des colorations par interférences avec ou sans diffraction. Interférences constructive et destructive de deux ondes (A), devenir d'une onde sur une surface monocouche (B) et multicouche (C). Visualisation sur un écran de la diffraction de la lumière par une fente (D), principe d'un réseau de diffraction en transmission (E) et en réflexion (F).

Le réseau éclairé peut conduire à la formation de plusieurs spectres de la lumière. Dans le cas de fentes sur un matériel réfléchissant (un réseau par réflexion), les ondes vont donner lieu à des interférences constructives dans certaines directions, cette fois ci, vers la source lumineuse (Figure 6F). Les réseaux de diffractions sont observés dans la nature chez des coléoptères, papillons et oiseaux.

I.3.b Termes descriptifs des couleurs structurales

Lorsqu'une couleur structurale est évoquée, différents termes scientifiques ou usuels, sont employés pour la décrire. L'« iridescence » est un terme bien défini dans les ouvrages en anglais et quelques travaux français. L'étymologie du terme « iridescence » correspond au mot grec *iris* qui signifie arc-en-ciel en référence à une déesse grecque (Barnhart & Steinmetz, 1988 ; Vigneron & Simonis, 2010). Il est cependant souvent remplacé par « irisation » lors de la vulgarisation de l'effet. Divers termes ambigus sont quelques fois employés. Nous nous sommes servis du référencement du Centre national de ressources textuelles et lexicales (portail de ressources linguistiques créé par le CNRS) afin de reprendre les termes les plus rencontrés : irisation, iridescence, chatoyance, opalescence (relatif à l'opale, Figure 7), brillance et lustre (Tableau 2). Nous avons choisi dans cette étude de conserver le terme « iridescence » pour décrire les couleurs structurales car il est le plus employé dans les ouvrages scientifiques même si sa définition manque de précisions dans la langue française.

Tableau 2. Termes descriptifs des couleurs structurales et leurs définitions selon le Centre national de ressources textuelles et lexicales (<http://www.cnrtl.fr>).

Irisé	Qui a les couleurs de l'arc-en-ciel, qui brille de reflets colorés.
Irisation	1) Propriété optique que possèdent certains corps de décomposer la lumière en produisant à leur surface diverses couleurs du spectre lumineux. 2) Manifestation de ce phénomène qui se présente sous la forme de reflets aux couleurs de l'arc-en-ciel apparaissant sur la surface de certains corps.
Iridescent	Qui brille avec des reflets irisés.
Chatoyant	Briller tout en changeant de couleur selon les jeux de la lumière.
Opalescence	Aspect, teinte laiteuse, reflets irisés, rappelant ceux de l'opale.
Brillant	Qui répand une lumière vive, intense, parfois diffuse, par rayonnement ou par réflexion
Lustre	Éclat, naturel ou artificiel, de ce qui est brillant ou poli.

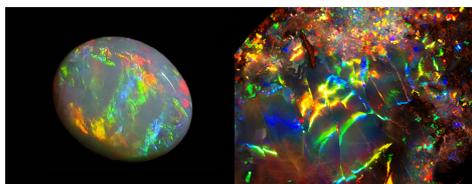
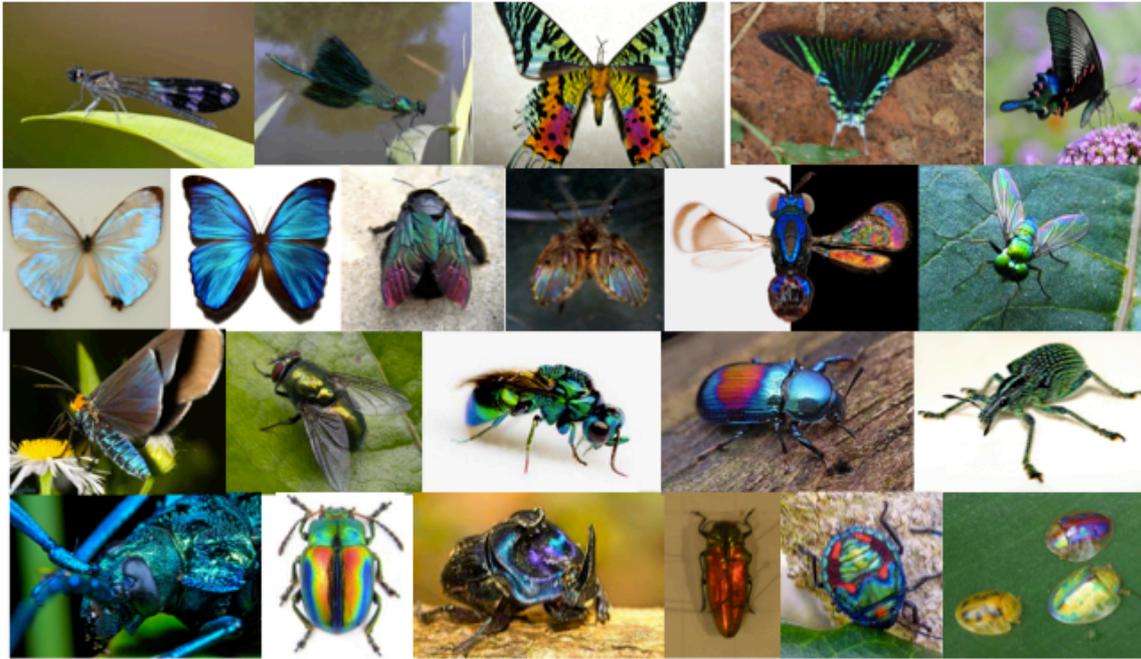


Figure 7. Pierre d'opale avec des reflets irisés.

Insectes



Oiseaux



Divers organismes



Organismes marins



Figure 8. Organismes iridescents (ressources internet diverses).

I.3.c Iridescence dans la nature

Moins communes que la pigmentation, les couleurs structurales sont toutefois exprimées par divers organismes. L'iridescence peut être exprimée sur différentes parties des êtres vivants, les couleurs et intensités sont également très diverses (Figure 8). De nombreux insectes présentent ces colorations en particulier les papillons (Vukusic et al, 1999 ; Berthier, 2003 ; 2010 ; Bosi et al, 2008) et les coléoptères (Parker, 1998 ; Vukusic et al, 2001 ; 2004 ; Seago et al, 2009), ainsi que des oiseaux (Greenewalt et al, 1960 ; Doucet et al, 2006 ; Yin et al, 2006). De façon plus sporadique, l'iridescence est observée sur des fruits et des plantes (Lee, 1991 ; Lee et al, 2000 ; Vigneron et al, 2005 ; Glover & Whitney, 2010), des serpents (Gans & Baic, 1977 ; Gower, 2003), des amphibiens (Kobelt & Linsenmair, 1992) et des organismes marins (détaillé dans la partie I.5, page 35). L'iridescence de virus est de plus rapportée, leur accumulation dans les tissus d'insectes ou d'invertébrés ou leur symétrie hélicoïdale seraient responsables d'une couleur bleutée (Manyakov, 1977 ; Williams, 1996 ; 1998). Les seuls mammifères iridescents, une famille de taupe, fut très récemment caractérisés (Snyder et al, 2012). Les couleurs structurales ont été conservées tout au long de l'évolution. Le premier spécimen iridescent, un fossile de plume, est estimé à 500 millions d'années (Parker, 2000).

I.3.d Les types de structures iridescentes

Différentes structures interfèrent avec la lumière (Tableau 3, Figure 9). Les structures en multicouches induisent des interférences sans diffraction. Ces multicouches sont périodiques dans une dimension, représentée par l'épaisseur des couches. Elles correspondent aux structures les plus répandues dans la nature. Les interférences avec diffraction sont créées par des structures à deux ou trois dimensions, appelés également cristaux photoniques (Vukusic & Sambles 2003 ; Vukusic, 2004 ; Vigneron & Simonis, 2010) (Figure 9). Les structures à deux dimensions sont les moins communes. Des exemples de structures iridescentes retrouvées chez divers organismes sont illustrés dans la Figure 10.

Tableau 3. Différents types de structures iridescentes retrouvées dans la nature.

Propriétés optiques	Type de structure		Exemples d'organismes
Interférences sans diffraction	Multicouches	1D	Insectes (papillons et coléoptères), oiseaux, plantes, amphibiens, macroalgues, crabes et céphalopodes
Interférences avec diffraction	Fibres	2D	Vers marins et oiseaux
	Structures complexes	3D	Coléoptère et papillons

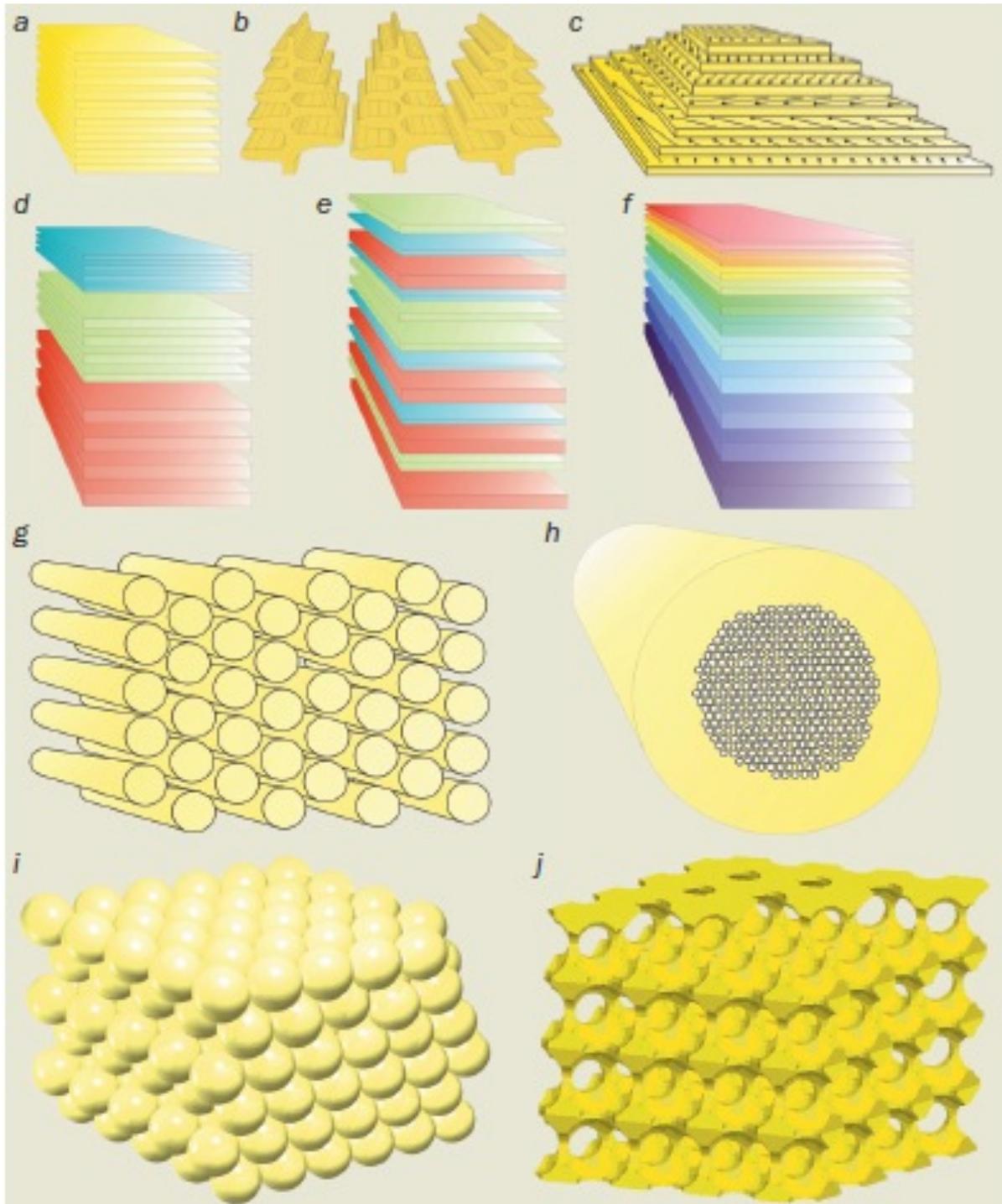


Figure 9. Structures impliquées dans l'iridescence d'organismes (Vukusic, 2004). Les interférences sans diffraction sont créées par des multicouches simples (a) ou en forme d'écaille (b). Les fibres constituant les couches peuvent être orientées (c). Lorsque trois multicouches de diffraction différentes sont empilées on peut visualiser une coloration dorée ou argentée (d). Les couches d'épaisseurs différentes peuvent également être arrangées de manière aléatoire (e) ou croissante (f). Les interférences avec diffraction impliquent des structures à deux dimensions composées de bâtonnets entourés d'air ou de liquide de faible indice de réfraction (g). Certaines soies de vers marins possèdent des cylindres vides (h). Les structures 3D comprennent des sphères compactées (i) ou des mailles avec des espaces vides (j). Illustration reproduite avec l'autorisation du Pr Peter Vukusic.

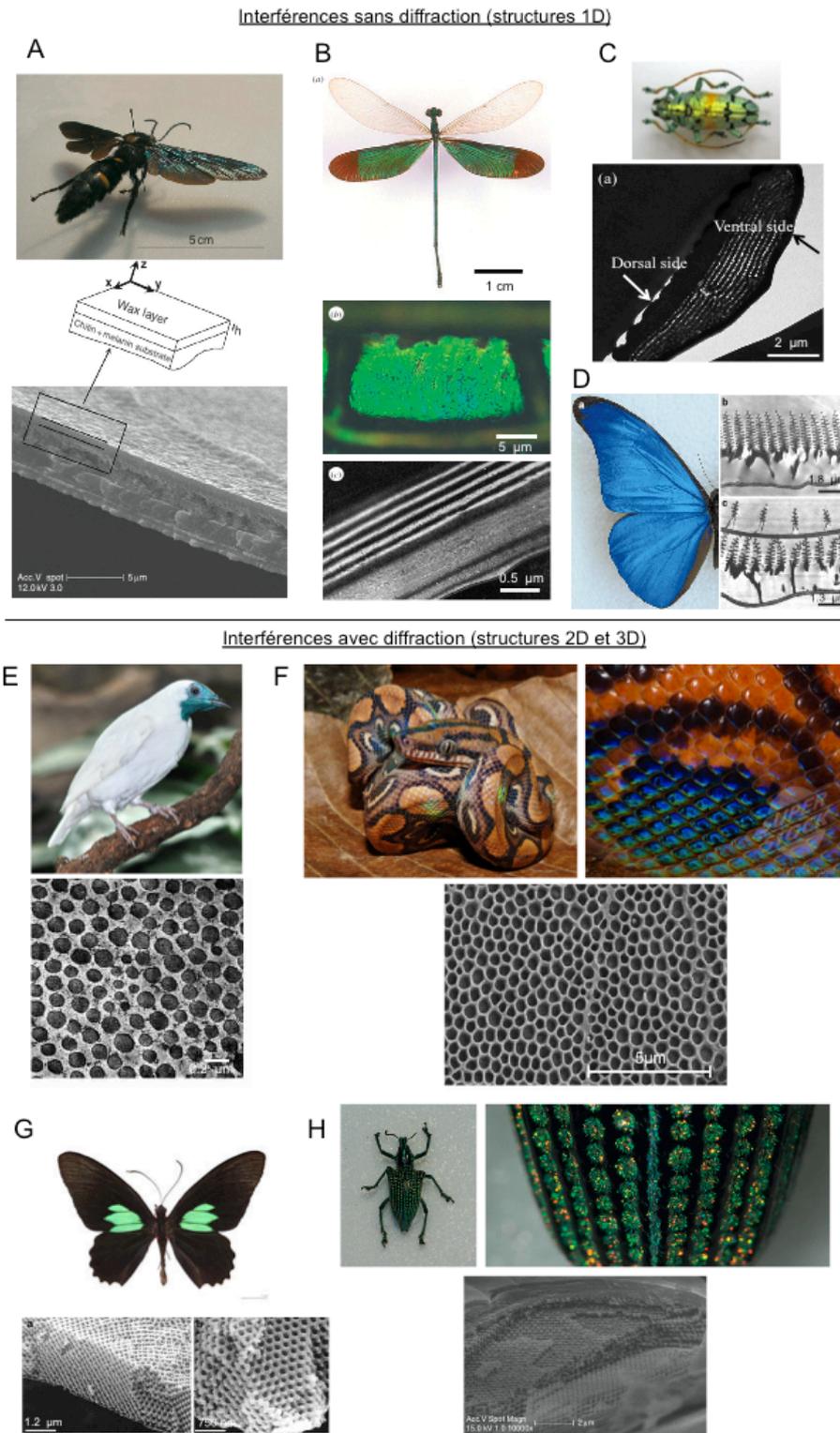


Figure 10. Exemples de structures iridescentes dans la nature. Interférences sans diffraction : (A) structure monocouche des ailes de la guêpe *Megascolia procer javanensis* en MEB (Sarrazin et al, 2008), (B) multicouches d'ailes de la libellule *Neurobasis chinensis* en MET (Vukusic et al, 2004), (C) multicouches de la cuticule d'un coléoptère *Tmesisternus isabellae* en MET (Liu et al, 2009), (D) structure particulière des multicouches d'ailes de *Morpho rhetenor* en MET (Vukusic et al, 1999). Interférences avec diffraction comprenant des structures en 2D : (E) fibre de collagènes du cou de *Procnias nudicollis* en MET (Prum & Torres, 2003) ; (F) micro-ornementations de la peau du serpent *Corallus hortulanus* en MEB (Berthé et al, 2009). Structures en 3D : en MEB du papillon *Parides sesotris* (Vukusic & Sambles, 2003) (G) et de la cuticule du charançon *Entimus imperiales* (Vigneron & Simonis, 2010) (H).

I.4 Rôles associés à l'iridescence

I.4.a Fonctions communicatives

L'iridescence des organismes induit une couleur intense qui peut varier selon les angles d'orientation permettant à l'organisme de révéler ou non certaines couleurs selon le moment choisi. Les fonctions de communications intra-spécifiques et inter-spécifiques ont rapidement été décrites pour les couleurs structurales (Parker, 1998 ; Berthier, 2003 ; Doucet & Meadows, 2009 ; Meadows et al, 2009 ; Seago, 2009 ; Whitney et al, 2009) :

- Communications intra-spécifiques : reconnaissance des individus d'une même espèce, attirance sexuelle, sélection du partenaire, indication de maturité, compétition avec d'autres individus du même sexe, orientation de groupe et coordination des mouvements.

- Communications inter-spécifiques : camouflage, protection contre un prédateur, aide au mimétisme et au camouflage dans l'environnement, dissuasion en produisant des flashes et prévention avec des couleurs signifiant un danger (toxicité).

I.4.b Fonctions non-communicatives

Plus récemment des fonctions non-communicatives ont pu être mises en évidence (Doucet & Meadows, 2009). Ces fonctions biologiques résultent des deux propriétés des structures iridescentes : les interférences avec la lumière et les propriétés propres d'une structuration périodique. Les structures iridescentes ayant la capacité d'interférer avec les rayonnements de la lumière incidente, elles peuvent contrôler la pénétration de certaines longueurs d'onde ou au contraire en sélectionner d'autres. Ainsi des rôles de photoprotection, de photoréception et de thermorégulation sont recensés. Par la périodicité des structures, des fonctions de réduction des frictions, répulsion d'eau ou de rigidité mécanique sont avancées. Ces fonctions non-communicatives ont été soupçonnées car certains organismes iridescents avaient les mêmes microhabitats. En effet, des niches écologiques semblables sont par exemple identifiées chez des organismes iridescents fouisseurs (certains coléoptères, serpents) issus d'environnements boueux et visqueux.

Thermorégulation

Ce rôle attribué aux structures iridescentes est encore controversé car différents auteurs aboutissent à des raisonnements opposés. Le processus de thermorégulation proviendrait d'une absorption ou d'une dispersion des infrarouges. Selon certains travaux chez les papillons, les structures iridescentes diminueraient l'absorption des radiations solaires (Kobelt & Linsenmair 1992 ; Koon & Crawford, 2000 ; Biró et al, 2003). D'autres suggèrent que les espaces d'air entre les structures sont des collecteurs de chaleur et donc que l'iridescence sert au réchauffement des ailes (Heilman & Miaoulis, 1994; Miaoulis & Heilman, 1998 ; Tada et al, 1998). L'iridescence d'un amphibien issu d'un milieu désertique chaud a pour rôle la réflexion de radiations solaires. En période de sécheresse, sous l'effet de la déshydratation de la peau, l'iridescence est plus intense et lui confère une diffraction des rayons du soleil adaptée aux conditions d'illumination (Kobelt & Linsenmair 1992). Cette adaptation est également décrite chez un coléoptère (Hinton & Jarman, 1972 ; Rassart et al, 2008).

Photoprotection ou photoreception

Comme dans le cas de la thermorégulation, la réflexion d'ondes lumineuses ou leur absorption restent controversés, en particulier chez les papillons (Miaoulis & Heilman, 1998, Koon & Crawford 2000). Certains auteurs décrivent des rôles de photoprotection des structures iridescentes, d'autre des rôles de capteur solaire. Chez la plante *Selaginella willdenovii* qui possède des multicouches, un pouvoir de réflexion vers les chloroplastes est évoqué. Les longueurs d'onde photosynthétiques sont absorbées alors que celles moins actives sont réfléchies (Lee & Lowry, 1975). Cependant, cette hypothèse fut ensuite réfutée (Thomas et al, 2010). Certains poissons et céphalopodes utilisent l'iridescence de leurs pupilles pour limiter la quantité de radiations entrant dans l'œil (Froesch & Messenger, 1978 ; Lythgoe et al, 1989 ; Douglas & Marshall, 1999 ; Siebeck et al, 2003 ; Mäthger et al, 2009).

Réduction des frictions

Cette fonction est en particulier décrite pour les organismes fouisseurs. L'iridescence des serpents est créée par les micro-ornements de leurs écailles (Gower, 2003). La peau de ces serpents apparaît souvent propre alors que leur biotope correspond à des sols humides, visqueux et boueux. Les structures des écailles sont une adaptation pour réduire les frictions et faciliter le déplacement. Elles permettent d'éliminer les saletés fixées à la peau par des propriétés mécanique et hydrophobe qui ralentissent la progression de l'animal (Stewart & Daniel, 1972 ; 1975 ; Gans & Baic, 1977 ; Gower, 2003). Les structures iridescentes ont donc

une propriété antisalissure (McCarthy, 1987). Certains coléoptères vivant sous des écorces en milieu humide sont également iridescents et utilisent cette caractéristique afin de réduire les frictions (Crowson, 1981 ; Vulinec, 1997 ; Seago et al, 2009). Pour les crustacés fouisseurs, les structures iridescentes suggèrent une aide au mouvement dans des substrats denses (Schmalfluss, 1978). Le seul mammifère iridescent est une taupe. Les rôles de communications ne semblent pas impliqués car l'animal est aveugle. L'une de ses activités principales étant de creuser des galeries souterraines, la fonction de réduction de friction et d'antisalissure a été avancée (Kuyper, 1985 ; Snyder et al, 2012).

Répulsion ou absorption d'eau

Les propriétés liées à la réduction des frictions sont compatibles avec une répulsion d'eau. En effet, les écailles de serpents sont moins mouillées, elles ont des propriétés hydrophobes car les gouttes d'eau sur leur peau ne s'étalent pas (Gans & Baic, 1977 ; Gower, 2003). Une comparaison d'ailes de papillons montre que les ailes iridescentes absorbent moins l'humidité que les ailes non iridescentes (Wagner et al, 1996). Chez les plantes, cette faculté est retrouvée pour des feuilles possédant des microstructures (Barthlott & Neinhuis, 1997). Dans une autre étude, l'effet inverse est décrit, les écailles formant la cuticule des mâles d'un coléoptère *Hoplia coerulea* ont la capacité d'absorber l'eau. La cuticule bleue devient verte après absorption d'eau et les structures lui confèrent une bonne propriété hygronomique (Rassart, 2008). Une propriété hydrophile est également évoquée pour les élytres iridescentes du coléoptère *Tmesisternus isabellae* (Liu et al, 2009). La nature même des structures semble déterminante dans les fonctions de répulsion ou d'absorption d'eau.

Rigidité mécanique

Par leur nature périodique, les structures iridescentes induisent une propriété de résistance retrouvée pour les réseaux de diffraction de certains serpents et de coléoptères fouisseurs (Hinton, 1969) et des plumes d'oiseaux. Les plumes iridescentes sont décrites comme plus résistantes (Bonser, 1995 ; Butler & Johnson, 2004). L'iridescence de la coquille de certains mollusques leur confère une bonne robustesse (Jackson et al, 1988 ; Smith et al, 1999). Des fossiles d'organismes iridescents (coléoptères et plumes) ont démontré une bonne conservation et ont pu être retrouvés intacts après des millions d'années (Parker, 2000).

I.5 Iridescence des organismes marins

Dans le milieu marin, les couleurs structurales sont retrouvées chez des poissons (Lythgoe, 1975 ; Lythgoe & Shand, 1989), crabes (Parker et al, 1998), cnidaires (Welch et al, 2006 ; Prusten, 2008), céphalopodes (Mäthger & Hanlon, 2007 ; Sutherland et al, 2008 ; Mäthger et al, 2009 ; Izumi et al, 2010), macroalgues (Gerwick & Lang, 1977 ; Pellegrini & Pellegrini, 1982 ; Craigie & Gordon, 1992), éponge (Cattaneo-vietti et al, 1996 ; Aizenberg, 2004), vers marins (Trzeciak & Vukusic, 2009), mollusques (Brink et al, 2002 ; Tan et al, 2004) et diatomées (Gordon et al, 2009 ; Furchmann et al, 2004) (Figure 8, cadre rouge). Le tableau 4 présente des exemples d'organismes marins iridescents, leurs structures et les fonctions associées ; certains de ces exemples sont illustrés dans la Figure 11. Nous décrirons ci-après l'iridescence des poissons, des coquillages et en particulier celle des macroalgues.

La coloration argentée des poissons est due à l'empilement de microcristaux de guanine (Lythgoe, 1975 ; Lythgoe & Shand, 1989). Ces microcristaux sont contenus dans des cellules spécialisées : les leucophores et iridophores. Tous deux participent à la coloration structurale (Figure 11C). Les leucophores induisent une lumière blanche argentée et sont composés de protéines sphériques (leucosomes), ils renvoient dans une grande partie du spectre lumineux (300 nm à 900 nm). Les iridophores contiennent des empilements de cristaux qui impliquent une réflexion par multicouche. Les iridophores peuvent être statiques, dans le cas des effets métalliques de la peau ou mobiles pour la bande bleue des néons (Nagaishi & Oshima, 1992) ou chez certains poulpes, seiches et calamars (Mäthger et al, 2009). Les organismes répondent à des signaux neuronaux, hormonaux ou lumineux. Par contrôle nerveux, les granules contenus dans les cellules dendritiques se dispersent ou se rétractent au centre de la cellule et font varier les couleurs. Le gobie est un poisson diurne, l'iridescence de ces yeux lui sert de protection contre la lumière.

Dans le cas du mollusque *Haliotis glabra*, appelé abalone, la couleur structurale est générée par deux types de structures (Figure 11D). La première, en surface, correspond à des rainures en forme de vagues. La deuxième, en profondeur, est une pile de couches fines de nacre (Tan et al, 2004). La nacre est composée d'aragonite séparée de fines couches de conchioline. Les structures induisent un phénomène d'interférence avec diffraction (en surface) et sans diffraction (en profondeur).

Tableau 4. Caractéristiques de certains organismes marins iridescents.

Organisme	Zone iridescente	Structure iridescente	Fonction	Référence	
Interférences sans diffraction					
Poisson	<i>Neon tetra</i> *	Corps	Plaques de guanine / cytoplasme	Communication	Lythgoe & Shand, 1989 ; Nagaishi & Oshima, 1992
Crabe	Gobie	Yeux	Matrice intercellulaire / cytoplasme	Aide à la vision	Lythgoe, 1975
	<i>Ovalipes sp.</i>	Pinces	Cuticule	Communication	Parker et al, 1998
Céphalopodes	<i>Hapalochlaena lunula</i> *	Corps	Protéines périodiquement arrangées dans des cellules (iridophores et leucophores)	Camouflage et communication	Sutherland et al, 2008 ; Mähger et al, 2009
Macroalgues	<i>Chondrus crispus</i> *	Yeux	Multicouches opaque (riche en protéine) et transparente (riche en carbohydate)	Aide à la vision	Pedersen et al, 1980 ; Craigie & Gordon, 1992
		Frondes		?	
	<i>Iridea sp.</i>		Protection contre la dessiccation, l'action des vagues, les prédateurs et la colonisation bactérienne ?	Gerwick & Lang, 1977	
Eponge	<i>Cystoseira stricta</i>		Vésicules contenant des petits globules	?	Pellegrini & Pellegrini, 1982
	<i>Euplectella aspergillum</i>	Organisme	Fibre de silice	Rigidité mécanique	Cattaneo-vietti et al, 1996 ; Aizenberg et al, 2004
Interférences avec diffraction					
Vers	<i>Aphrodite sp.</i> * <i>Pherusa sp.</i>	Soies	Canaux cylindriques hexagonaux rassemblés	?	Parker et al, 2001 Trzeciak & Vukusic, 2009
Cténophore	<i>Beroë cucumis</i> *	Cils	Bâtonnets parallèles (microtubules)	Communication	Welch et al, 2006
Mollusque	<i>Haliotis glabra</i> *	Coquille	Rainures en vagues et multicouches de nacre	Renforcement	Tan et al, 2004
Diatomée	<i>Coscinodiscus granii</i> *	Paroi cellulaire	Pores en réseau hexagonal (sur les valves) et en réseau carré (dans la ceinture connective)	Photoreception	Furhmann et al, 2004 ; Gordon, 2008 ; Kucki, 2009

* Illustré en Figure 11.

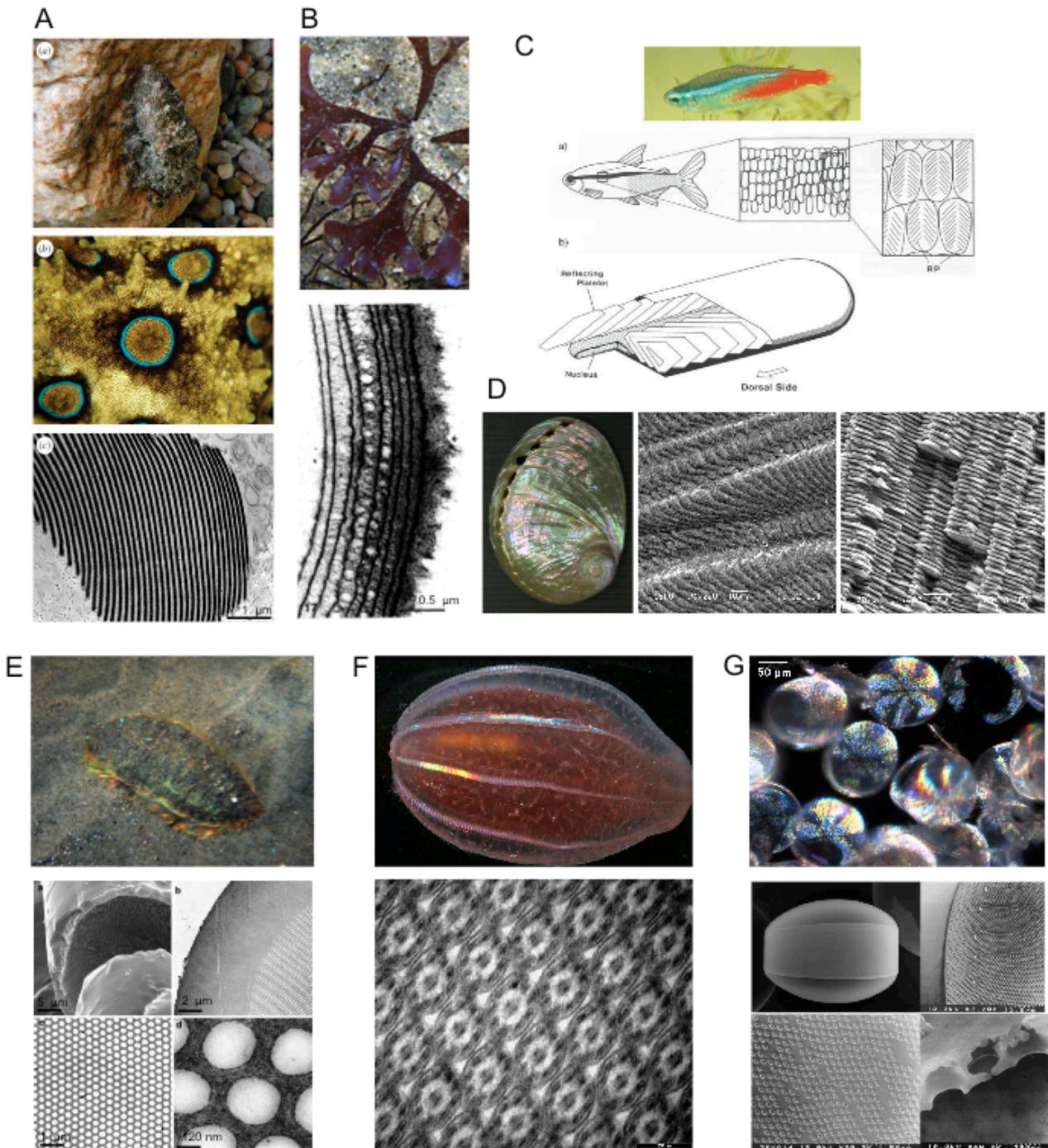


Figure 11. Structures iridescentes d'organismes marins. Interférences sans diffraction : (A) multicouches de protéines dans les iridophores du Poulpe *Hapalochlaena lunula* en MET (Mähnger et al, 2009) ; (B) cuticule multilamellaire de *Chondrus crispus* en MET (Craigie & Gordon, 1992) ; (C) rangées parallèles de plaques de guanine dans les iridophores du poisson *Neon tetra* (Nagaishi & Oshima, 1992) ; (D) coquille de *Haliotis glabra* composée de rainures en surface et de plaquettes de nacre en profondeur en MEB (Tan et al, 2004). Interférences avec diffraction (2D) en MET des (E) soies d'un vers marins *Aphrodite sp.* (Parker et al, 2001 ; Vukusic & Sambles 2003) ; (F) des cils de cténoptère *Beroë cucumis* (Welch et al, 2006) et structures en 3D de (G) frustules de la diatomée *Coscinodiscus granii* en MEB (Furhmann et al, 2004 ; Kucki, 2009).

L'iridescence chez les macroalgues est observée depuis de nombreuses années (Sauvageau, 1911 ; Mangelot, 1933 ; Dangeard, 1941 ; Gerwick & Lang, 1977 ; Pedersén et al, 1980 ; Pellegrini & Pellegrini, 1982 ; Craigie & Gordon, 1992 ; Fournet et al, 1993). Diverses images de macroalgues possédant des effets colorés semblables à de l'iridescence sont disponibles sur internet (Figure 12). Comme précisé précédemment, des termes vagues sont souvent associés aux phénomènes. Dans bien des cas aucune précision n'est donnée quand à la nature de la couleur, voir l'identification de la macroalgue. Il est plus aisé de trouver des illustrations lors d'une recherche à partir du nom de l'espèce, en particulier sur le site de référence *Algaebase* (<http://www.algaebase.org/>). Les couleurs d'iridescence sont très diverses au sein des macroalgues. Différents types de structures sont évoqués : des multicouches de la cuticule ou d'inclusions granuleuses à l'intérieur des cellules.

Les structures en multicouches sont décrites par exemple pour les macroalgues rouges *Chondrus crispus* (Craigie & Gordon, 1992) (Figure 11B), *Iridea flaccida* et *Iridea cordata* (Gerwick & Lang, 1977). L'alternance de couches opaques (riches en protéines) et transparentes (riches en carbohydrates) produit des interférences sans diffraction. Ce type de structure est mentionné pour d'autres macroalgues rouges, vertes et brunes (Sauvageau, 1911 ; Mangelot, 1933 ; Dangeard, 1941 ; Gerwick & Lang, 1977 ; Pedersén et al, 1980 ; Craigie & Gordon, 1992). Un deuxième type de structure est évoqué, la diffraction serait créée par des « amas » iridescents décrits comme ressemblant à des inclusions granuleuses dans les cellules. Elles sont troubles et hétérogènes, assimilées à des vacuoles (Dangeard, 1941 ; Gerwick & Lang 1977 ; Pellegrini & Pellegrini, 1982). Leurs représentations montrent des éléments très petits (Figure 13). Dangeard (1941) distingue les macroalgues iridescentes colorées, de celles iridescentes blanches « argentées ». Pour les premières, la fonction de l'iridescence est décrite comme relative à une photoprotection. En revanche, les couleurs argentées des macroalgues seraient la conséquence d'une illumination excessive et prolongée. En effet, les tissus contenant les inclusions iridescentes sont positionnées en profondeur et contiennent des composés phénoliques relatifs à une dégradation des tissus lors de dommages par les rayons lumineux. D'autres fonctions de l'iridescence des *Iridea sp.* ont été supposées : protection contre la dessiccation, contre l'action violente des vagues, contre les blessures provoquées par des prédateurs herbivores et contre la colonisation bactérienne (Tableau 4) (Gerwick & Lang, 1977). La fonction de photoprotection des macroalgues iridescentes est par ailleurs très controversée (Dangeard, 1941).

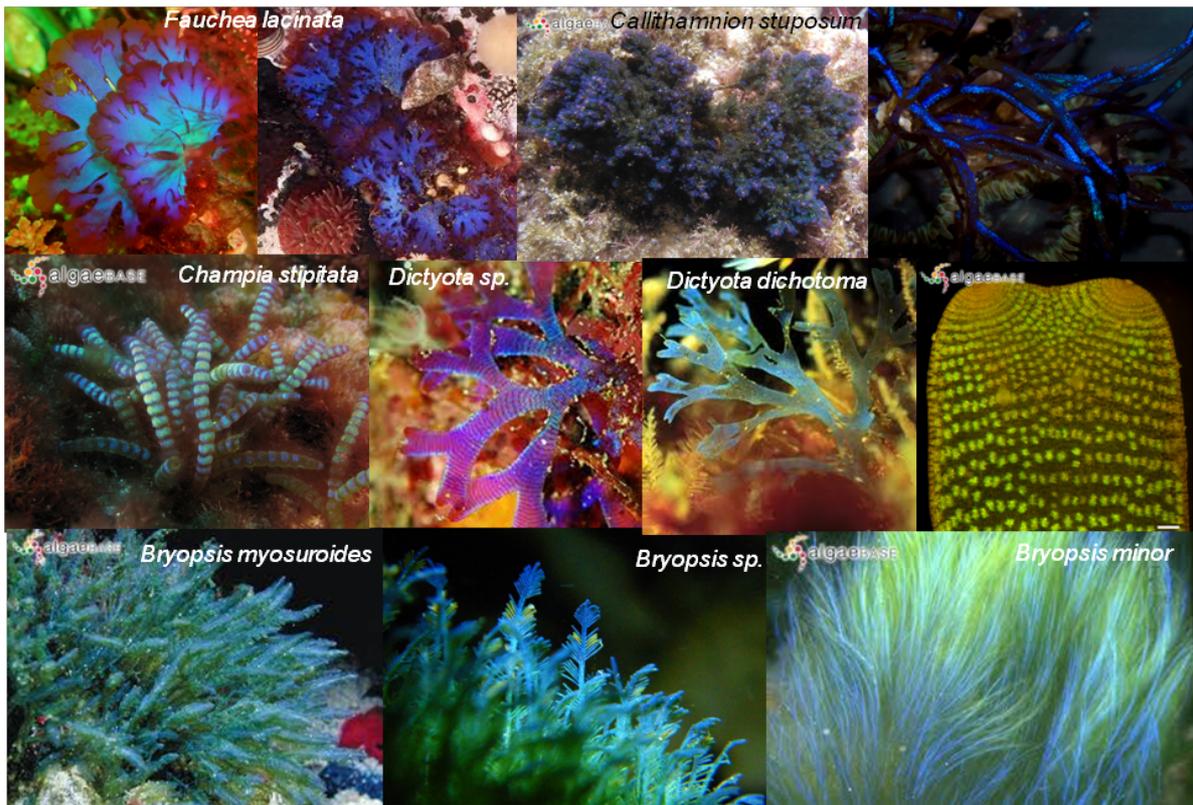


Figure 12. Macroalgues iridescentes (diverses sources internet dont le site *Algaebase*).

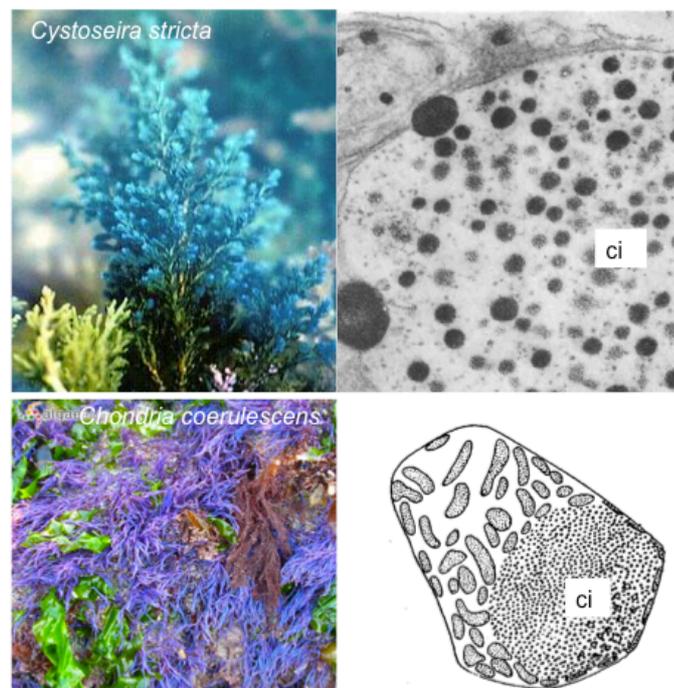


Figure 13. Exemples d'inclusions iridescentes (ci) dans les cellules d'une macroalgue brune *Cystoseira stricta* (Pellegrini & Pelligrini, 1982) et rouge *Chondria coerulescens* (Dangeard, 1941).

II. Couleurs physiques des procaryotes

Lorsque l'on recherche d'informations dans la littérature sur les couleurs physiques issues de colonies bactériennes, il est très difficile de comprendre et de comparer les phénomènes décrits. En effet, les descriptions sont vagues, ambiguës, les études anciennes, les phénomènes sont rarement illustrés et différentes méthodes d'observations sont employées. Seulement quelques microbiologistes semblent avoir été intrigués par ces colorations intenses. Cependant, une majorité d'entre eux mentionnent une iridescence sans pour autant l'étudier. La majorité des travaux observe le phénomène par transillumination des colonies ou de suspensions bactériennes concentrées. Le manque d'illustration peut être expliqué par les limites technologiques de l'époque. Par ailleurs, aucune donnée physique quantifiable ne prouve l'iridescence exprimée par des colonies bactériennes. L'historique de l'iridescence bactérienne, détaillé ci-après, constitue un point central de ce travail.

II.1 Premières descriptions

La littérature fait état du phénomène d'iridescence chez les procaryotes de façon sporadique. La première description d'iridescence semble avoir été donnée par Preisz en 1904, dans un article écrit en allemand (Nogrady & Guérault, 1964). La traduction de cet article révèle que l'auteur a observé, en transillumination, des vagues de couleur et de la lumière réfléchiée par des colonies de bacilles, ceux-ci issus de corps de personnes infectées par de l'anthrax. Durant le siècle dernier, seulement cinq auteurs ont tenté d'expliquer le phénomène (Pijper, 1918 ; 1923 ; 1925b ; 1927 ; Ponder, 1934 ; Guillot, 1941 ; 1942 ; Engboek, 1950 ; Nogrady & Guérault, 1964). La Figure 14 présente de manière chronologique les mentions d'iridescence et les études descriptives. L'accès aux informations publiées devait être limité entre chercheurs à cette époque. En effet, Guillot en 1941 indique que l'iridescence en transillumination n'a jamais été expliquée alors que Pijper l'avait exploré en 1918.

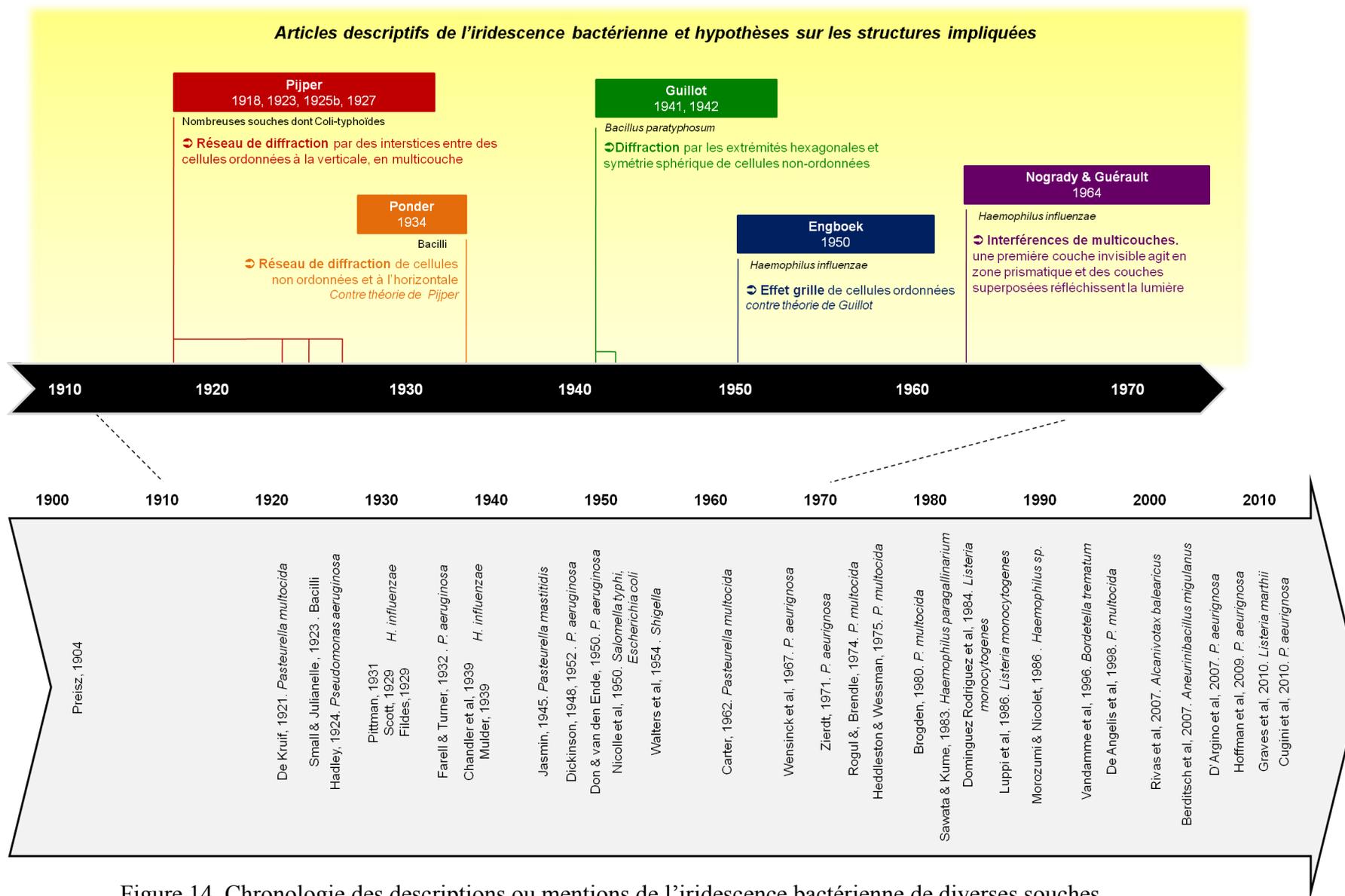


Figure 14. Chronologie des descriptions ou mentions de l'iridescence bactérienne de diverses souches.

L'un des auteurs les plus impliqués dans l'iridescence bactérienne est le Dr Pijper qui découvrit de manière accidentelle l'effet coloré particulier de colonies coccoïdes (Pijper, 1918). Il évoqua un phénomène de coloration différent de la pigmentation. Pour un étalement homogène, les couleurs étaient visibles dans le noir avec une source concentrée de lumière sur une boîte de culture placée entre l'observateur et la lumière. Différentes couleurs pouvaient être observées. Lorsque la boîte de culture était déplacée de haut en bas et que l'œil restait fixe, toutes les couleurs du spectre de la lumière étaient visibles, avec la possibilité d'observer une succession de deux spectres complets. Ce phénomène étant très différent de la fluorescence, qu'il évoqua en premier lieu (1918), l'auteur conclut finalement à un phénomène physique (Pijper, 1923).

II.2 Termes descriptifs

Les termes employés pour mentionner l'iridescence bactérienne ne permettent pas toujours d'appréhender le phénomène voire de l'identifier. Dans les premières études, l'iridescence est décrite de façon erronée comme de la fluorescence dépendante de l'illumination (Pijper, 1918 ; De Kruif, 1921 ; Chandler et al, 1939). De nombreux qualificatifs et définitions subjectives sont employés, en particulier les termes « glistening » (chatoyant), « shine » (brillant, luisant), « bright » (brillant), « sheen » (éclatant), « luster » (éclat), « mettalic » (métallique), « silvery flecks » (taches argentées) ou « glints of bronze » (reflets de bronze). Des exemples de ces descriptions vagues sont incorporés au Tableau 5. La traduction des termes anglais en français peut également engendrer une perte de précision de l'effet. Par ailleurs, dans certaines études, aucune description n'est incluse (Carter, 1962 ; Rogul & Brendle, 1974 ; Champlin et al, 1999). Le terme « iridescent » est employé aléatoirement, souvent sans description de l'apparence ou des couleurs associées. On remarque également que les termes n'entrent que très rarement dans les mots clés des articles, ceci compliquant considérablement les recherches exhaustives sur le phénomène. Au regard de ces informations, différents phénomènes d'iridescence semblent avoir été décrits.

Tableau 5. Exemples de descriptions employées lors des mentions d'iridescence bactérienne.

Souches	Descriptions	Références
<i>Staphylocoques</i>	« fluorescence » « bright » « all colours of the spectrum » « blue colour when the plate was held at a certain distance from, and at a certain angle, of the source light » « (observation des) couleurs du spectre, du violet bleu au rouge » « irisée intensément » « ondes moirées »	Pijper, 1918 Guillot, 1941 ; 1942
Souches <i>Coli typhoides</i> <i>H. influenzae</i>	« colonies emit coloured light » « diffraction » « iridescence » « bluish iridescence in oblique light » « Spectral colours (iridescence) » « reddish glow » « strong bright red »	Pijper, 1923 Scott, 1929 Engboek, 1950
<i>Pasteurella spp.</i>	« strongly fluorescent, both in daylight and by artificial illumination » « bluish or slightly greenish light »	De Kruif, 1921 Engboek, 1950
<i>Bacillus spp.</i> <i>P. aeruginosa</i>	« Glistening » « brillant iridescent » « glistening luster » « iridescent effect » « silvery flecks » « glints of bronze with yellow, green, red or distinctly blue » « silvery sheen » « iridescent with silvery gold or multi-coloured sheen » « metallic effect » « iridescent » « metallic shine » « Metallic iridescence » « iridescent plaque material »	Small & Julianelle, 1923 Hadley, 1924 Dickinson, 1948 Don & van den Ende, 1950 Wensinck et al, 1967 Rogul & Brendle, 1974

II.3 Différentes méthodes d'observation

II.3.a Mention des angles d'illumination

Peu d'auteurs évoquent ou définissent les angles précis lors de l'observation des phénomènes. L'iridescence est souvent associée subjectivement à un mouvement de la boîte de Pétri de bas en haut (Pijper, 1918 ; Guillot, 1941). Les colorations de *Haemophilus influenzae* sont décrites comme bleues sur la partie supérieure des colonies, vertes au milieu et rouges sur les parties basses (Pijper, 1918). Nogrady & Guérault (1964) sont parmi les seuls auteurs à définir des angles pour les différentes couleurs de cette souche : rouge-cuivrée (20°), bleue (45°) et tout le spectre (rouge, jaune, vert, bleue) à 30°. Engboek (1950), mentionne un angle variant de 33° à 41° pour l'observation de l'iridescence rouge de la même souche. Il est important de rappeler que l'une des caractéristiques principales des couleurs structurales réside dans le changement de coloration en fonction de l'angle d'illumination ou d'observation. Cette propriété permet dans de nombreux cas d'éclairer sur la nature du processus de coloration, qu'il faut ensuite prouver en traçant des courbes dans un espace chromatique. Nous avons constaté que ces informations essentielles sur les angles manquent dans la littérature ou peuvent différer selon les auteurs.

II.3.b Observations visuelles

Des modes d'observation différents sont recensés dans la littérature. Le tableau en Annexe 1 (page 265) regroupe diverses informations sur les souches précédemment mentionnées iridescentes et leurs méthodes d'observations. Dans la majorité des études, l'illumination est réalisée par le dessous, en illumination transmise des colonies. Seulement quelques études décrivent une meilleure observation en illumination directe de la culture sur un fond noir. Certaines études ne précisent pas le mode d'observation rendant impossible la compréhension de l'effet optique. Pour être seulement observée, l'iridescence de colonies ne nécessite pas de montages. Les informations recueillies évoquent une observation dans un environnement sombre avec une lumière intense focalisée et orientable. Pijper décrit sa première observation par l'illumination d'une culture lors de l'ouverture étroite d'une porte dans une pièce noire (1918). Néanmoins, il est nécessaire d'élaborer des dispositifs dans le cas d'une caractérisation précise et en particulier lorsque l'on doit photographier le phénomène. Seulement deux montages d'observation visuelle de l'iridescence bactérienne en transillumination sont disponibles, ils sont décrits ci-dessous. Aucun montage n'est évoqué pour l'observation en illumination directe.

Le premier montage pour l'observation de l'iridescence de *Shigella sp.* fut illustré par Walters et al (1954) (Figure 15a). Il est composé d'un microscope et d'un faisceau lumineux produit par le reflet d'une lampe dans un miroir. Le miroir est placé à équidistance entre la lampe et le microscope. Le faisceau lumineux est reflété obliquement sous la boîte et passe à travers la culture à observer. L'angle d'incidence de la lumière est de 41° permettant d'éviter le passage du faisceau dans l'objectif. Le deuxième montage en transillumination fut réalisé par Nogrady & Guérault (1964) pour l'observation de l'iridescence des souches *H. influenzae* et *Bordetella bronchiseptica*. Il est le seul adapté à la prise de photographie (Figure 15b). L'angle de transillumination pouvait être réglé à l'aide d'un miroir, ainsi que l'angle et la distance de prise de vue. Dans cette étude, les bactéries sont observées après étalement sur gélose transparente afin d'obtenir des cultures de différentes épaisseurs. Le phénomène est également observé avec des colonies resuspendues dans de l'eau physiologique glycinée (1%). Une goutte est ensuite déposée entre une lame et une lamelle. L'intensité du phénomène était moindre pour ces observations indirectes.

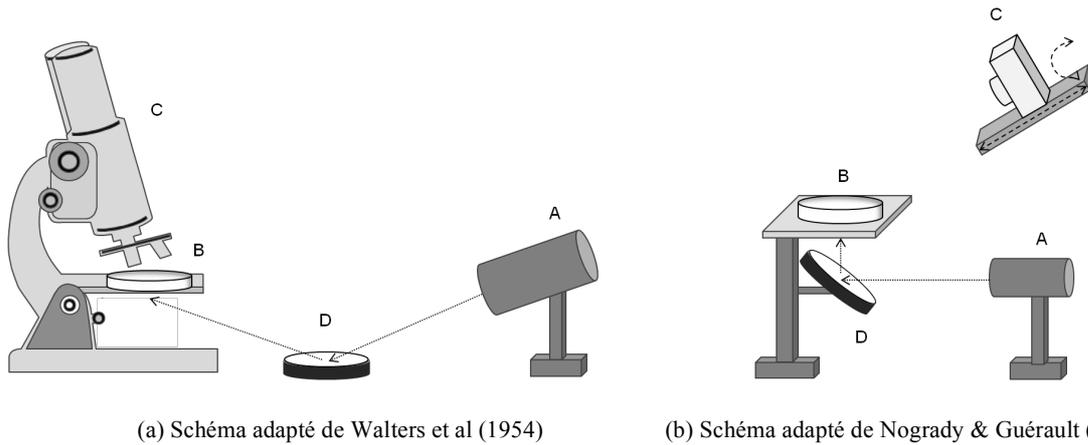


Figure 15. Montages de transillumination utilisant une source de lumière (A), une culture sur boîte de Pétri (B), un microscope ou un appareil photo (C) et un miroir (D).

II.3.c Observations spectrales

Certains auteurs ont étudié le spectre renvoyé par les colonies iridescentes en transillumination. Un montage fut mis au point en 1919 puis amélioré au cours de travaux ultérieurs pour atteindre un dispositif permettant d'observer le spectre de diffraction de colonies. Prénommé micromètre de diffraction (Pijper, 1919a), puis diffractomètre (Pijper, 1925b), il permet de se dispenser de microscope dans certaines études microbiologiques. L'enjeu est d'utiliser les propriétés optiques des colonies iridescentes pour évaluer la taille des cellules, ceci étant lié à l'hypothèse sur les structures impliquées dans l'iridescence (voir II.7, page 52). Dans un premier essai, des boîtes de culture sont employées, puis dans la version améliorée, la croissance des colonies est réalisée sur une fine couche de gélose dans un tube. Ce système sera employé dans d'autres études (Pijper, 1927 ; Ponder, 1934 ; Guillot, 1942). Le dispositif sera également utilisé pour le diagnostic de cellules sanguines anormales présentant lors d'anémie ou de la maladie d'Addison (Pijper, 1919b ; 1924 ; 1925c ; 1947).

Le principe de l'évaluation de la taille des cellules avec le diffractomètre consiste dans un premier temps à l'illumination des colonies par un faisceau lumineux focalisé par une lentille, passant par un diaphragme et traversant la culture. Un schéma simplifié représente le principe du diffractomètre de Pijper (Figure 16). Une lentille sépare ensuite le spectre diffracté sur un écran de verre dépoli, donnant lieu à des cercles concentriques ou à une ellipse comprenant les différentes longueurs d'ondes. La distance entre le centre du cercle et le cercle d'une

couleur définie, le rouge par exemple, renseigne sur le diamètre des cellules après l'utilisation d'une formule mathématique : $d = (\lambda \times \sqrt{(f^2 + r^2)}) / r$. Les symboles correspondent au diamètre des cellules (d), à la distance focale de la lentille (f), au rayon du cercle de couleur du spectre produit (r) et à la longueur d'onde de cette couleur (λ). Le plus souvent les longueurs d'ondes centrales (le vert ou rouge) sont choisies car elles permettent une mesure plus précise.

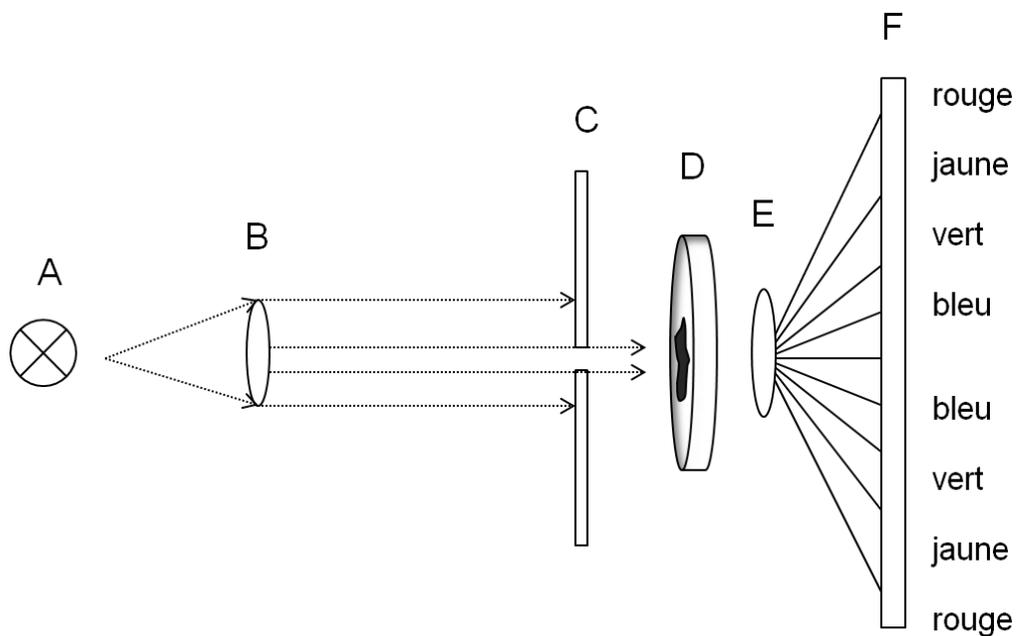


Figure 16. Diffractomètre comprenant une source de lumière (A), des lentilles (B et E), un diaphragme (C), une culture sur boîte de Pétri (D) et un écran (F).

II.4 Diverses iridescences bactériennes

En accord avec les divergences de méthodes d'observation et les divers termes descriptifs, nous avons identifié deux phénomènes possibles, le premier en transillumination et le second sous illumination directe (épi-illumination). Les deux espèces les plus décrites sont *H. influenzae* (en transillumination) et *P. aeruginosa* (en épi-illumination). Parmi les 24 souches bactériennes mentionnées iridescentes dans la littérature, 10 sont semblables à l'iridescence de *H. influenzae*, 5 possèdent un effet métallique de *P. aeruginosa* et 9 souches ne peuvent pas avoir leur iridescence déterminée par seule lecture de leur description (Annexe 1, page 265). En raison de l'ancienneté des études et de la reclassification permanente des bactéries, les noms d'espèces bactériennes sont quelques fois obsolètes. Certaines souches ont un nouveau nom d'espèce et parfois même de genre, il peut être difficile de faire la correspondance avec les dénominations actuelles.

II.4.a Phénomène en transillumination

L'effet optique est décrit comme une succession de couleurs lorsque des colonies sont placées entre l'observateur et une lumière focalisée. Les colorations correspondent successivement au rouge, jaune, vert et bleu (Nogrady & Guérault, 1964). Toutes les couleurs du spectre sont visibles (Pijper, 1918). L'orientation oblique de la source lumineuse est préférable. L'iridescence semble équivalente à celle des bulles de savon. Des différences d'intensités sont décrites selon les espèces bactériennes (Pijper, 1918 ; 1923 ; Guillot, 1941 ; Engboek, 1950) et au sein d'une même espèce (Nogrady & Guérault, 1964). Comme expliqué précédemment, seules quelques illustrations sont disponibles (Figure 17). Les premières descriptions de cet effet se sont déroulées avec des coques (Pijper 1918). Puis l'étude fut étendue aux *Coli typhoïdes* (Pijper, 1923 ; 1925b) et à des bacilles (Pijper, 1927). L'espèce bactérienne la plus décrite pour cet effet est *H. influenzae* (Pittman, 1931 ; Chandler et al, 1939 ; Mulder, 1939 ; Engboek, 1950 ; Nogrady & Guérault, 1964). D'autres souches décrites avec une illumination transmise pourraient avoir un effet semblable : *Alcanivorax balearicus* (Rivas et al, 2007), *Listeria marthii* (Graves et al, 2010), *Listeria monocytogenes* (Dominguez Rodriguez et al, 1984 ; Luppi et al, 1986), *Bordetella trematum* (Vandamme et al, 1996), *Salmonella typhi* (Nicolle et al, 1950), *Mannheimia haemolytica* [*Pasteurella mastitidis*] (Jasmin, 1945) et *Pasteurella multocida* (Heddleston & Wessman, 1975 ; Brogden, 1980 ; DeAngelis et al, 1998).

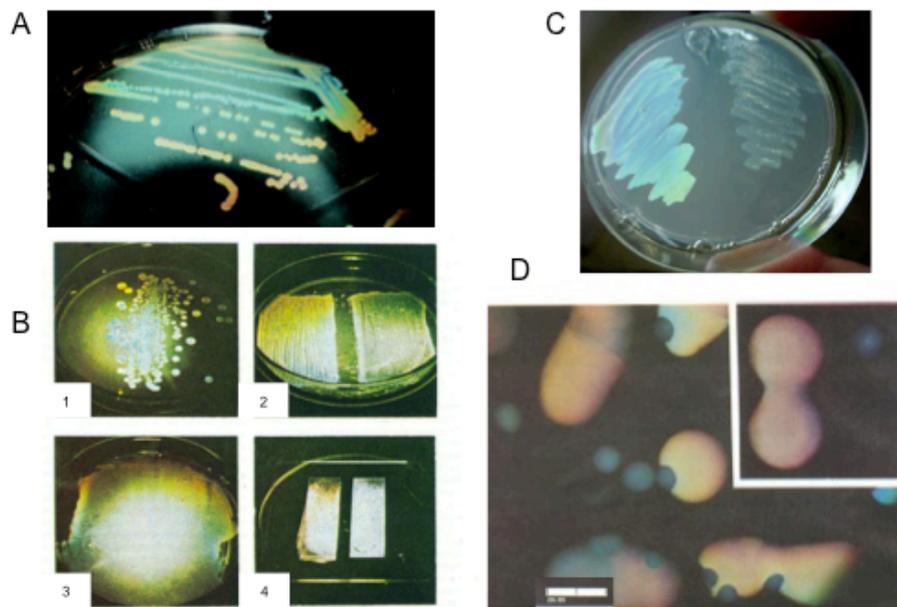
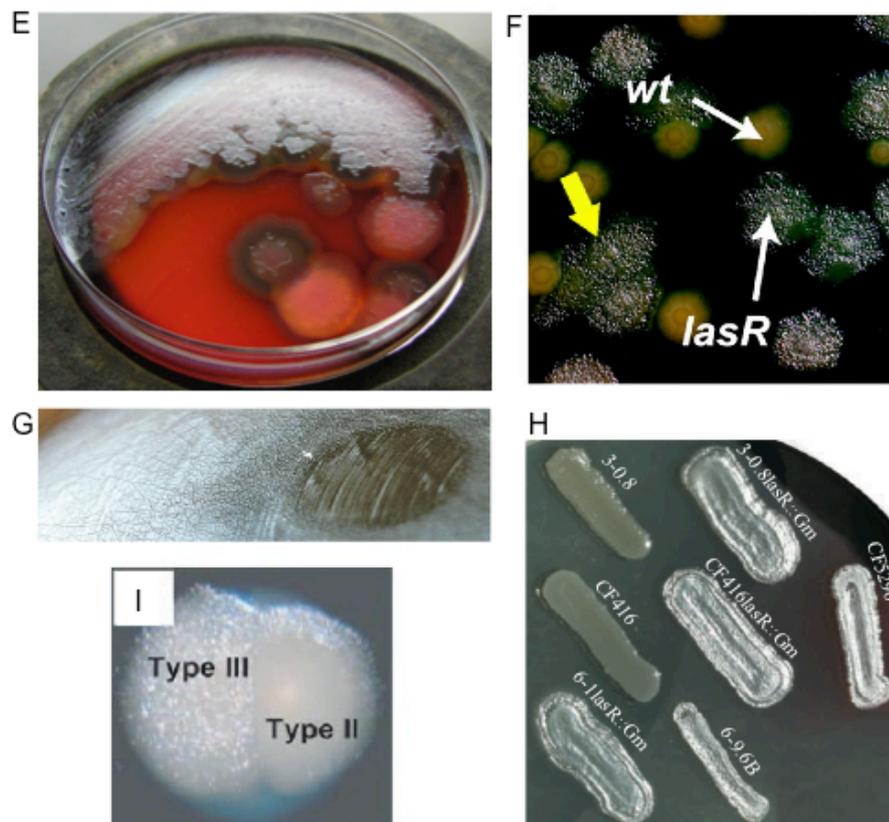
Iridescence en transilluminationIridescence en épi-illumination

Figure 17. Illustrations des iridescences bactériennes. En transillumination, des photographies des colonies de *H. influenzae* sont disponibles sur internet (A) ou à partir d'articles scientifiques (Nogrady & Guérault, 1964). Elles comprennent (B) des colonies isolées (1), des cultures confluentes (2), un film bactérien résiduel (3) et des suspensions entre lame et lamelle (4). Des images de colonies de (C) *A. balearicus* (Rivas et al, 2007) et (D) *Pasteurella multocida* (Heddleston & Wessman, 1975) sont publiées. Des illustrations en épi-illumination de (E, G, H) *Pseudomonas aeruginosa* (Buxton, 2005 ; D'Argino et al, 2007) et d'une mutante (Gray, 2010) (F) sont disponibles. L'aspect métallique est décrit pour *Aneurinibacillus migulanus* de type III (Berditsch et al, 2007) (I).

II.4.b Apparence métallique en épi-illumination

L'effet de coloration métallique est reporté principalement pour certaines souches de *P. aeruginosa* (Hadley, 1924 ; Don & van den Ende, 1950 ; Engboek, 1950 ; Berditsch et al, 2007 ; D'Argino et al, 2007 ; Hoffman et al, 2009 ; Cugini et al, 2010). Des souches *P. aeruginosa* d'origine clinique sont décrites comme présentant une pigmentation verte avec des zones brillantes métalliques (Don & van den Ende, 1950). La couleur est décrite comme relative à un lustre argenté en illumination directe des colonies. La couleur peut être or-argentée ou présentant des éclats multi-colorés, ce qui ne permet pas réellement de statuer sur l'iridescence observée (Tableau 5). Quelques illustrations sont présentes dans la littérature et sur internet (Figure 17). D'autres souches sont également mentionnées avec cette caractéristique : *Bacillus aerogenes*, *Bacillus rhinoscleromatis* (Small & Julianelle, 1923) et *Aneurinibacillus migulanus* (Berditsch et al, 2007).

Différents auteurs ont tenté d'expliquer l'origine de l'iridescence métallique de *P. aeruginosa*. L'accumulation d'un composé, le 2-alkyl-4-quinolinols extraplasmique, fut corrélée avec un phénotype iridescent (Hadley, 1924 ; Wensinck et al, 1967 ; D'Argino et al, 2007). Récemment, il a été montré que le mutant iridescent *P. aeruginosa* 14 *AlasR Δpqsh* qui surproduit du 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) est également iridescent (Cugini et al, 2010). Cependant, aucune explication n'a été donnée sur le mécanisme par lequel l'accumulation de HHQ crée des reflets métalliques.

II.5 Caractéristiques communes

Plusieurs auteurs se servent de l'iridescence de colonies et de leurs caractéristiques communes afin de poser un diagnostic préliminaire plus rapide que les tests sérologiques. Selon Guillot (1941), les avantages de ces observations sont un gain de temps (13h au lieu de 36h) et de milieu de culture (2 boîtes au lieu de 8 par colonies).

II.5.a Morphologie des colonies

Certaines morphologies semblables sont évoquées pour les souches iridescentes (Annexe 1, page 265). Les colonies iridescentes sont larges, lisses (« smooth » en anglais) et présentent un aspect muqueux. Les données de la littérature suggèrent que les variants iridescents sont associés au type S (« smooth »), les souches non-iridescentes étant de type R

(« rough », rugueuse) (De Kruif, 1921 ; Pittman, 1931 ; Chandler et al, 1939 ; Jasmin, 1945 ; Nicolle et al, 1950 ; Nogrady & Guérault, 1964 ; Sawata & Kume, 1983 ; DeAngelis et al, 1998). Cette morphologie de colonie est surtout évoquée pour les souches iridescentes en transillumination, toutefois, les colonies iridescentes en épi-illumination de *P. aeruginosa* sont décrites comme particulièrement muqueuse (Small & Julianelle, 1923 ; Don & van den Ende, 1950 ; Zierdt, 1971 ; Hoffman et al, 2009).

II.5.b Morphologie cellulaire

Une homogénéité de la taille des cellules dans les colonies iridescentes est mentionnée (Guillot, 1942). Les cellules sont décrites comme ayant toute la même taille. La forme coccoïde a été évoquée comme la cause de l'iridescence. Cette hypothèse fut par la suite réfutée par la comparaison de souches ayant des morphologies coques et bacilles (Pipjer, 1925b ; 1927). Guillot (1942) évoqua une forme d'ellipse ou de polyèdre des bords de cellules. Pipjer (1923) évalue une corrélation entre la taille des cellules et celle du spectre réfléchi. Cette caractéristique justifie l'utilisation du diffractomètre dans l'évaluation du diamètre des cellules. Ces données bibliographiques nous indiquent que les cellules sont probablement de taille homogène sans pour autant avoir une morphologie semblable entre les espèces.

II.5.c Virulence, encapsulation et composition antigénique

La majorité des souches mentionnées iridescentes sont d'origines cliniques et ont été particulièrement isolées au cours d'infections graves (méningites et septicémies) (Annexe 1, page 265). Dans leur étude Nogrady & Guérault (1964), utilisent une souche virulente de *H. influenzae* iridescente isolée d'une méningite infantile et une souche issue d'un prélèvement nasal de routine non-iridescente et non virulente. D'autres études démontrent une virulence supérieure avérée pour les variants iridescents en transillumination (De Kruif, 1921 ; Pittman, 1931 ; Mulder, 1939 ; Jasmin, 1945 ; Sawata & Kume, 1983) et en épi-illumination (Dickinson, 1942 ; D'Argino et al, 2007 ; Hoffman et al, 2009). Une encapsulation des variants iridescents est également décrite pour diverses souches iridescentes en transillumination, les souches sans capsules n'étant pas iridescentes. De même, des analyses de cellules issues de colonies iridescentes dans un sérum antigénique montrent une agglutination différente des souches iridescentes et non-iridescentes (Nicolle et al, 1950 ; Nogrady & Guérault, 1964).

II.6 Conditions favorisant l'iridescence

II.6.a Milieux de culture

De nombreux auteurs décrivent l'utilisation d'un milieu transparent tel le Levinthal's agar pour *H. influenzae*. A l'inverse, sur une gélose nutritive l'iridescence n'est pas visible. L'observation de l'iridescence en transillumination semble donc réduite sur milieu opaque et favorisée sur une gélose transparente (Nogrady & Guérault, 1964 ; Vandamme et al, 1996). L'iridescence étant exprimée à travers la couche de gélose, il semble certain qu'une transparence de celui-ci soit appropriée. La gélose de culture doit être fraîche avec une surface humide et un ensemencement homogène afin d'avoir une même épaisseur de colonie. La consistance du milieu est un facteur évalué comme important ; en effet, la culture sur un milieu semi-fluide peut faire apparaître des colonies non-iridescentes (Engboek, 1950).

La composition du milieu influe sur l'iridescence en épi-illumination. Le phénomène n'est pas observé pour les colonies de *P. aeruginosa* se développant sur les milieux de culture MacConkey ou S.S. medium. Dans les milieux inhibant l'iridescence, la cause avancée est la présence de sels de bile ou d'agents surfactants (Don & van den Ende, 1950). La composition en ions contrôle l'iridescence de *P. aeruginosa*. Un milieu de culture riche en Fer limite le phénomène alors qu'une augmentation en Ca, Cu, Mn n'influe pas sur l'effet métallique. Certains éléments pourraient donc réguler la production de HHQ. Il est décrit que certains antibiotiques (la tétracycline, streptomycine et la polymyxine) renforcent l'iridescence de *P. aeruginosa* (Zierdt, 1971). Le milieu de culture est donc très important.

II.6.b Température et temps d'incubation

Quelques études évoquent une intensité maximale de l'iridescence pour des cultures jeunes, dans les premières heures d'incubation (Pijper, 1923 ; Don & van den Ende, 1950 ; Nicolle et al, 1950 ; Nogrady & Guérault, 1964). Une température d'incubation trop élevée engendre une perte de l'iridescence (Dominguez Rodriguez et al, 1984). Selon les souches, les paramètres sont à adapter. Par exemple, le phénomène faiblit après 12h - 18h pour *H. influenzae* et 24h - 36h pour *Bordetella bronchiseptica*. La disparition du phénomène intervient entre 6h à 12h plus tard mais peut être conservée si les cultures sont placées à 4°C (Engboek, 1950 ; Nogrady & Guérault, 1964). La décroissance du phénomène serait liée à la multiplication tardive et pas seulement à la diminution du nombre de cellules viables.

II.7 Hypothèses sur les structures iridescentes en transillumination

Cinq auteurs ont tenté d'élucider le phénomène d'iridescence en transillumination. Différentes hypothèses sur les structures impliquées sont référencées et certaines se contredisent (Figure 14, Tableau 6).

La première explication, émise en 1918, décrit des effets de diffraction par des multicouches de cellules alignées (Figure 18) (Pijper, 1918). Les cellules sphériques de même diamètre sont chacune en contact avec six voisines, en une première couche. La couche supérieure s'emboîte sur la couche inférieure, ainsi la troisième couche est alignée avec la première. En raison de la superposition des couches de cellules, les interstices sont équivalents à trois lignes se croisant à 60°. Les espaces entre les cellules sont périodiques et responsables des interférences avec la lumière. Deux couches sont au minimum nécessaires et l'alignement peut être perdu si trop de couches se superposent, au maximum 14 couches. Ceci expliquerait la perte du phénomène dans les colonies âgées. La distance entre les interstices correspondrait au diamètre des cellules. Cette dimension est calculée par l'auteur avec l'observation du spectre diffracté. Grâce à son montage, le diffractomètre, il détermine une taille de 0.9 μm pour *Staphylococcus aureus*. Dans la littérature, la taille renseignée de cette souche est de 0.8 à 1 μm , son calcul semble donc correct. Dans cette hypothèse, les cellules non sphériques doivent avoir une position verticale, dressées sur la gélose. Pour renforcer sa théorie, l'auteur tenta ensuite d'analyser la consistance vésiculaire de l'agar et de décrire les mouvements d'eau à la surface de la gélose (Pijper, 1925a). Selon lui, le principe de synérèse (relâchement d'eau par un gel), permet aux cellules de se positionner à la verticale. Cette hypothèse sera critiquée par plusieurs auteurs.

Ponder (1934) décrit plus tard qu'il n'existe aucune raison pour laquelle les cellules seraient en position verticale. Si les interstices sont à l'origine de la diffraction, des triangles devraient être visibles lors de l'observation spectrale et non pas des cercles. Il évoque donc un effet de grille de diffraction des cellules déposées de façon aléatoire. Cependant, dans cet article, il est très difficile de comprendre la nouvelle explication de la structure iridescente.

Tableau 6. Hypothèses sur les structures iridescentes en transillumination.

Auteurs	Type de structure	Structures impliquées	Cellules		Multicouches
			Organisées	Orientation	
Pijper (1918, 1923)	Réseau de diffraction en multicouches	Interstices entre les cellules créés lors de leur superposition	Oui	Verticale	Oui
Ponder (1934)	Réseau de diffraction	Cellules	Non	Horizontal	?
Guillot (1941, 1942)	Réseau de diffraction	Extrémités hexagonales et symétrie sphérique des cellules	Non	?	?
Engboek (1950)	Réseau de diffraction	Cellules	Oui	?	?
Nogrady & Guérault (1964)	Interférences de multicouches	Couches de cellules	?	?	Oui

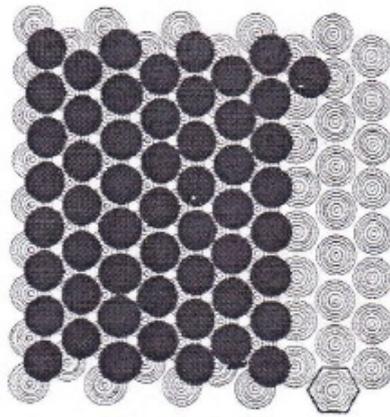


Figure 18. Structure d'une culture jeune avec deux couches, le couche inférieure (cercles concentriques) se développe sur l'agar, la couche supérieure (cercles pleins) s'emboîte sur la première. Les cellules sont dessinées distantes entre elles mais en réalité elles se touchent. Les interstices réguliers prennent forme entre trois cellules. Illustration extraite de l'article de Pijper, (1923).

Un peu plus tard, Guillot (1941 ; 1942) explique à tort qu'aucune étude n'a exploré ce phénomène et évoque une diffraction de type "couronnes". Dans son étude, un cône spectral est visible lorsque des cellules resuspendues de *B. paratyphosum* sont déposées entre des lames. Par ce dépôt au hasard, le phénomène est observé alors que les cellules ont des orientations aléatoires. Ainsi, selon cet auteur, les cellules ne sont pas organisées. L'iridescence bactérienne serait due à l'interférence des bords opposés de la cellule. La cellule ne doit pas être sphérique mais en forme d'ellipse ou de polyèdre comme pour les *Staphylocoques*. L'auteur confirme cependant que les colonies iridescentes sont composées d'individus de même longueur ou largeur orientés dans la même direction.

Quelques années après, Engboeck (1950) décrit comme fautive la théorie de Guillot, qu'il détaille comme étant un effet film. Cependant, aucun effet film n'avait été décrit par Guillot (1941 ; 1942). Une mauvaise traduction de cet article en français a pu donner lieu à des confusions. Pour Engboeck (1950), l'iridescence de *H. influenzae* est due à une organisation des cellules en grille de diffraction. Il évoque d'autres facteurs pouvant entrer en jeu.

Dans la dernière étude, les auteurs évoquent l'interférence de multicouches (Nogrady & Guérault, 1964). Une densité minimum de cellules est décrite comme nécessaire. En effet, la première couche, dont l'iridescence n'est pas visible, correspond à une zone prismatique qui disperse la lumière et forme un écran. Le phénomène est observé par l'accumulation de couches de cellules qui cette fois réfléchissent la lumière. Cependant, cette théorie n'explique pas les différences d'intensité selon les espèces.

Au regard de ces informations, aucune étude n'a pu caractériser la nature des structures responsables de l'iridescence en transillumination. L'analyse interne des colonies, en microscopie par exemple, semble primordiale pour élucider ces structures.

III. Caractéristiques de *Cellulophaga lytica*

III.1 Systématique

La souche isolée dans cette étude fut identifiée comme appartenant à l'espèce *Cellulophaga [Cytophaga] lytica*. Les premiers isolements de souches de cette espèce ont été réalisés par Lewin & Lounsbury (1969). Ces auteurs recherchaient des bactéries environnementales motiles par « gliding » identifiées *Flexibacteria* (Lewin, 1969). Parmi celles-ci, les souches dénommées *Cytophaga lytica* provenaient d'eau de mer et de sédiments et appartenaient au groupe des *Flexibacteria*, à l'ordre des *Cytophagales*, à la famille *Cytophagaceae* et au genre *Cytophaga* (Lewin & Lounsbury 1969 ; Reichenbach & Dworkin, 1981 ; Reichenbach, 1989). Quelques années après, l'espèce fut reclassée dans un nouveau groupe (Johansen et al, 1999). Avec l'utilisation de méthodes de séquençage et de phylogénie, différentes *Cytophagales* avaient déjà été sujettes à une reclassification (Bernadet et al, 1996). Selon la dernière version de l'ouvrage « *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* » (Bowman, 2011), la souche étudiée est membre du :

Phylum XIV. "*Bacteroidetes*"Class II. "*Flavobacteriia*"Order I. "*Flavobacteriales*"Family I. *Flavobacteriaceae*Genus XI. *Cellulophaga**Cellulophaga lytica*III.1.a Le phylum *Bacteroidetes*

Le phylum *Bacteroidetes* contient 163 genres répartis dans 4 classes. Il est souvent dénommé groupe CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* ou *Cytophaga-Flexibacteria-Bacteroides*) ou *Cytophaga-Flavobacteria* (Kirchman, 2002). Les recherches d'informations sur les membres de ce groupe par le seul mot clé « *Bacteroidetes* » sont donc parfois difficiles. Les membres de ce phylum sont des bactéries en forme de bâtonnets gram négatifs sans endospores (Krieg, 2011). Présents dans divers environnements, leur rôle principal est la dégradation des matières organiques en raison de leur habilité à dégrader différentes macromolécules. Les exsudats libérés sont une source de nutriments et constituent un excellent habitat pour d'autres communautés. Les membres du phylum sont ainsi reconnus pour leur participation dans la chaîne alimentaire par un transfert de carbone (Laycock, 1974 ; Fenchel & Jørgensen, 1977 ; Kong & Chan, 1979 ; Reichenbach, 1992 ; Eilers et al, 2003 ; Kirchman et al, 2004).

III.1.b La classe *Flavobacteriia* et l'ordre *Flavobacteriales*

Les descriptions relatives à la classe *Flavobacteriia* et l'ordre *Flavobacteriales* sont équivalentes (Bernadet, 2011). Les membres sont des bacilles gram négatifs se multipliant par fission binaire et sont en forme de bâtonnets ou de filaments mais aucune forme en anneau n'est observée. La majorité des souches nécessite des sels marins ou du chlorure de sodium, ainsi que des composés organiques (extrait de levure, peptone et/ou casamino acides) pour se développer. L'ordre des *Flavobacteriales* englobe trois familles très différentes regroupées selon leur analogie de séquence de l'ARNr 16S. L'analyse phylogénétique des séquences s'est montrée la plus adaptée lors de la classification des espèces contrairement aux analyses de morphologie, de chimiotaxonomie et de physiologie précédemment proposées par Cavalier-Smith (2002). La famille *Blattabacteriaceae* n'est composée que d'une seule espèce

non cultivable, caractérisée par un biotope spécifique. La famille *Cryomorphaceae* ne comprend que quatre genres possédant chacun une espèce. La famille *Flavobacteriaceae* inclue 61 genres bactériens dont certains comprennent plus de 40 espèces.

Les membres de cet ordre sont issus de divers habitats : terrestres, marins, eaux douces et eaux saumâtres en zone tempérées, zones tropicales (Kirchman, 2002 ; Kirchman et al, 2003) et également dans les régions polaires (Glöckner et al, 1999 ; Pinhassi et al, 1999 ; Simon et al, 1999 ; Cottrell & Kirchman, 2000 ; Brinkmeyer et al, 2003 ; Fandino et al, 2001; 2005).

III.1.c La famille *Flavobacteriaceae*

La première description des membres de cette famille fut réalisée par Reichenbach en 1989. Une description plus précise de la famille *Flavobacteriaceae* fut donnée par la suite lors de la comparaison de différentes souches (Bernadet, 1996 ; Bernadet & Nakagawa 2006). En plus de posséder les caractéristiques classiques des *Flavobacteriales*, les membres de cette famille sont des bacilles courts, de taille moyenne, filamenteux, rigides ou flexibles. Certaines cellules sont hélicoïdales ou coccoïdes dans les cultures âgées. Les cellules sont non motiles ou motiles par « gliding ». *Polaribacter irgensii* est la seule souche possédant un flagelle cependant aucune motilité flagellaire n'est observée. Les colonies sont rondes, convexes à plates et peuvent être adhérentes et creuser l'agar. Les pigments produits sont non diffusibles et vont du jaune clair au orange ce qui correspond aux pigments de type caroténoïdes et/ou flexirubine, certaines sont non pigmentées. Les souches sont aérobies strictes majoritairement, mais certains membres sont microaérobie ou anaérobie facultatif. La ménaquinone à 6 unités isoprénoïdes (MK-6) est la quinone majoritaire dans la respiration. Les caractères oxydase + et catalase - sont généralement retrouvés. Décrites comme chimio-organotrophe, les souches peuvent dégrader de nombreuses macromolécules organiques telles des protéines (caséine et gélatine), des lipides (lécithine et tween) et des carbohydrates simple ou complexes (esculines, amidon, pectine, agar, chitine et carboxyméthylcellulose), cependant la cellulose cristallisée (papier filtre) n'est pas dégradée. La croissance est réalisée sur composés organiques (peptone, casamino acides et extrait de levure). Les membres de cette famille ont une teneur particulièrement élevée en acides gras saturés ramifiés et mono-insaturés ramifiés. La majorité des souches sont halophiles à différents degrés, certaines sont seulement halotolérantes. Des genres sont psychrophiles et produisent des protéines de résistance au froid. Plusieurs souches sont identifiées chaque année et parmi ces nouveaux membres les propriétés halophiles et psychrophiles semblent très représentées.

Les clés principales d'identification sont la motilité gliding, la pigmentation jaune, le besoin en sels marins ou en chlorure de sodium, la gamme de température de croissance étendue et la présence de nombreuses activités enzymatiques. On distingue cette famille des autres familles du même ordre notamment par chimiotaxonomie : absence de sphingophospholipides et la présence de MK6 (Bernadet, 1996).

Retrouvées dans divers environnements, cette famille est capable de coloniser les surfaces grâce à la motilité « gliding » qui augmente l'accès aux nutriments et la formation de biofilm. Ce mode de déplacement est un avantage sélectif pour des organismes qui dépendent de la localisation et de la digestion de substrats insolubles pour leur nutrition (Lewin & Lounsbury, 1969 ; Bernadet, 1996 ; Harshey, 2003). Leur mode de vie peut être libre, saprophyte et parasitaire. Les souches sont particulièrement présentes en milieux marins et polaires où elles jouent un rôle dans la dégradation de la matière organique et le renouvellement des nutriments dans les océans. La plupart des souches sont associées au phytoplancton et peuvent représenter 70% du bactérioplancton lors des blooms d'algues (Bolinches et al, 1988 ; Rath et al, 1998 ; Glöckner et al, 1999 ; Cottrell & Kirchman, 2000 ; Fandino et al, 2005). Les souches récemment décrites proviennent de plantes, de macroalgues, d'organismes marins, d'eau de mer, de glace, de lac salé, de biofilms de rivières, de sédiments terrestres et également de produits alimentaires. Certains membres sont pathogènes pour l'homme ou d'autres organismes à sang chaud, de poissons marins ou d'eau douce, d'amphibiens et d'autres organismes aquatiques incluant les microalgues (Bernadet, 1996 ; Bowman, 2006 ; 2011).

III.1.d Le genre *Cellulophaga*

Ce genre fut créé lors de la reclassification de *C. lytica* et correspondait au genre *Cytophaga* (Stanier, 1940). Une étude de phylogénétique et chimiotaxonomique démontra que *Cytophaga lytica* était très différente des autres membres du genre *Cytophaga* comme par exemple *Cytophaga hutchinsonii* (Nakagawa & Yamasato, 1993). Le genre *Cellulophaga* dont l'espèce type est *Cellulophaga lytica* fut alors proposé (Johansen et al, 1999). *Cellulophaga* signifie mangeur de cellulose, du latin *cellulosurn* (: cellulose) et *phaga* en latin ou *phagein* en grec (: manger). Cependant, l'appellation du genre n'est pas adaptée car les *Cellulophaga spp.* ne dégradent pas la cellulose sous forme de poudre cristallisée ou de papier, mais seulement le carboxyméthylcellulose (sauf *C. pacifica*) ou l'endocellulose. Depuis, d'autres souches ont été identifiées comme appartenant à ce genre qui comprend à ce jour sept

espèces (Tableau 7). Une différence de 5 - 6% dans les analyses ARNr 16S permet de séparer deux sous-groupes distincts. Le premier sous-groupe inclut *C. lytica* et *C. fucicola*, le deuxième sous-groupe est formé par *C. baltica*, *C. pacifica*, *C. tyrosinoxydans* et *C. algicola*. La souche récemment isolée, *C. geojensis*, n'est pas incluse et n'apparaît pas dans la dernière version du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology » (Bowman, 2011).

Tableau 7. Premier isolements des souches du genre *Cellulophaga spp.*

Espèce	Origine		Référence
<i>Cellulophaga lytica</i>	Aquarium d'eau de mer	La Jolla, USA	Lewin & Lounsbury 1969
	Sédiment de plage	Costa Rica	
<i>Cellulophaga fucicola</i>	Surface de l'algue brune <i>Fucus serratus</i>	Mer Kattegat, Danemark	Johansen et al, 1999
<i>Cellulophaga baltica</i>	Surface de l'algue brune <i>Fucus serratus</i>	Mer Baltique, Danemark	Johansen et al, 1999
<i>Cellulophaga algicola</i>	Associée à une diatomée <i>Melosira</i> et macroalgue	Côte Antarctique	Bowman et al, 2000
<i>Cellulophaga pacifica</i>	Eau de mer	Golf de Peter, Japon	Nedashkovskaya, 2004
<i>Cellulophaga tyrosinoxydans</i>	Eau de mer	Corée	Kahng et al, 2009
<i>Cellulophaga geojensis</i>	Sable	Ile de Geoje, Corée	Park et al, 2012

Les membres du genre *Cellulophaga* ont des cellules en forme de bâtonnets avec des bords arrondis, seules ou en paires, quelques fois en chaînes. Les souches sont strictement aérobies, chimio-hétérotrophes, catalase positive, le caractère oxydase est variable selon les études et elles ne produisent pas de flexirubine. La proportion en guanine/cytosine dans leur ADN est de 32 - 38%. La motilité « gliding » et l'agarolyse sont particulièrement visibles sur des milieux pauvres. Les colonies apparaissent ainsi compactes lorsqu'elles poussent sur des milieux riches en nutriments (Bowman, 2011). Toutes les espèces hydrolysent l'agar, l'alginate, les carragénanes, la gélatine, l'amidon, l'esculine, possèdent une activité β -galactosidase, décomposent la L-tyrosine et forment des acides à partir de carbohydrates (tels D-glucose, D-galactose, sucrose et cellobiose). Elles sont capables de produire de nombreuses exoenzymes. Le genre est très proche du genre *Zobellia* mais se distingue par des bords sans bourgeonnements, une absence de pigment flexirubine et une croissance aérobie stricte.

Au vue des isolements de *Cellulophaga spp.* et des données moléculaires, les membres de ce genre semblent être rencontrés dans divers habitats, qu'ils soient de transition (estuaire, et eau saumâtre) ou de mers froides antarctiques (Brown & Bowman, 2001). Ces souches sont associées aux macroalgues et présentes dans des échantillons d'eau de mer et de sédiments.

Les *Cellulophaga spp.* sont employées dans certaines études comme des souches modèles de colonisation des surfaces immergées (Stafslien et al, 2006 ; 2007 ; Majumdar et al, 2008 ; 2011). *C. fucicola* fut utilisée pour tester la compétitivité de formation de biofilm avec d'autres souches marines. Elle était particulièrement persistante sous forme de microcolonies durant une coculture avec le supercompétiteur *Pseudomonas tunicata* (Rao et al, 2005). Ces informations suggèrent que les membres de ce genre ont une bonne capacité à former des biofilms.

Certains membres de la famille des *Flavobacteriaceae* ont également la capacité d'inhiber la colonisation d'autres organismes et en particulier la prolifération de microalgues (Egan et al, 2000). Durant un déclin de phytoplancton, Pinhassi & Hagström (2000) reportent une dominance de *Flavobacteria* (43 %). Ces micropredateurs prennent place dans la régulation des populations de microalgues (Nett & König, 2007). Le potentiel algicide des *Cellulophaga spp.* est bien documenté. Par la libération de substances toxiques, les souches sont capables d'attaquer des microalgues en particulier des dinoflagellés (Stewart & Brown, 1969; Mitsutani et al, 1992 ; Imai et al, 1993 ; 2006 ; Yoshinaga et al, 1998 ; Doucette et al, 1999 ; Nagasaki et al, 2000 ; Toncheva-Panova & Ivanova, 2000 ; Adachi et al, 2002 ; Skerratt et al, 2002 ; Kondo et al, 2004). Impliquée dans les blooms et leur décomposition, elles interviennent dans la dégradation de la « neige » marine composée d'exopolysaccharides (Bowman, 2006). La lyse des cellules dans les blooms implique une augmentation locale de particules organiques dissoutes utilisées pour la croissance de la bactérie. Parmi les activités biologiques diverses de ces souches, on retrouve une aide à l'adhésion des zoospores d'Enteromorphe par *C. baltica* (Patel et al, 2003). Cette même activité envers l'adhésion de larves du polychète *Hydroides elegans* est décrite pour *C. lytica* (Huang et al, 2003).

III.1.e L'espèce *Cellulophaga lytica*

Le nom d'espèce *lytica* du grec *lutikê* signifie *capable de dissoudre*. Ses caractéristiques sont : des cellules en forme de bâtonnets minces flexibles avec des bords cylindriques arrondis, non sporulées, sans flagelles et motiles par « gliding ». Hétérotrophe et chimio-organotrophe, son contenu en guanine et cytosine correspond, selon les auteurs, à 32 - 34% (Bowman, 2011) ou 33.5 - 34.5% (Lewin, 1969). L'estimation de la taille des cellules varie également selon les travaux, pour une largeur de 0.4 µm et une longueur de 1.5 - 3.3 µm (Johansen et al, 1999) à 10 - 20 µm (Lewin, 1969). La morphologie diffère selon la température, la salinité ou le substrat (Lewin, 1969 ; Lewin & Lounsbery, 1969 ; Johansen et

al, 1999 ; Bowman, 2011). Les colonies s'étalent sur la gélose avec une périphérie fibreuse. Les colonies sont jaunes pâles à oranges selon le substrat. Les pigments associés sont les caroténoïdes, la zéaxanthine et la saxoxyanthine mais elle n'excrète pas de chlorophylle, de phycobiline ou de flexirubine. Un profil d'absorption de la lumière est disponible dans l'étude de Lewin (Lewin & Lounsbery, 1969) (Figure 19).

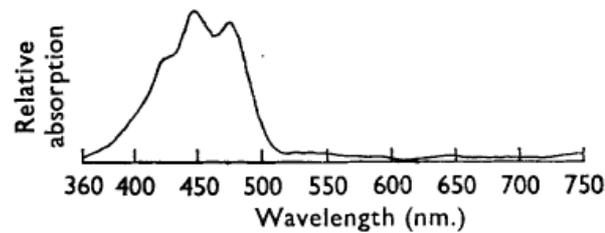


Figure 19. Courbe d'absorbance de l'extrait pigmentaire, type IV, au n-hexane de *Cytophaga lytica* (Lewin & Lounsbery, 1969).

C. lytica a une forte activité protéolytique et dégrade de nombreux substrats. Ses propriétés agarolytiques la rendent notamment capable de ramollir l'agar mais sans le liquéfier (Oh et al, 2010 ; Bowman, 2011). Les données du tableau compilent les informations de description générale réalisées par différents auteurs (Tableau 8). Cependant, pour certaines études les résultats se contredisent. Ainsi, l'analyse de Nedashkovskaya (2004), lors de l'identification de *C. pacifica*, n'est pas prise en compte dans ce tableau.

Les milieux de culture employés dans les études sont le Marine agar, le *Cytophaga* agar et le Tryptone soja agar supplémenté de 20% en sels marins. La souche peut survivre à une conservation d'une semaine à 3°C et de 2h dans de l'azote liquide à -196°C (Lewin & Lounsbery, 1969). Le génome de la souche *C. lytica* LIM 21^T a été récemment séquencé (Pati et al, 2011).

Tableau 8. Informations sur la souche *C. lytica* selon différents auteurs (Lewin, 1969 ; Johansen et al, 1999 ; Bowman, 2000 ; 2006 ; Pati et al, 2011 ; Park et al, 2012).

Croissance		Substrats		Dégrade	
-2°C	-	D-Fructose	+	Agar	+
Gamme température	2-30°C	L-Fructose	+	Acide alginique	-
Temp optimale	22-30°C	D-Mannose	+	Carraguénane	+
Temp max	35-40°C	L-Arabinose	-v	Caséine	-v
pH	7-7,5	Xylose	-v	Carboxyméthylcellulose	+
Salinité tolérée	10-50‰	Cellulobiose	+	Cellulose (filtre)	-
		Fucose	+	Fibrinogène	-
Motilité « gliding »	+	N-acetylglucosamine	-	Elastine	-
		Mannitol	+	Amidon	+
Oxydase	+/-	Maltose,	+	Cellules de levures autoclavées	-
Catalase	+	Lactose	+	Gélatine	-/+
Anaérobie	-	Glycérol	+v	Chitine	-
Réduction nitrites	-	L-Rhamnose	-v	ADN	-
Réduction nitrates	-	Galactose	+	Tween 80	-v
H ₂ S	v	Glucose	+		
		Mellibiose	-		
Pigments		Raffinose	-	Susceptibilité	
Chlorophylle	-	Sucrose	-	Ampicilline	-
Flexirubine	-	Peptone	+	Carbénicilline	-/+
Saproxanthine	+	Casamino acides	+	Streptomycine	-
Phycobiline	-	L-Glutamate	+	Tétracycline	-
Zéaxanthine	+			Céphalothine	+
Caroténoïdes	+			Novobiocine	-

Cette espèce est très commune sur les côtes à travers le monde, dans les bassins à marée basse, sur la surface de macroalgues, associées aux microalgues, bryozoaire, sédiments et eau de mer (Lewin, 1969 ; Lewin & Lounsbury, 1969 ; Reichenbach, 1989 ; Johansen et al, 1999 ; Schäfer et al, 2000 ; 2001 ; Pukall et al, 2001 ; Schäfer et al, 2001 ; Skerratt et al, 2002). Les propriétés de formation de biofilms par *C. lytica* sont employées dans les tests antifouling de revêtements (Stafslie et al, 2006 ; 2007 ; Majumdar et al, 2008 ; 2011). Cette souche a également été utilisée dans une étude de contenance en acide uronique dans un biofilm (Mojica & Cooney, 2010). Les propriétés algicides de *C. lytica* envers un dinoflagellé toxique responsable de bloom en Australie, *Gymnodinium catenatum* ont été étudiées (Skerratt et al, 2002). *C. lytica* est capable de produire des exsudats extracellulaires qui lysent l'algue, mais elle peut également l'attaquer directement. Des attaques directes par attachement sur la cellule algales engendrent une lyse pour les espèces suivantes : *Chattonelamarina*, *Gymnodinium catenatum*, *Polarellaglaciola*. Une attaque indirecte par libération de substances provoque une lyse de ces souches ainsi que celle d'*Alexandrium minutum* (Skerratt et al, 2002).

III.2 Mentions d'iridescence de *C. lytica*

Les recherches d'articles portant sur les iridescences bactériennes n'ont pas permis de retrouver des articles mentionnant un phénomène chez les *Bacteroidetes*. Comme indiqué précédemment, les termes employés sont quelques fois vagues et n'entrent que très rarement dans les mots clés. Nous avons donc pu recueillir des descriptions d'iridescence seulement après avoir identifié les souches. Nous avons également souhaité étendre les recherches de mentions d'iridescence dans les ouvrages de systématique de références tels : « The Prokaryotes » et « Bergey's Manual of systematic bacteriology ». Les descriptions de l'ordre des *Cytophagales*, mais également des *Flavobacteriales* ont été inspectées en raison de la reclassification de la souche. Les mentions d'iridescence sont regroupées dans le Tableau 9, par ordre chronologique. Les données de la littérature nous indiquent que les études les plus anciennes sont quelques fois les plus détaillées (Lewin & Lounsbery, 1969 ; Reichenbach, 1989 ; 1992), l'information a étant perdue dans des versions plus récentes (Bernadet & Nakagawa, 2006 ; Bowman, 2006). La seule illustration de l'iridescence d'une *Cytophaga spp.* montre une faible couleur rouge des colonies. Par ailleurs, les informations sur l'effet ne sont pas incluses dans cet ouvrage (Reichenbach, 1981) mais dans le suivant (Reichenbach, 1992).

Le terme « iridescent » fut employé dans les ouvrages communs de descriptions de la bactérie et dans deux articles scientifiques qui ne visent pas à décrire la souche (Burchard & Sorongon, 1998 ; Skeratt et al, 2002). Dans les études récentes, portant notamment sur la reclassification de la souche, une teinte métallique est seulement décrite (Johansen et al, 1999). Plus important encore, aucune information sur l'iridescence n'est donnée dans l'étude génomique consacrée à la souche de référence LIM 21^T (=DSM 7489) (Pati et al, 2011). Au regard de ces informations, les ouvrages de référence ont été les plus adaptés à la recherche des mentions du phénomène. Lors des premiers isollements de souches de *C. lytica* (Lewin & Lounsbery, 1969), les auteurs ont décrit des teintes vertes précédemment mentionnées chez les bactéries de type *Myxobacter* (Winogradsky, 1929 ; Imshenetsky & Solntseval, 1936). Cependant ils précisent que ces effets n'étaient pas retrouvés pour leur souche et ajoutent des hypothèses sur la nature des phénomènes : la présence de chlorophylle bactérienne, la combinaison de pigment orange et de mélanine grise extracellulaire, et de façon intéressante un phénomène de réfraction par des patchs de cellules alignées. Aucune étude ne sera pourtant consacrée à préciser ces aspects.

Tableau 9. Mentions de l'iridescence de souches de *C. lytica* dans la littérature.

	Code souche	Mention d'iridescence	Type d'étude	Référence
<i>Cytophaga lytica</i> : Groupe <i>Flexibacteria</i>, Ordre <i>Cytophagales</i>, Famille <i>Cytophagaceae</i> et Genre <i>Cytophaga</i>				
<i>Cytophaga lytica</i>	B-9, WFB-21, BON, ENS, LIM-21 ^T	-	Premiers isollements	Lewin & Lounsbery, 1969
Ordre <i>Cytophagales</i>		Photo d'une <i>Cytophaga sp.</i> faiblement iridescente rouge	Description	Reichenbach, 1981 [#]
Ordre <i>Cytophagales</i>		-	Description	Reichenbach, 1989 [*]
Genre <i>Cytophaga sp.</i>		« reddish or greenish iridescence »		
Espèce <i>Cytophaga lytica</i>	ATCC 23178	« greenish iridescence or opalescence »		Reichenbach, 1992 [#]
Ordre <i>Cytophagales</i>		« greenish-reddish iridescent »		
Souches <i>Cytophaga sp.</i>	RB1058, RB1057	« green and red iridescent »	Inhibition de l'adhésion par des bactéries « gliding »	Burchard & Sorongon, 1998
<i>Cellulophaga [Cytophaga] lytica</i>	ATCC 23178	« metallic tinge »	Reclassification	Johansen et al, 1999
Reclassification:				
<i>Cellulophaga lytica</i> : Phylum <i>Bacteroidetes</i>, Ordre <i>Flavobacteriales</i>, Famille <i>Flavobacteriaceae</i> et Genre <i>Cellulophaga</i>				
<i>Cellulophaga lytica</i>	ACEM 21	« iridescent »	Activité algicide	Skeratt et al, 2002
Famille <i>Flavobacteriaceae</i>		-	Description	Bernardet & Nakagawa, 2006 [#]
Famille <i>Flavobacteriaceae</i>		-	Description	Bowman, 2006 [#]
Ordre <i>Flavobacteriales</i>		-	Description	Bernardet & Bowman, 2011 [*]
Famille <i>Flavobacteriaceae</i>		-		
Genre <i>Cellulophaga</i>		« greenish metallic iridescence or opalescence »		Bowman, 2011
<i>Cellulophaga lytica</i>	LIM-21 ^T	-	Séquençage	Pati et al, 2011
LIM-21 ^T (=DSM 7489 =CIP 103822 =ATCC 23178) et WFB-21 (=DSM 2040)				
Ouvrages de référence : * Bergey's Manual of systematic bacteriology ou # The Prokaryotes				

III.3 Motilité « gliding »

Ce mode de déplacement caractérise des nombreuses *Flavobacteriales*. Les surfaces sont des milieux importants pour les bactéries car les nutriments y sont concentrés. Les bactéries possèdent différents mécanismes de déplacement leur permettant d'atteindre et de se déplacer sur une surface. Certaines requièrent des appendices tels les flagelles pour les motilités « swimming » (nage) ou « swarming » (fourmillement), ou des pili pour le « twitching » (sautillement). Certaines souches dont la majorité sont dépourvues de ces appendices, se déplacent par « gliding » (glissement). Le terme « gliding » signifie glisser, ramper sur la surface de façon relativement rapide. De nombreuses bactéries issues de divers environnements emploient ce système de déplacement impliqué dans la colonisation des surfaces (Mc Bride, 2001; 2004 ; Harshey, 2003). Une relation positive entre la motilité par glissement et les capacités d'adhésion a été démontrée ; elle permettrait notamment aux espèces pathogènes de poissons (*Flavobacterium spp.* et *Tenacibaculum spp.*) de coloniser et d'envahir les tissus de leur hôte. Les bactéries « gliding » sont de plus étudiées pour leur production de métabolites secondaires actifs (Nett & König, 2007).

Plus précisément, la motilité « gliding » est décrite comme une translocation fluide de la cellule sur la surface selon un procédé actif qui dépense de l'énergie mais ne nécessite pas de flagelle. Les mouvements suivent l'axe longitudinal de la cellule. En plus de glisser sur la surface, les cellules peuvent également changer de sens de déplacement (réverser) et aussi s'attacher à une lame de verre par un pôle et faire des rotations rapides de deux révolutions par seconde. Pour certaines espèces les cellules tournent sur elles même en même temps qu'elles glissent. Les colonies de bactéries « gliding » sont caractérisées par des bords étalés fibreux à l'allure « déchiquetée ». Selon les souches, différents types de moteur cellulaire sont impliqués. Le « gliding » des *Myxobacteria* inclut différents mécanismes : le « gliding » social avec les pili de type IV et le « gliding » aventureux sans pili (Mauriello et al, 2010). Les cyanobactéries utilisent des pili et des polysaccharides. Le « gliding » des *Cytophaga-Flavobacterium* et des mycoplasmes ne requiert aucun appendice (Pate & Chang, 1979 ; Lapidus & Berg, 1982 ; McBride, 2001).

Les mécanismes du « gliding » spécifiques aux *Cytophaga-Flavobacterium* ne sont pas élucidés. La vitesse du « gliding » des *Cytophaga-Flavobacterium* est estimée entre 2 à 10 $\mu\text{m}/\text{secs}$. Deux modèles de machinerie ont été avancés pour la souche *F. johnsoniae*. Le premier implique l'import et l'export de macromolécules (polysaccharides ou protéines) à différents endroits, le long de la cellule, formant un « tapis roulant » et propulsant la cellule (Figure 20 A). Le deuxième mécanisme correspond à une structure « ratchet-like » (crochet avec un système de blocage) où des protéines du cytoplasme et du periplasme utilisent la force proton motrice pour propulser les protéines de la membrane externe sur un chemin fixé par des peptidoglycanes (Lapidus & Berg, 1982 ; McBride, 2001; 2004) (Figure 20B). Différents gènes du « gliding », gènes *Gld*, ont été identifiés chez *F. johnsoniae*. Récemment, le modèle de motilité « gliding » des Bacteroidetes a été corrélé avec un système de sécrétion qui implique entre autre une adhésine SprB (Nelson et al, 2008 ; Sato et al, 2010).

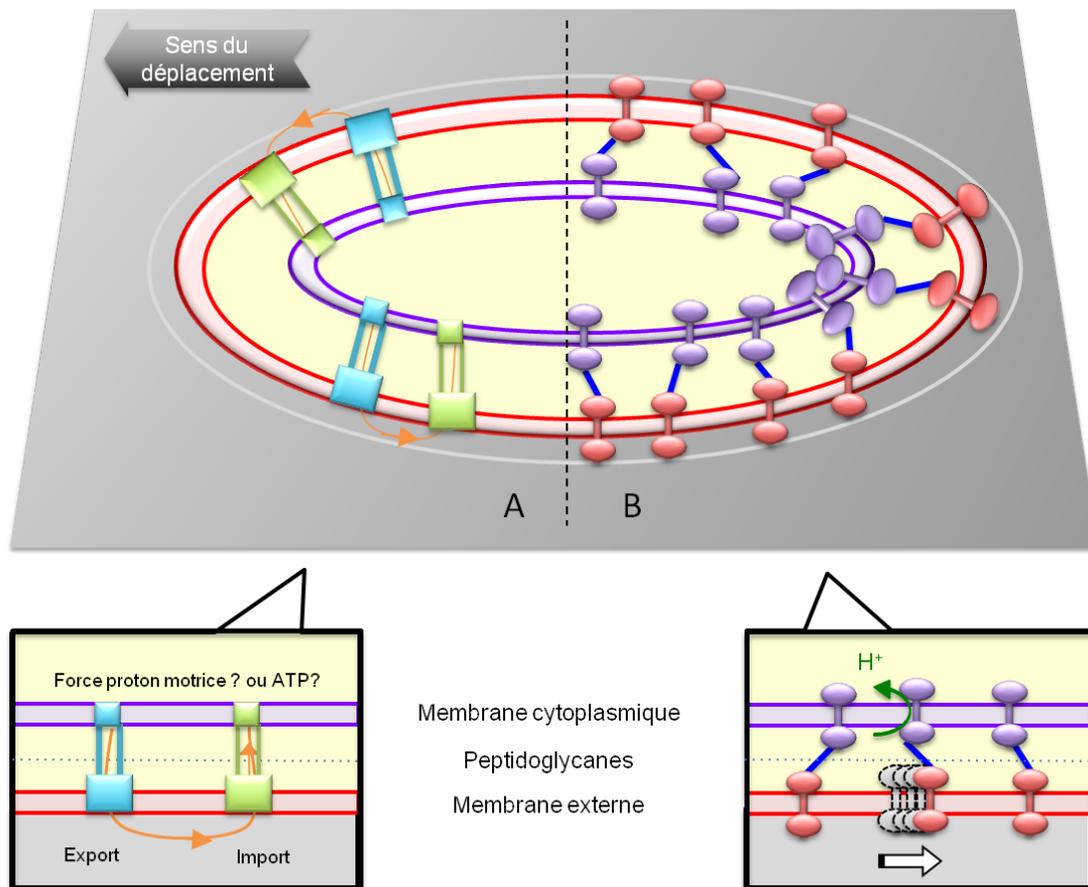
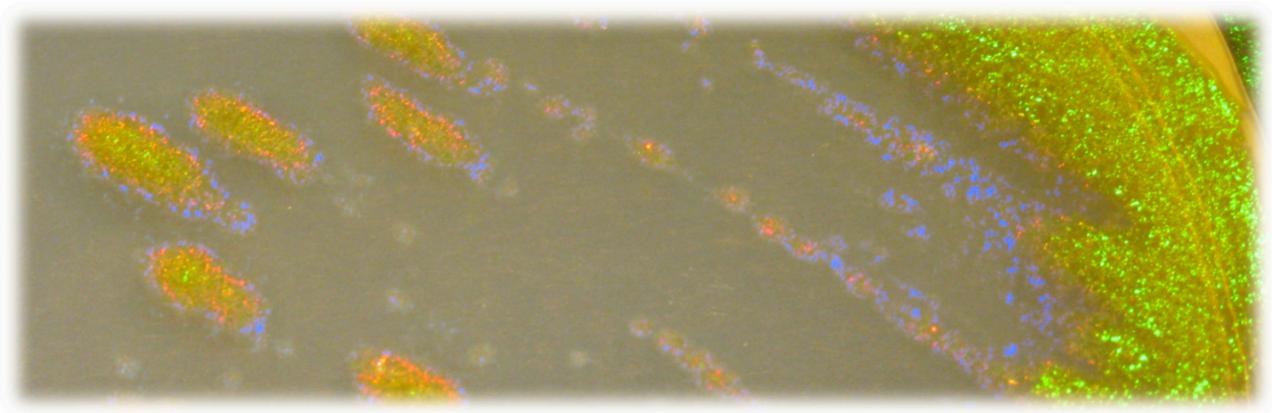


Figure 20. Deux modèles de machinerie « gliding » des *Cytophaga-Flavobacterium* (schéma adapté de l'étude de Mc Bride, 2004).

MATERIELS ET METHODES



I. Isolement de bactéries marines

I.1 Sites de collecte et échantillons prélevés

Les collectes d'échantillons marins permettant l'isolement de bactéries se sont déroulées sur la côte Atlantique de Charente maritime (France). La souche *C. lytica* étudiée fut isolée le 7 Décembre 2009 de la surface d'une anémone rouge, *Actinia equina*, lors d'une collecte dans la concession scientifique du phare de Chassiron sur l'Ile d'Oléron (Figure 21, position A).

Dans le Chapitre 4, une série de collectes a été menée afin d'étudier la distribution de bactéries iridescentes. Dans l'objectif d'explorer divers biotopes (estran rocheux, plages de sable et de rochers et vasières), les collectes se sont déroulées sur 7 sites entre la Tremblade et l'Ile de Ré, de Septembre à Décembre 2011 (Figure 21 et Tableau 10). Afin d'établir des relations entre les souches iridescentes et une niche écologique privilégiée, différents types d'échantillons ont été prélevés : eau de mer, sédiments, macroalgues (rouge, brunes et vertes), plantes marines, crustacés, mollusques, cnidaires, vers, éponges, échinodermes et déchets.

Tableau 10. Sites de collecte d'échantillons pour l'isolement de bactéries marines iridescentes.

Site	Ville	Date	Biotope	Nombre d'échantillons
A Phare de Chassiron	Chassiron, Ile d'Oléron	7.12. 2009	Estran rocheux	10
1 Plage Mus du loup	Ronce les bains, La Tremblade	29.09. 2011	Sable et rochers	6
2 Phare des baleines	St Clément des Baleines, Ile de Ré	24.10. 2011	Estran rocheux	51
3 Parc de Zoostère	Loix, Ile de Ré	3.11. 2011	Vase avec Zoostères	10
4 Plage de l'Arnérault	La Flotte, Ile de Ré	3.11. 2011	Sable et rochers	7
5 Belvédère	Chef de Baie, La Rochelle	3.11. 2011	Sable et rochers	9
6 Phare de Chassiron	Chassiron, Ile d'Oléron	15.11. 2011	Estran rocheux	31
7 Pointe de la Fumée	Fouras	29.11. 2011	Vase et sable avec huîtres	25
				<i>Total 149</i>

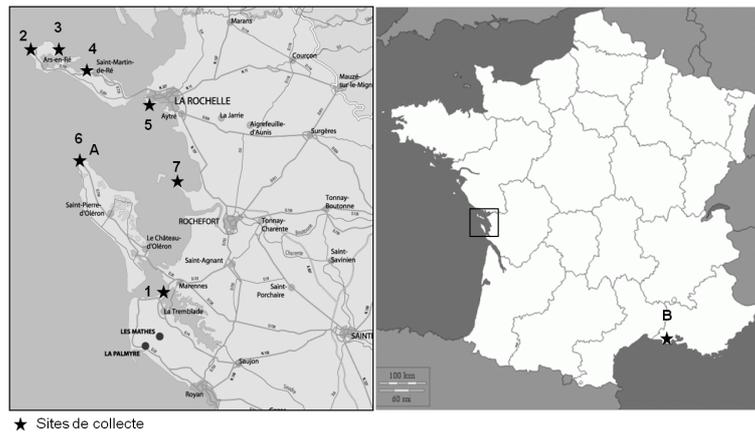


Figure 21. Carte des lieux de collectes d'échantillons marins, effectuées sur la côte Atlantique de Charente maritime (France), dans le but d'isoler des souches iridescentes.

I.2 Méthode d'isolement

Dans les méthodes d'isolement traditionnelles de souches environnementales, les échantillons sont rapportés au laboratoire et l'ensemencement des boîtes de culture n'est réalisé que par la suite. Toutefois, il est démontré que le confinement peut induire des changements de populations bactériennes (Schäfer et al, 2000). Lors de l'étude de la distribution des souches marines iridescentes, nous recherchions des informations sur leur abondance *in situ*. Une méthode d'ensemencement direct des échantillons fut mise au point. Cette méthode permettait d'autre part un gain de temps car les échantillons étaient inoculés rapidement *in situ*.

Les étapes de cette méthode d'inoculation directe sont illustrées dans la Figure 22. Les échantillons sont manipulés avec des gants stériles afin d'éviter les contaminations. Pour les inoculations d'eau, le côté de la boîte contenant la gélose est immergé quelques secondes. Les sédiments sont frottés directement sur la gélose en prenant une petite quantité sur le doigt. Pour les autres échantillons (macroalgues, organismes et déchets), une partie est découpée avec un scalpel stérile puis rincée dans un pot contenant de l'eau de mer artificielle stérile (artificial seawater ASW ; Instant Ocean[®] à 30 g.L⁻¹). Cette étape permet d'éliminer la microflore non spécifiquement associée et d'isoler préférentiellement les épibiontes. Le fragment d'échantillon est ensuite frotté sur la gélose. Les organismes collectés ont été identifiés sur place, à l'aide des guides de naturalistes, lorsque l'espèce était reconnaissable (Cabioc'h et al, 2006 ; Hayward et al, 2009).



Figure 22. Etapes de la méthode d'ensemencement *in situ* effectuées lors de l'isolement de souches marines. L'organisme est prélevé (1), une macroalgue brune dans l'exemple. Le fragment est rincé dans un pot stérile contenant de l'ASW (2), puis frotté directement sur une gélose (3). Ces étapes sont semblables pour l'ensemencement à partir d'une coquille de moule (A). Les sédiments sont directement frottés sur l'agar (B). La gélose est plongée quelques secondes dans l'eau (C).

Le milieu Marine agar a permis à l'isolement de *C. lytica* lors de la première collecte. Néanmoins ce milieu riche engendre une croissance très rapide des bactéries non-iridescentes. Il est par ailleurs démontré que des composés contenus dans les milieux riches, comme par exemple l'extrait de levure, nuisent à l'isolement de certaines souches de l'environnement (Buck, 1974 ; Button et al, 1993; Jensen et al, 1996). Le milieu d'isolement utilisé par la suite correspond au Cytophaga agar qui est moins riche (Lewin & Lounsbery, 1969). Sa composition est renseignée dans le paragraphe II.2.a (page 75). Les boîtes ensemencées *in situ* sont incubées à 20°C au laboratoire. Plusieurs colonies étaient visibles après 24h, les colonies iridescentes étant plus facilement repérées après trois jours de culture par une observation avec le montage en épi-illumination (voir IV.2.a, page 83).

La purification des souches est réalisée par méthode d'épuisement des colonies et de dilution. Les colonies issues de cultures solides de 24h sont suspendues dans 1 mL d'ASW stérile. Une série de dilution est effectuée, 100 μ L des solutions diluées à 10^{-8} et 10^{-10} sont ensuite déposés sur une nouvelle gélose. La conservation est réalisée en chambre froide à 4°C et dans des tubes à cryobilles (Dutscher[®]) à -20°C et -80°C à partir de cultures liquides sur du Marine broth.

II. Espèces bactériennes et culture

II.1 Souches

II.1.a Souches utilisées dans la comparaison des iridescences bactériennes

Plusieurs espèces bactériennes sont décrites iridescentes dans la littérature mais de façon ambiguë. Dans le Chapitre 1, l'iridescence des colonies de 74 souches est comparée. Elles proviennent du souchier du laboratoire LIENSs et de différentes collections de souches : CIP (collection de l'institut Pasteur basée à Lille, France), DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ, collection de microorganismes et de cultures cellulaires Allemande basée à Braunschweig), et LMG / BCCM (Collection de microorganisme Belge basé à Bruxelles, Belgique).

Les souches dont les colonies ont été précédemment décrites comme possédant un effet optique sont sélectionnées : *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcanivorax balearicus*, *Aneurinibacillus migulanus*, *Listeria spp.* et *Pasteurella multocida*. Des types bactériens (*Coli typhoïdes*, coques et bacilles) ont été corrélés avec une iridescence, c'est pourquoi les souches suivantes sont incluses : *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas stutzeri*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*. Des souches contrôles sans description d'iridescence font partie de l'étude : *Micrococcus luteus*, *Lactococcus lactis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Vibrio anguillarum* et *Vibrio lentus*. La liste détaillée des souches ainsi que leurs conditions de culture respectives sont exposées dans le Chapitre 1 (données supplémentaires de l'article 1, page 111). Certaines espèces étant des pathogènes de classe II, leur manipulation est exécutée avec le plus grand soin sous un poste de sécurité microbiologique en portant des gants et un masque.

II.1.b Souches issues du phylum *Bacteroidetes*

L'iridescence des colonies de souches membres du phylum *Bacteroidetes*, auquel appartient *C. lytica*, est comparée dans le Chapitre 3. Des descriptions générales et vagues d'iridescence sont recensées dans la littérature pour les espèces appartenant aux ordres *Flavobacteriales* et *Cytophagales*. Les bactéries précédemment mentionnées « iridescentes »

sont : *Flavobacterium flevensis*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Flavobacterium succinicans*, *Sporocytophaga cauliformis* et *Promyxobacterium flavum*. D'autres souches décrites avec des termes ambigus tels « glistening » ou « shine » sont incluses : *Flavobacterium aquatile*, *Maribacter dokdonensis*, *Psychroflexus gondwanensis* et *Flavobacterium hibernum*. Des bactéries de contrôle sans descriptions sont également utilisées : *Leeuwenhoekella marinoflava*, *Zobellia uliginosa* et *Flavobacterium degerlachei*. Toutes les souches du genre *Cellulophaga spp.* sont incluses : *C. lytica*, *C. baltica*, *C. tyrosynoxidans*, *C. pacifica*, *C. algicola*, *C. fucicola* et *C. geojensis*. Différentes souches de *C. lytica* sont également employées (voir paragraphe suivant). Au total 22 *Bacteroidetes* d'origines marines et terrestres ont été comparées. Des détails sur les souches, leurs origines, leurs descriptions antérieures d'iridescence et leurs conditions de culture sont résumées dans le premier tableau de l'article 3, page 136).

II.1.c Souches *Cellulophaga lytica*

La souche *C. lytica* isolée est dénommée *C. lytica BK* dans la première étude. Elle fut déposée et enregistrée en Mai 2012 dans la banque de souches « the Spanish Type Culture Collection » de l'université de Valence en Espagne, sous le code **CECT 8139**.

Différentes *C. lytica* sont comparées dans les Chapitres 1, 3 et 5. Quatre souches d'origine différentes ont été commandées : DSM 2039, DSM 2040, CIP 103822 et DSM 7489. Les deux dernières correspondent à la souche récemment séquencée LIM-21^T (Pati et al, 2011). Différentes bases de données ont été explorées afin de vérifier les correspondances entre ces souches (Tableau 11). Les éléments barrés dans ce tableau sont les affiliations détectées comme fausses.

II.2 Conditions de culture

Les températures d'incubation, renseignées précisément dans les chapitres correspondants, sont comprises entre 20°C et 30°C pour les souches marines et entre 20°C et 37°C pour les souches terrestres. Sauf information contraire, la concentration en agar des milieux gélosés est de 15 g.L⁻¹. Après réalisation, les milieux sont autoclavés 20 min à 115°C.

Tableau 11. Correspondances des différentes souches de *C. lytica* retrouvées dans les sites de référence des collections de souches.

Souche	Correspondance	Site internet de référence *
CECT 8139	Souche isolée dans cette étude	-
<i>Souches commandées</i>		
DSM 2040	ATCC 23169, <i>IFO 15986</i> , NBRC 15986	DSMZ
DSM 2039	<i>IFO 15985</i> , NBRC 15985, Cy 12	DSMZ
CIP103822	DSM 2039 , LMG 1344, NCIMB 1423	CIP
DSM 7489	ATCC 23178, IAM 14306	DSMZ
<i>Souches non commandées</i>		
ATCC 23178 TM	LIM-21	ATCC
LMG 1344	ATCC 23178, CIP 103822, DSM 7489, LIM-21, LMG 8371, NCIMB 1423, Cy 120	LMG / BCCM
LMG 8371	Plus disponible, correspond à LMG 1344	
LMG 13155	ATCC 23169, DSM 2040, WFB-21, Cy11	
JCM 8516T	ATCC 23178, CECT 5014, CIP 103822, DSM 7489, IAM 14306, <i>IFO 14961</i> , KCTC 2913, KCTC 2914, LMG 1344, LMG 8371, NBRC 14961, NCIMB 1423, VKM B-1433.	JCM
NCIMB 1423	ATCC 23178, CIP103822, DSM2039	NCIMB
NBRC 14961	<i>IFO 14961</i> , ATCC 23178, R.A. Lewin, LIM-21	NBRC
	ATCC 23178, CIP 103822, DSM 7489, JCM 8516, LMG 1344, VKM B-1433	JSCC
NBRC 15985	<i>IFO 15985</i> , DSM 2039, Cy 12	NBRC, JSCC
NBRC 15986	ATCC 23169, DSM 2040, LMG 13155, NCIMB 1395	JSCC
<i>Toutes les souches disponibles</i>		
	ATCC 23178, CECT 5014, CIP 103822, Cy 12, Cy 120, DSM 2039, DSM 7489, IAM 4306, 14961, <i>IFO 14961</i> , <i>IFO 15985</i> , INMI, JCM 8516, KCTC 2913, KCTC 2914, LIM-21 (Lewin), LMG 1344, LMG 8371, NBRC 14961, NBRC15985, NCIMB1423, NCMB1423, Cy 120 (Reichenbach), Cy12 (Reichenbach), Cy 12 (Reichenbach), VKM B-1433	Strain info
* Sites d'informations : Strain info et JSCC, Japan society for culture collections.		
Sites des banques de souches : ATCC, American Type Culture Collection basé en Virginie, USA ; CECT, Spanish Type Culture Collection basé à Valence, Espagne ; CIP, Collection de l'institut Pasteur basée à Lille, France ; DSMZ, Leibniz-Institut DSMZ, collection de microorganismes et de cultures cellulaires Allemande basée à Braunschweig. ; LMG / BCCM, Belgian co-ordinated collections of microorganisms basé à Bruxelles, Belgique ; JCM, Japan collection of microorganisms basé à Saitama, Japon ; NBRC (anciennement IFO), NITE Biological Resource Center basé à Chiba, Japon ; NCIMB, National Collection of Industrial Bacteria basé à Aberdeen, Royaume-unis.		

II.2.a Culture des bactéries marines

Culture sur milieu gélosé

Des milieux marins et salés servent à la culture des espèces marines. L'eau de mer artificielle (ASW) employée est obtenue par dissolution de 30 g de sels marins Instant Ocean[®] dans 1 L d'eau pure ce qui permet d'éviter la précipitation de certains sels. Le Marine agar (MA) est préparé à partir de bouillon Marine prêt à l'emploi (Dutscher[®]). Ce milieu n'est pas employé dans certaines analyses car il est trop riche. Le milieu privilégié pour les isolements, le Cytophaga agar (CYT ou CYT ASW) est composé de 1 g de tryptone, 0.5 g d'extrait de levure, 0.5 g de CaCl₂.2H₂O et 0.5 g de MgSO₄.7H₂O dans 1 L d'ASW (Lewin & Lounsbery, 1969 ; Johansen et al, 1999). La caséine normalement présente dans ce milieu est remplacée par du tryptone car *C. lytica* ne la dégrade pas. Le milieu pauvre, Low nutrient (LN ou LN ASW), contient exclusivement de l'agar et de l'ASW (Jensen et al, 1996). Le milieu eau de mer/levure/peptone (Seawater yeast peptone agar, SY) recommandé pour *Zobellia uliginosa* est composé de 5 g peptone, 3 g d'extrait de levure et 12 g d'agar dans 250 ml d'eau distillée et 750 ml d'ASW. Les milieux salés sont réalisés à partir des milieux prêts à l'emploi (Dutscher[®]) supplémentés en NaCl (concentration finale de 30 g.L⁻¹) : gélose nutritive salée (salted Nutrient Agar, sNA ou NA NaCl), trypticase de soja salée (TSA NaCl) et Luria-Bertani salée (LB NaCl).

Culture sur milieux noirs

Afin de réduire la perte d'intensité de l'iridescence par diffusion dans l'agar, des milieux noirs ont été élaborés. De l'encre noire Pappermate[®] filtrée (0.20 µm, membrane PES, Millipore) est ajoutée dans le milieu gélosé en surfusion dans une proportion de 1% (v/v).

Culture sur membrane

Cette méthode est adaptée à la culture de biofilms bactériens (Yan et al, 2003). Dans la partie inférieure d'une petite boîte de Pétri (35 mm de diamètre), 5 mL de MB (Marine Broth, Dutscher[®]) sont versés. Une membrane en nylon (0.2 µm, GNWP, Millipore), précédemment autoclavée, recouvre la boîte et vient au contact du milieu. Par la suite, 10 µL de suspension liquide de la souche à 1 uDO_{600nm} sont inoculés sur la membrane et étalés à l'aide d'un râteau. Ce dispositif est placé dans une boîte de Pétri de plus grande taille (55 mm de diamètre) pour conserver la stérilité, puis le tout est incubé à 25°C.

II.2.b Culture des bactéries terrestres

Tous les milieux sont préparés dans 1 L d'eau distillée. Les milieux destinés à la culture de souches terrestres correspondent aux mélanges prêts à l'emploi (Dutscher[®]) de gélose nutritive (Nutrient Agar, NA), trypticase de soja (TSA), bouillon cœur-cerveille (Brain Heart, BHA) et Luria-Bertani (LB). Certains milieux sont élaborés : le tryptose agar (TrypA) est composé de 20 g de tryptose, 1 g de glucose et 5 g de NaCl ; il est indiqué dans la culture des *Listeria spp.* (Luppi et al, 1986). Le Tween-peptone agar (TPA) contient 10 g de Tween 20, 10 g de peptone, 5 g de NaCl et 0.1 g de CaCl₂.2H₂O pour la croissance de la souche *Alcanivorax balearicus* (Rivas et al, 2007). Spécifique à l'espèce *Haemophilus influenzae*, le milieu Levinthal's XV (Lev XV) est préparé avec 10 g de peptone A, 10 g d'extrait de viande, 5 g de NaCl et 20 g d'agar. Un supplément de 15 mg de facteur X (hémine) et V (NADH) est ajouté après autoclavage. Ces solutions sont préalablement stérilisées par filtration (0.20 µm, membrane PES, Millipore) (Pittman, 1931 ; Engboeck, 1950).

Les milieux indiqués dans la culture des *Bacteroidetes* terrestres sont : le milieu CY-agar (CY) composé de 3 g de casitone, 1.36 g CaCl₂.2H₂O et 1 g d'extrait de levure (Reichenbach, 1989). Recommandé pour *Flavobacterium flevensis*, C/10 contient 3 g de casitone et 1.36 g de CaCl₂.2H₂O (van der Meulen et al, 1974). Le milieu *Flavobacterium aquatile* (Flav) est préparé par l'addition de 2 g de Na-caseinate, 0.5 g d'extrait de levure, 1 g de protéose peptone et 0.5 g de K₂HPO₄ (Weeks, 1955 ; Reichenbach & Dworkin, 1981).

II.2.c Facteurs abiotiques testés

Besoin en eau de mer

La nécessité des sels marins dans la composition du milieu est testée à partir des milieux salés. Les sels marins remplacent le NaCl et inversement. La concentration finale est fixée à 30 g.L⁻¹, ce qui correspond à la salinité marine moyenne. Pour permettre la distinction des milieux marins composés d'eau de mer et des milieux salés contenant du chlorure de sodium, les notations respectives ASW (Artificial seawater) et NaCl sont précisées pour chaque milieu. Les milieux expérimentés sont : CYT ASW/NaCl, LN ASW/NaCl, NA ASW/NaCl, TSA ASW/NaCl et LB ASW/NaCl.

Salinité

La modulation de l'iridescence lors d'une augmentation de la salinité est réalisée par ajout de NaCl au milieu MA. Ce milieu riche est utilisé pour ne pas ajouter de stress supplémentaire à la souche. MA possède une concentration initiale de 30 g.L⁻¹, ainsi les tests de salinité débutent avec cette concentration. Les concentrations finales totales ont variées de 30 g.L⁻¹ à 70 g.L⁻¹, ce qui correspond à une supplémentation en NaCl de 10 g à 50 g par litre.

Minéraux et substrats

L'étude de l'effet de certains sels et extraits protéiques s'est déroulée en utilisant les milieux de base LN ASW, CYT ASW et NA NaCl. Le calcium et le magnésium sont testés dans l'induction ou l'inhibition de l'iridescence. Ces éléments sont ajoutés ou retirés, de façon individuelle ou combinée, aux milieux CYT NaCl et NA NaCl. Les milieux obtenus sont : CYT NaCl -Ca, CYT NaCl -Mg, CYT NaCl -Ca-Mg, NA NaCl +Ca, NA NaCl +Mg et NA NaCl +Ca+Mg. Les proportions employées sont celles utilisées dans la conception du milieu CYT. L'effet des extraits protéiques a été étudié sur milieu LN supplémenté en tryptone (LN Tryp ASW) ou en extrait de levure (LN Ye ASW).

Concentration en agar

L'iridescence des colonies en fonction de la solidité du milieu est analysée à différentes concentrations d'agar. Ces concentrations varient de 2.5 g.L⁻¹ à 30 g.L⁻¹ dans du MB. Ce milieu est employé car il est riche et n'induit pas de stress supplémentaire. Pour les concentrations élevées, des stress hydrique et osmotique sont également à prendre en compte.

Température d'incubation

Les cultures sont incubées dans plusieurs étuves pour des températures allant de 25°C à 60°C. Deux salles thermostatées permettent d'obtenir les températures de 20°C et 15°C. Les cultures à 5°C et 0°C sont réalisées respectivement dans un frigo et un freezer.

Oxygénation

Des jarres adaptées contenant des sachets CAMPYGEN ou ANAEROGEN (Oxoid®) permettent de tester les conditions respectives d'hypoxie et d'anaérobie. La présence ou non d'oxygène dans ces conditions est contrôlée par l'indicateur d'anaérobiose OXOID BR0055 (Oxoid®). Cette bandelette disposée dans la jarre est rose en hypoxie et devient blanche en condition anoxique.

Exposition à la lumière

Différents cycles de lumière sont testés. La condition de lumière permanente se déroule dans une pièce allumée durant 24h. Les autres modes expositions se réalisent dans une pièce noire. Lors du test cyclique 12h/12h lumière/obscurité, une lampe est branchée à un minuteur.

Orientation de la boîte

L'influence de la gravité est expérimentée par différentes orientations de la gélose. Les boîtes de culture sont orientées à 45°, 90°, 0° et 180° par rapport au plan de la paillasse et calées par un carton.

II.3 Coloration de Gram

L'observation des cellules après coloration de Gram permet de comparer les différences de morphologie cellulaire dans plusieurs conditions. Après une culture de 24h sur milieu solide, une colonie est re-suspendue dans 1 mL d'ASW. Une goutte de suspension cellulaire est déposée sur une lame de verre. Après séchage à température ambiante, les cellules sont fixées à l'éthanol 95° sous flamme. La coloration du frottis s'effectue par différents bains :

- | | | |
|---|-----|--------|
| - Immersion dans une solution de Crystal violet | | 1 min |
| - Rinçage à l'eau distillée | | |
| - Immersion dans une solution de Lugol | x 2 | 30 sec |
| - Décoloration à l'éthanol 95° | | |
| - Rinçage à l'eau distillée | | |
| - Ajout de deux gouttes de Fushine | | 30 sec |
| - Rinçage à l'eau distillée | | |

Les cellules colorées sont observées au microscope optique Leica DMRB (caméra Leica microsystems CMS GmbH D-35578 Wetzlar) aux grossissements x40 ou x100.

III. Analyses génétiques

III.1 Identification des souches

III.1.a Extraction et amplification de l'ADN

Ces analyses ont été réalisées lors d'une collaboration avec le Dr Hélène Agogué et Céline Lavergne du laboratoire LIENSs. Plusieurs colonies sont prélevées d'une culture CYT de 24h, puis transférées dans un Eppendorf contenant 1 mL d'eau pure stérilisée par autoclavage (121°C, 15 min), filtration (0.20 µm, membrane PES, Millipore) et exposition aux UVs (5h). Les suspensions sont soumises à trois cycles de chocs thermiques comprenant un bain d'azote liquide (-196°C, 2 min) et un bain à 60°C (2 min). La réaction d'amplification est réalisée directement à partir de cette suspension. Les amorces pour le séquençage sont le 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') et le 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). Elles s'hybrident sur des régions conservées situées au début et à la fin de l'ADNr 16S bactérien et permettent d'amplifier un fragment d'environ 1500 pb.

Les produits suivants sont rassemblés dans un volume total de 50 µL : 2 µL de suspension bactérienne, 20 µM de chaque amorce (27F et 1492R), 20 µL de mix PCR (DyNAzyme II, Finnzymes) et 50 µL d'eau ultra-pure stérile. Le mix DyNAzyme II DNA Polymerase contient 10 mM de Tris-HCl (pH 8.8 à 25°C), 1.5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl et 0.1 % de Triton[®] X-100.

La lyse des parois cellulaires, rendant l'ADN accessible aux produits de la réaction d'amplification, est réalisée par traitement thermique pendant le pré-cycle de PCR de 10 min à 95°C. L'amplification s'effectue grâce à l'appareil TECHNE TC-5000 (Bibby Scientific) en utilisant le programme suivant : 15 min à 95°C pour la dénaturation, puis 35 cycles comprenant 3 phases : 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min à 55°C (hybridation) et 1 min à 72°C (élongation). Une étape d'élongation finale a lieu pendant 9 min à 72°C, puis une étape de refroidissement à 4°C pendant 15 min.

Les solutions d'amplification sont analysées par électrophorèse sur un gel à 1% d'agarose. Un marqueur de taille (1 kb DNA Ladder, Promega) permet de vérifier la taille de l'amplification (1500 pb).

III.1.b Séquençage et analyse des données

Les séquençages sont réalisés par des prestataires de service spécialisés (GATC ou Genoscreen). Dans un premier temps, et dans un souci d'économie, toutes les souches sont séquencées uniquement sur la première partie du fragment avec l'amorce 27F (Réaction Forward). La réception des données se fait sous forme informatique, un fichier est généré pour chaque clone. Les séquences correspondant à des clones de la même station sont tous regroupés dans un seul fichier grâce au logiciel gratuit BioEdit® (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Ce fichier est utilisé pour créer des groupes de séquences similaires avec le logiciel exécutable Mothur (http://www.mothur.org/wiki/Mothur_manual; Schloss, 2009). Ce logiciel génère des alignements et un fichier avec des groupes de séquences classés par degré de similarité. Les alignements obtenus sont comparés à une base de données américaine NCBI regroupant des séquences du monde entier annotées par les chercheurs. Des blasts sur NCBI sont réalisés afin de choisir un degré de similarité acceptable pour la création des groupes. Le plus souvent, nous avons regroupé des séquences similaires à 97 - 99%. Un représentant de chaque groupe est soumis à une banque de données puis séquencé à nouveau avec l'amorce 1492R pour obtenir le gène 16S entier (Réactions Reverse). Ainsi, des séquences d'environ 1300 paires de bases sont formées grâce au logiciel DNAbaser et considérées comme représentant de chaque groupe de souches. Ces représentants sont ensuite de nouveau soumis à la base de données NCBI et les trois séquences les plus proches de chacune ont été retenues.

III.1.c Séquençage de la souche *C. lytica* CECT 8139

Pour l'identification taxonomique de la souche *C. lytica* CECT 8139, un séquençage plus détaillé est effectué par la société Genoscreen. Les analyses complémentaires de l'ADNr 23S et de la zone de l'espaceur interne transcrit 2 (ITS2) sont réalisées avec les primers : F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), R1 (5'-GTATTACCGCGGCT GCTGGCAC-3'), F2 (5'-CTCCTACGGGAGGCAG-3'), R2 (5'-GA CACGAGCTGACGACA-3'), 23SF (5'-AACCCGTTGA CGTTGAAAAG-3'), 23SR (5'-CTTGCTTTTCTCGGAGGATG-3'), ITSF (5'-TAGAGGTCGGCAGTTCGAGT-3') et ITSR (5'-ATCTTCA ATATGCCGGGTTG-3') (Weisburg et al, 1991). Les séquences sont ensuite comparées dans la base de données du NCBI et de LeBibi (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>) utilisant le service BLAST service pour déterminer l'identité phylogénétique de la souche.

III.2 Etude de phylogénie

Les séquences des souches isolées dans le Chapitre 4 sont placées dans un arbre phylogénétique. L'analyse phylogénétique réalisée se base sur une procédure proposée par Peplies et al (2008). Les séquences obtenues sont analysées grâce au logiciel ARB (version Novembre 2011) (Ludwig et al, 2004) et l'utilisation d'une base de données est créée à partir de séquences importées de la base de données SILVA (Pruesse et al, 2007). Les séquences sont automatiquement alignées grâce à l'outil en ligne SINA (v 1.2.9). L'alignement est ensuite affiné manuellement afin de repérer des erreurs de séquençage ou d'alignement automatique en tenant compte de la structure secondaire de l'ARNr. La création de l'arbre est menée en comparant les arbres obtenus selon différentes méthodes, par la méthode du Neighbour-Joining (ARB), le maximum de parsimonie PHYLIP v 3.6a3 (Felsenstein, 2007) et la méthode du maximum de vraisemblance PHYML v2.4.5 (Guindon & Gascuel, 2003). La typologie des arbres est testée avec l'application de différents filtres des positions les plus conservées concernant les bactéries (conservées à 30, 40 et 50%). L'arbre final est construit avec 44 séquences grâce à 1373 colonnes retenues par le filtre des positions conservées à 40% appliqué selon la méthode du maximum de vraisemblance (modèle : GTRGAMMA). Lorsque des ambiguïtés existent entre les différentes méthodes, les embranchements douteux sont modifiés manuellement afin de signifier que leur positionnement ne pouvait être résolu de façon robuste.

IV. Observations de l'iridescence

IV.1 Méthode d'inoculation

IV.1.a Inoculation en strie

Afin d'observer au mieux l'iridescence des colonies, une méthode d'inoculation a été mise au point. Une colonie issue d'une préculture de 24h est repiquée en traçant une strie de 5 cm de longueur à l'aide du bout pointu de l'anse (Figure 23). Cette méthode permet d'avoir une culture homogène et facilite la photographie du phénomène, plus complexe à mettre en œuvre avec des colonies de tailles diverses. Elle permet d'autre part d'observer plus finement les différentes couleurs d'iridescence en raison de l'épuisement de la colonie. L'expérience est systématiquement dupliquée.

IV.1.b Test en gouttes

Pour les tests de densité cellulaire, une inoculation en goutte est privilégiée (Figure 23). Une colonie issue d'une préculture de 24h est suspendue dans de l'eau de mer stérile (ASW). Après mélange par vortex, la densité optique à 600 nm est normalisée à une unité DO par l'ajout d'ASW. Des dilutions en série de 10^{-1} à 10^{-8} sont effectuées avec de l'ASW. Deux gouttes de 10 μ L sont ensuite déposées sur la gélose pour chaque dilution.

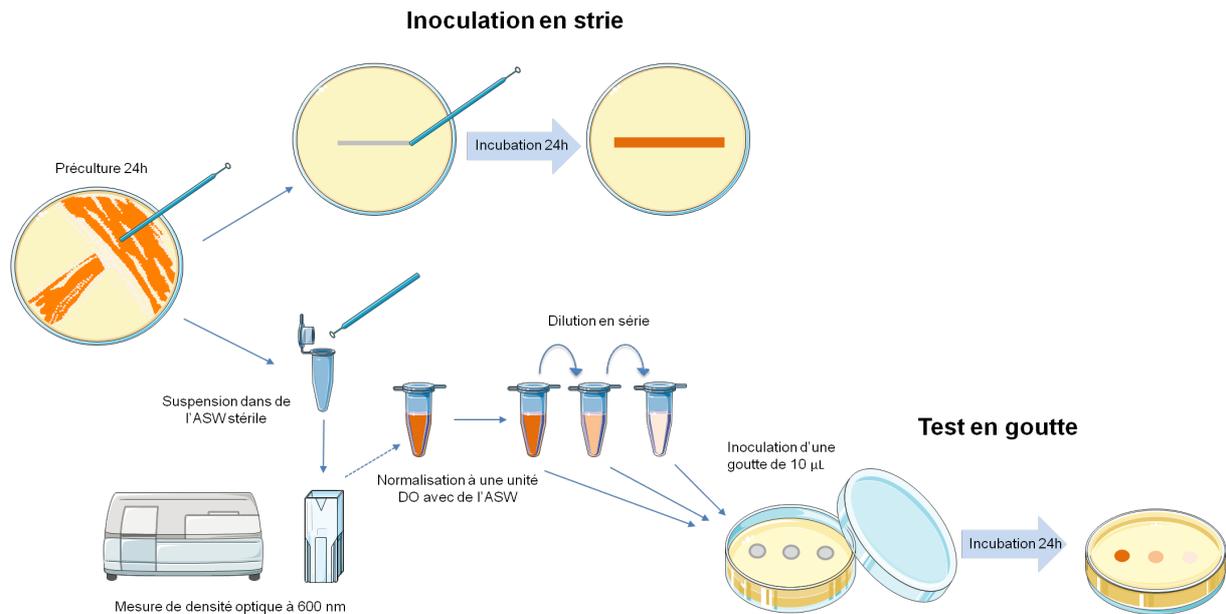


Figure 23. Méthodes d'inoculation en strie ou en goutte employées dans l'observation de l'iridescence.

IV.2 Observations macroscopiques de l'iridescence bactérienne

L'iridescence est une couleur structurale dont les caractéristiques principales sont des couleurs brillantes et un changement de coloration selon l'angle d'observation ou d'illumination. Seulement trois montages d'illumination transmise des colonies sont répertoriés dans la littérature. La mise au point technique de montages adaptés fut nécessaire. Deux dispositifs permettant une observation et une photographie de l'iridescence transmise (transillumination) et directe (épi-illumination) ont été élaborés et sont utilisés dans la comparaison des iridescences bactériennes. La prise de vue photographique a pu être améliorée au cours des expériences. Par conséquent, deux appareils photographiques et types d'illumination sont utilisés pour les observations macroscopiques.

Dans le Chapitre 1, l'appareil photo numérique employé est un Canon Powershot A650 IS image stabilizer AiAF sur le programme Av, la taille de l'image est de 12.1 megapixels en mode superfin et la lentille positionnée en macro. L'éclairage est assuré par une lampe possédant une ampoule de 11 watts, E14 220 - 240 V (532 lumens à 2700 K). Dans les expériences suivantes, l'appareil photo est remplacé par un boîtier Nikon D5100 avec un objectif Nikon AFS Micro Nikkor 40 mm sur le programme A avec une f 22, la taille de l'image est de 12.1 megapixels. Cet objectif permet d'obtenir des images plus nettes. La source de lumière correspond à une lampe intégrée à une unité (Kaiser RB 218N HF copy lighting unit) de 18 watts, 5400 Kelvin, AC 220 - 240 V. Le spectre de la lumière est plus complet avec cet éclairage.

IV.2.a Observation en épi-illumination

Le principe d'observation de l'iridescence bactérienne en lumière directe repose sur l'éclairage concentré et oblique de la colonie. Dans une pièce noire, la boîte de culture est placée sur un fond noir et éclairée sur le dessus. Le couvercle de la boîte est retiré lors de la prise de vue. L'appareil photographique est positionné à un angle de 45° par rapport à la surface des colonies. Deux montages ont été utilisés (Figure 24) et un schéma de ces dispositifs a été inclu dans les données supplémentaires de l'article 1 (page 109). Pour l'observation des changements de coloration selon l'angle d'illumination, cinq positions sont disponibles, avec des angles approchant 22.5°, 67.5°, 90°, 112.5° et 135°. Dans cette expérience, la souche est incubée à 20°C afin d'obtenir une croissance moins rapide, ce qui favorise l'observation des différentes couleurs. Pour les analyses nécessitant un angle optimisé pour l'observation de l'iridescence, l'angle de 67.5° est conservé. Dans le deuxième montage, cet angle d'illumination est de 60°.

IV.2.b Observation en transillumination

Dans la littérature, ce type d'observation est le plus décrit. La boîte de culture contenant les colonies est positionnée entre la source lumineuse et l'observateur. Le montage de transillumination comprend une culture positionnée à la verticale, illuminée par une lampe à 90° au dos de la boîte. L'appareil photo est placé à un angle de 45° par rapport au plan de la boîte (Figure 25). Un schéma de ce dispositif est compris dans les données supplémentaires de l'article 1 (page 109).



Figure 24. Montages pour l'observation de l'iridescence de colonies bactériennes en épi-illumination. Le montage n°1 est amélioré par la suite (montage n°2).



Figure 25. Montage pour l'observation de l'iridescence de colonies bactériennes en transillumination.



Figure 26. Le microscope Keyence est composé d'une unité objectif-caméra pouvant s'orienter, relié à un ordinateur et une console (<http://www.keyence.fr>).

IV.3 Observations microscopiques

Dans le but de caractériser l'iridescence des colonies de *C. lytica*, des observations microscopiques en épi-illumination ont été réalisées grâce à l'utilisation d'un microscope numérique de la société Keyence (Figure 26). Cet appareil, en prêt pour l'occasion, est simple d'utilisation et possède des outils intéressants pour nos expérimentations : illumination oblique, variation de l'illumination, rotation du socle et de la caméra. La caméra VHX-1100 est reliée à l'objectif VH-Z20R/Z20W couplé à la lentille. Les agrandissements correspondent aux x20, x30, x50, x100 x200 et x400, le dernier est un zoom de la caméra à partir du x200. Ce microscope possède un capteur CCD de 54 millions de pixels, l'acquisition se fait par balayage de pixels. La caméra capture les données RVB pour chaque pixel. Des vidéos de 15 images par secondes sont également acquises.

IV.3.a Observation des colonies

Lors de l'observation microscopique optimisée de l'iridescence, la caméra est orientée à un angle de 60° par rapport au plan de la boîte grâce au support VH-S30. Par ailleurs, cette orientation permet d'éviter les réflexions spéculaires de l'agar visibles pour des angles supérieurs. Dans cette configuration, le plan focal est central et les zones à proximité sont floues. L'outil numérique DEPTH UP/3D (depth-from-defocus *DFD* : profondeur par évaluation du flou) permet d'obtenir une image avec la majorité des plans focaux nets ce qui améliore la qualité des photographies.

IV.3.b Variations de l'angle d'illumination

Le changement de coloration selon l'angle d'éclairage est observé à un niveau microscopique. La caméra, cette fois placée à la verticale (90° par rapport au plan de la boîte), est équipée d'une bague d'éclairage VH-K20 variant l'angle de la lumière. Par rotation de cet anneau, la lumière est modulée progressivement d'une orientation verticale (directe sur les colonies) à horizontale (rasante).

IV.3.c Rotation de la caméra ou de l'échantillon

L'observation de l'iridescence en fonction de l'angle d'observation est réalisée avec le support VH-S30 de la caméra ; celui-ci peut effectuer une rotation de -70° à $+70^{\circ}$ autour de la colonie. La source lumineuse étant intégrée à la camera, l'angle d'illumination est, par la même occasion, modifié.

Afin de visualiser l'iridescence de la colonie, des vidéos sont enregistrées lors d'une rotation de l'échantillon. Le socle peut pivoter à 360° autour de son axe. Les prises de vue pour ces analyses se sont déroulées avec un angle de la camera de 60° , en mode vidéo.

V. Observation de la motilité « gliding »

Certaines bactéries du phylum *Bacteroidetes* ont la particularité d'être motiles par « gliding ». Les cellules glissent rapidement sur le milieu. Ce mode de déplacement implique une invasion rapide du substrat qui se traduit par des bords de colonies typiques « déchiquetés » et peut être observé au niveau macroscopique à la loupe binoculaire. Le déplacement des cellules est suivi au microscope inversé. Ces expérimentations ont été conduites lors de missions de collaboration avec le Dr Tâm Mignot et le Dr Adrien Ducret du Laboratoire de chimie bactérienne CNRS-UMR 7283 à Marseille.

V.1 Motilité des colonies

Pour l'observation des bords des colonies, des cultures de 24h sont placées sous la loupe binoculaire équipée d'une caméra Olympus SZ61 stéréomicroscope. Une source secondaire de lumière intense SCOTT KL 1500 (halogène, 150 W) permet un éclairage direct. Le grossissement de la loupe est maximal (échelle de 340 pixels/mm). Les photographies sont prises toutes les minutes durant 20 min. La loupe binoculaire possède un dispositif de transillumination qui ne permet pas une bonne visualisation de l'iridescence. En combinant un faible éclairage transmis et l'éclairage secondaire sur le centre de la colonie, l'iridescence peut alors être distinguée afin de permettre l'observation de la formation des paillettes.

V.2 Motilité cellulaire

La motilité par glissement des cellules est suivie grâce à un microscope inversé TE2000-E-PFS (Nikon, France) (Ducret et al, 2009). La mise au point automatique est assurée par un montage « The Perfect Focus System » (PFS) qui maintient une zone définie dans le plan focal en dépit de perturbations mécaniques ou thermiques. Les images sont enregistrées avec une caméra CoolSNAP HQ 2 (Roper Scientific, Roper Scientific SARL, France) et un objectif 40x/0.75 DLL « Plan-Apochromat » ou 100x/1.4 DLL. L'utilisation d'un microscope inversé nécessite une surface plane pour la mise au point. Après 24h d'incubation, un morceau de culture sur agar est découpé à l'aide d'un scalpel stérile. La partie contenant les colonies est disposée au contact d'une lamelle de verre. Plusieurs essais ont confirmé que cette méthode est la plus adaptée même si elle induit un léger aplatissement du biofilm. Les séquences comprennent 1 photo toutes les 3 secondes durant 3 minutes. Des films continus de 3 minutes sont également enregistrés.

VI. Microscopie électronique à transmission (MET)

Un des objectifs majeurs de ce travail de thèse fut d'étudier la structuration périodique au sein des colonies de *C. lytica*. Des essais préliminaires en microscopie confocale ont été expérimentés. Cette technique a été abandonnée en raison de la difficulté de marquage des cellules et leur motilité rapide. Des analyses en microscopie électronique à transmission (MET) ont donc été entreprises afin de répondre à cet objectif.

Le principe de préparation des échantillons pour la MET réside dans plusieurs étapes (une fixation, une déshydratation, une imprégnation, une réalisation de blocs et de coupes). Les études en MET emploient le plus souvent des suspensions bactériennes. Le sujet de l'étude était ici un biofilm bactérien se développant sur une gélose d'agar salée. Lors des différentes étapes de préparations, les colonies peuvent être diluées voir détachées de l'agar et les structures iridescentes perdues. Différents essais ont donc été réalisés afin de définir un protocole reproductible de préparation des colonies permettant de conserver au mieux l'intégralité du biofilm. Un protocole adapté d'inclusion dans de l'agar a été élaboré pour ce type d'échantillon. Les analyses ont été réalisées dans les installations du Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP, Ifremer, La Tremblade) avec le soutien du Dr Tristan Renault.

VI.1 Préparation des colonies pour la MET

VI.1.a Réactifs

Plusieurs solutions sont nécessaires dans la préparation des échantillons en MET. Leur composition est détaillée dans le Tableau 12. Les échantillons traités étant d'origine marine, nous avons travaillé à une pression osmotique de 1100 mOsm.

Tableau 12. Solutions utilisées dans la préparation de MET.

Substances	Quantité/volume
Solution NaCl 10% (Pour 100 ml)	
NaCl	10 g
Eau pure	100 mL
Solution Cacodylate de sodium 0.4 M (Pour 100 ml)	
Cacodylate de sodium 4% (PM 214.05)	8.6 g
Eau pure	100 mL
Solution Glutaraldéhyde 3% * (Pour 20 mL) 1100 mOsm	
Glutaraldéhyde 25% **	2.5 mL
Solution Cacodylate 0.4 M	5 mL
Solution NaCl 10%	3.5 mL
Eau pure	9 mL
Tampon Cacodylate * (Pour 20 mL) 1100 mOsm	
Solution Cacodylate 0.4 M	10 mL
Solution NaCl 10%	4 mL
Eau pure	6 mL
Ajuster le pH 7.4 avec HCl	
Solution Tétroxyde d'osmium 1% *	
Tétroxyde d'osmium 4%	1 volume
Solution Cacodylate 0.4 M	1 volume
Solution NaCl 10%	1 volume
Eau pure	1 volume
<i>Si le tétroxyde d'osmium est rose ou noircit il faut le jeter</i>	
Mélange résine Epoxy <i>Pipetter avec un cône découpé au bout</i>	
Epon	24.64 g
DDSA (Dodecyl succinic anhydre)	12.4 g
MNA (Methylnorbornene-2,3-dicarboxylic anhydre)	12.4 g
DMP3O (2,4,6-Tris (dimethyl-aminomethyl) phénol)	0.6 g
Solution Acétate d'uranyl 4% / Ethanol	
Acétate d'uranyl 4%	1 volume
Ethanol 50%	1 volume
Solution Citrate de plomb	
Eau distillée bouillie	16 mL
Citrate de plomb à 1 M (375 g/L)	2 mL
Nitrate de plomb 1 M (331 g/L)	2 mL
NaOH à 1 M (40 g/L)	4 mL

* : conservation à 4°C, ** : conservation à -20°C

VI.1.b Etapes de préparation des échantillons

Avant de subir les différentes étapes de préparation en MET, les colonies sont incluses dans une bulle d'agar. Les étapes de cette méthode sont schématisées dans la Figure 27. Des petits blocs de culture sur gélose d'environ 3 mm sont découpés à l'aide d'un scalpel stérile. Des tubes de gélose marine molle (6 g.L⁻¹ d'agar dans de l'ASW) sont conservés en surfusion après autoclavage. Refroidie dans un bain marie à 40°C, cette gélose est versée sur le fragment de colonie, formant une bulle d'agar protectrice de l'échantillon. Les colonies ainsi incluses dans l'agar ne seront pas éliminées lors des différentes étapes de préparation en MET. Plusieurs bulles sont réalisées et immergées directement dans les réactifs. La préparation étant longue, il est possible de s'arrêter en cours (étape notée *STOP OK*) et de suivre les instructions de conservation.

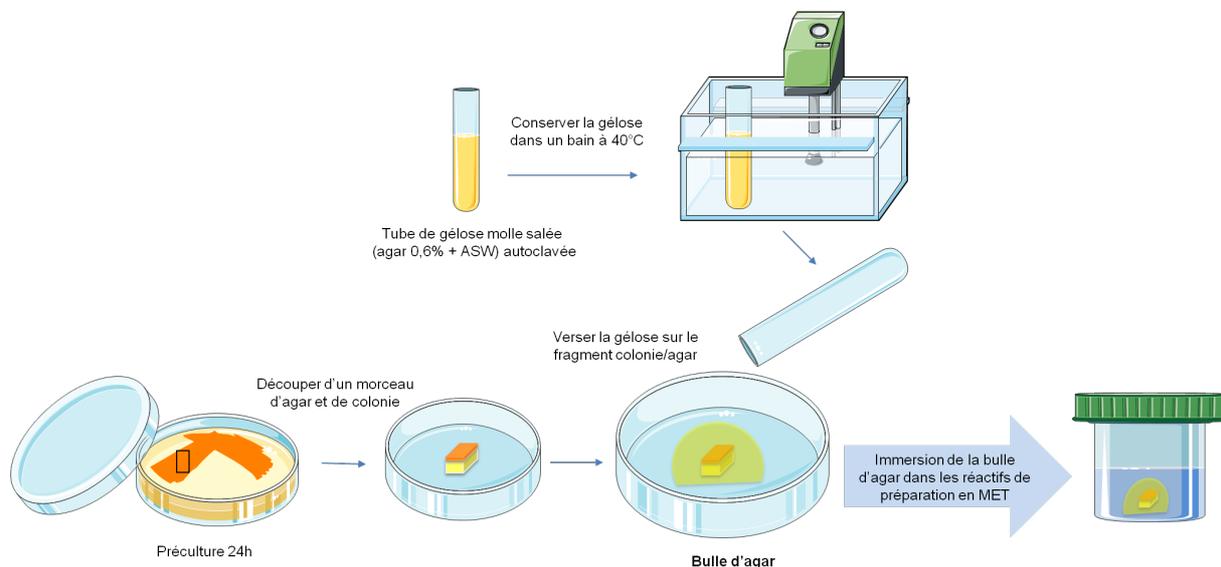


Figure 27. Méthode d'inclusion dans l'agar des colonies.

Fixation

La première étape consiste à fixer le matériel biologique afin de conserver les structures. Nous avons choisi une fixation chimique au glutaraldéhyde. Les échantillons sont rendus insolubles dans l'eau ou dans les solvants organiques, afin de bloquer les systèmes enzymatiques et d'éviter toute modification structurale de l'échantillon. Le glutaraldéhyde crée des ponts artificiels entre les protéines et les groupements amés libres. Une seconde fixation réalisée avec du tétr oxyde d'osmium permet d'éviter l'extraction de certains composants lors de la déshydratation, en particulier les lipides.

Etapes :

- | | | |
|--|----------|---------------------|
| - Immersion dans une solution de glutaraldéhyde 3% | 30 min à | T°C ambiante |
| <i>STOP OK</i> (conservation au frigo) | une nuit | |
| - Rinçage dans du Tampon cacodylate | x 2 | 10 min |
| - Immersion dans une solution de Tétroxyde d'osmium 1% | 1h | 4°C (obscurité) |
| - Rinçage dans du Tampon cacodylate | x 2 | 10 min T°C ambiante |
| <i>STOP OK</i> (conservation au frigo) | | |

Déshydratation

Ces étapes consistent à remplacer l'eau contenue dans l'échantillon par de l'alcool puis par un liquide hydrophobe, l'oxyde de propylène. La déshydratation est indispensable pour l'inclusion future en résine hydrofuge.

Etapes :

- | | | |
|--|--------|--------------|
| - Immersion dans une solution d'Ethanol 30% | 10 min | T°C ambiante |
| - Immersion dans une solution d'Ethanol 50% | 10 min | |
| - Immersion dans une solution d'Ethanol 70% | 10 min | |
| - Immersion dans une solution d'Ethanol 95% | x2 | 15 min |
| - Immersion dans une solution d'Ethanol 100% | x3 | 20 min |
| <i>STOP OK</i> (conservation au frigo) | | |
| - Immersion dans de l'Oxyde de propylène | x2 | 15 min |

Imprégnation

L'imprégnation est obtenue progressivement par passages des échantillons dans des bains résine-solvant de concentration croissante.

Etapes :

- | | | |
|---|-----|--------------------------------|
| - Immersion dans une solution d'oxyde de propylène/résine (50/50) | 1 h | T°C ambiante
Bouchon ouvert |
| - Immersion dans résine 100% | 1h | |

Inclusion

Les substances d'inclusion sont des liquides visqueux sous forme de monomères polymérisables par à des agents chimiques (initiateurs, catalyseurs ou accélérateurs) et physiques (chaleur ou radiations UV). Dans cette étude une résine Epoxy avec une réticulation thermique est employée. Elle est recommandée dans l'inclusion des ultrastructures biologiques classiques. Les bulles d'agar sont récupérées et découpées plus finement à l'aide d'une lame de rasoir stérile puis insérées au fond de tubes Eppendorfs de 500 μ L. Les tubes sont ensuite remplis d'1/3 de résine. L'échantillon peut être orienté afin de faire varier le sens de coupe. Dans notre étude, l'orientation verticale de la colonie dans le tube permet, par la suite, une coupe transversale (perpendiculaire) à la surface de la colonie. Des étiquettes avec les noms des échantillons sont imprimées et disposées dans la résine. La polymérisation s'effectue ensuite dans une étuve à 60°C pendant 72h.

VI.2 Préparation de coupes semi-fines et ultra-fines

Après réticulation de la résine, les blocs solidifiés sont retirés des tubes Eppendorf. L'ultramicrotome (Leica dEM UC6) sert à la réalisation des coupes. Le bloc de résine est tout d'abord prédécoupé à l'aide d'une lame de rasoir pour obtenir un trapèze avec une surface plane contenant les colonies. Un couteau en diamant permet la réalisation des coupes semi-fines et ultra-fines.

VI.2.a Coupes semi-fines

Dans un premier temps, des coupes semi-fines (1 μ m d'épaisseur) sont réalisées pour vérifier la présence de cellules dans la zone de coupe. Disposées sur une lame de verre, elles sont séchées puis colorées à chaud (plaque à 95°) au bleu de toluidine (1% dans du tétraborate de sodium) précédemment filtré sur membrane (0.20 μ m, membrane PES, Millipore). La lame de verre contenant les coupes semi-fines est ensuite rincée à l'eau bi-distillée, séchée et observée au microscope optique.

VI.2.b Coupes ultra-fines

Après avoir identifié la zone contenant les cellules grâce aux coupes semi-fines, des coupes ultra-fines (100 nm d'épaisseur) sont réalisées. La découpe par l'ultramicrotome est automatisée. Environ trois coupes sont disposées sur des grilles de cuivre. Après séchage à

l'air ambiant, les grilles sont directement observées. Le contraste peut être amélioré par des bains successifs d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb. Ces solutions sont précédemment centrifugées 15 min à 12000 g pour éliminer les précipités. Les grilles sont mises en contact à plusieurs reprises avec les gouttes de solution. Ces solutions de sels de métaux ont la particularité de contenir des atomes de métaux lourds qui absorbent plus ou moins les électrons et qui sont capables de se fixer aux structures cellulaires. Le citrate de plomb contraste les membranes plasmiques et divers organites cellulaires ; l'acétate d'uranyle contraste les nucléoprotéines.

Etapes :

- Immersion dans une solution d'Acétate d'uranyle 4%	10 min	T°C ambiante (obscurité)
- Rinçage à l'alcool 25%	x10	
- Rinçage à l'eau bidistillée	x10	
- Séchage	20 min	37°C
- Immersion dans une solution de citrate de plomb	3 min	
- Rinçage dans une solution de NaOH 0,1 N	x10	
- Rinçage à l'eau bidistillée	x10	
- Séchage	20 min	37°C

VI.3 Observation des coupes

Les coupes ultra-fines sur les grilles de cuivre sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (JEOL, JEM-1011). Les grossissements varient de x4000 à x60000. Les images sont obtenues grâce à une caméra haute définition MORADA (Soft Imaging System, Olympus Soft Imaging Solutions) associée à un logiciel de traitement d'image (ITEM, Olympus Soft Imaging Solutions).

VII. Analyses physico-optiques de l'iridescence

Lors de la caractérisation de couleurs structurales chez les organismes supérieurs, les longueurs d'ondes diffractées sont détectées lors d'analyses physico-optiques par spectrophotométrie. Une fibre optique envoie un faisceau de lumière sur l'échantillon, une autre détecte les couleurs d'interférences. Selon l'angle d'observation ou d'illumination, les couleurs varient. Dans la majorité de ces analyses, les échantillons sont déshydratés (ailes de papillons) et faciles à manipuler. En spectrophotométrie classique, les échantillons sont observés en position verticale. Dans nos expérimentations, les échantillons correspondent à des colonies muqueuses sur un fragment d'agar. Afin de caractériser les propriétés optiques des colonies, un montage spécifique de microspectrophotométrie a été mis au point. Le montage s'inspire des travaux de Vukusic & Stavenga (2009). Dans le dispositif adapté, l'échantillon est à l'horizontal et les fibres d'illumination et de détection sont orientées indépendamment. Ces analyses ont été réalisées lors de missions de collaboration avec le Pr Peter Vukusic et le Dr Stephen Luke du département de physique de l'Université d'Exeter (Angleterre).

Afin d'éviter les parasitages de la lumière ambiante, les colonies sont analysées dans une pièce sombre. Un fragment de culture de 24h est découpé et placé sur un support noir (Figure 28A). L'illumination de l'échantillon est assurée par une fibre optique Ocean Optics UV-visible-proche infrarouges connectée à une source lumineuse Ocean Optics HPX-2000 émettant des longueurs d'ondes entre environ 300 nm et 850 nm (Figure 7B). La lumière réfléchie par les colonies est collectée par une deuxième fibre optique équivalente. Celle-ci est reliée à un spectromètre Ocean Optics USB4000-UV-visible lui-même branché à un ordinateur. Les angles d'illumination et d'acquisition peuvent être déplacés séparément. Dans nos analyses, l'angle d'illumination est fixe, seul le détecteur subit une rotation en arc de cercle autour de l'échantillon (angles maximum de $-80^{\circ}/80^{\circ}$). La dépendance de la couleur réfléchie selon l'angle d'observation est ainsi enregistrée. La précision de l'acquisition des spectres de réflexion est de 2° . Un schéma de ce dispositif est compris dans les données supplémentaires de l'article 1 (page 110). Le logiciel Origin permet la construction de graphiques en trois ou deux dimensions à partir des données de longueurs d'ondes détectées selon les angles.

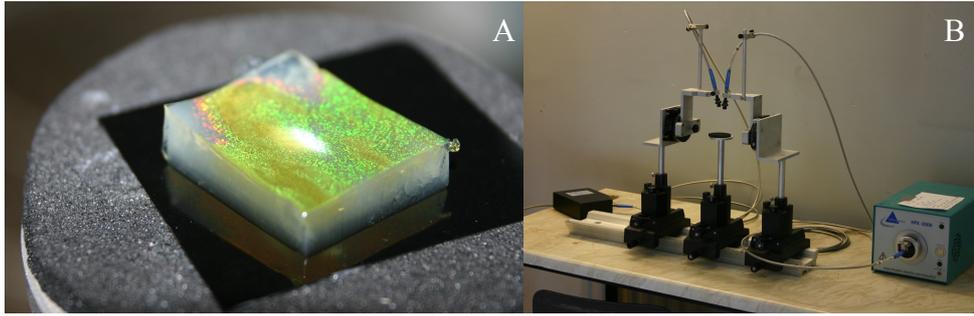


Figure 28. Fragment d'agar découpé pour les analyses de microspectrophotométrie (A) et montage pour la détection des longueurs d'onde diffractées (B).

VIII. Analyses statistiques des images

Dans l'objectif de caractériser l'iridescence des colonies de *C. lytica* à partir des images de microscopie optique et électronique, nous avons utilisé des outils informatique et mathématique de traitement d'images. Ces analyses ont été réalisées par le Dr Renaud Péteri, et les stagiaires Cyril Beaudry et David Simon du laboratoire MIA (Mathématiques, Image et Applications) de l'université de la Rochelle. Seuls les principes et certaines étapes de ces méthodes sont exposés.

L'analyse des surfaces iridescentes des colonies a été réalisée à partir des images de microscopie optique Keyence pour différents agrandissements des colonies et différentes conditions d'illumination. La première étape primordiale correspond à la définition de l'élément paillette (centres iridescents sur la colonie) dans une image. Une analyse colorimétrique de chaque image est ensuite effectuée pour trois images correspondant à trois angles d'illumination. Dans un deuxième temps, les tailles typiques des paillettes sont extraites des images.

L'iridescence est supposée découler d'une structuration interne particulière au sein de la colonie. Lors d'une seconde analyse, les images de MET ont donc été analysées afin d'extraire et caractériser la périodicité des structures dans les colonies.

VIII.1 Analyse des images de microscopie

VIII.1.a Méthodologie pour la détection des paillettes.

Les éléments « paillettes » (« glitter ») dans l'image sont caractérisés par une saturation de la couleur des pixels. Pour les extraire et les caractériser, il est ainsi judicieux d'effectuer un changement d'espace couleur. En effet, les images numériques sont le plus souvent représentées dans l'espace colorimétrique RVB (Rouge Vert Bleu). Ce format de codage de couleur est surtout utilisé pour des vidéos et des affichages sur écran. Il est représenté par les trois couleurs primaires en synthèse additive (Figure 29). Pour les analyses de l'iridescence de *C. lytica*, cet espace colorimétrique n'est pas pertinent, car les paillettes sont caractérisées principalement par leur grande saturation.

La première étape de l'analyse colorimétrique consiste donc à faire passer les images du domaine RVB à un domaine plus perceptuel qu'est l'espace TSV (Teinte Saturation Valeur). En anglais ces espaces colorimétriques sont dénommés RGB (Red Green Blue) et HSV (Hue Saturation Value). Les trois composantes de l'espace TSV sont représentées sur une roue chromatique (Figure 29). La Teinte correspond à la région circulaire dont les angles du cercle définissent les couleurs : 0° ou 360° pour le rouge, 60° pour le jaune, 120° pour le vert, 180° pour le cyan, 240° pour le bleu et 300° pour le magenta. L'axe vertical du triangle correspond à la Saturation qui est définie comme l'intensité de la couleur, ou bien la pureté. Plus la saturation d'une couleur est faible, plus l'image tendra vers l'axe achromatique et apparaîtra fade. L'axe horizontal correspond à la Valeur ou la luminance de la couleur, qui est une donnée achromatique. Une valeur faible correspond à un pixel sombre dans l'image.

Les paillettes possédant une forte valeur de saturation et de luminance, indépendamment de la couleur émise, leurs pixels auront une valeur importante dans les canaux S (Saturation) et V (Valeur) ce qui permet leur détection puis leur analyse.

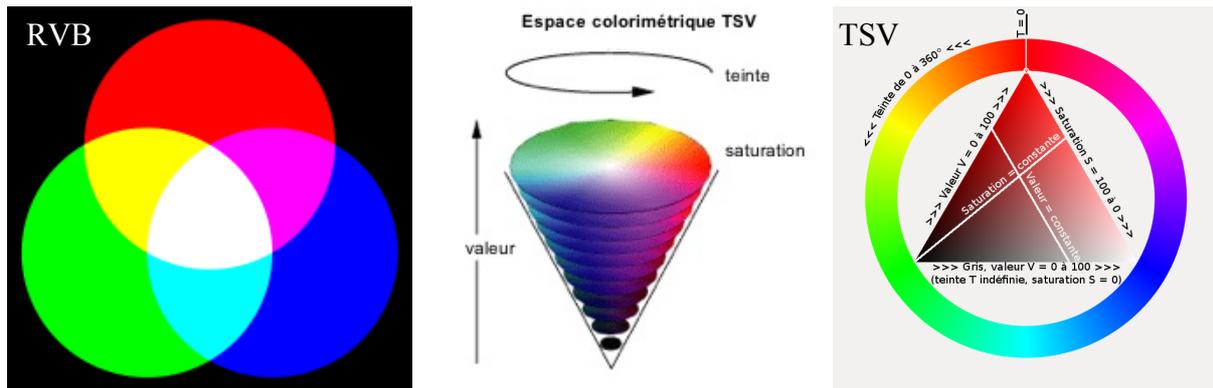


Figure 29. Représentation des espaces colorimétriques RVB et TSV.

VIII.1.b Propriétés colorimétriques de l'iridescence

Après changement d'espace colorimétrique RVB à TSV, seuls les pixels possédant des valeurs importantes dans les canaux Saturation et Luminance (V) sont considérés. Ils représentent en effet les endroits iridescents de l'image. On effectue alors un histogramme circulaire sur les valeurs de la teinte (canal T) de ces pixels iridescents. Les images de microscopie analysées sont celles réalisées avec l'anneau de variation de lumière (microscope Keyence avec la bague d'éclairage variable VH-K20). Trois angles d'illumination (vertical, intermédiaire et horizontal) sont utilisés. Les données colorimétriques sont évaluées pour chaque image, puis une autre analyse compare deux images entre elles. Différentes zones des colonies sont étudiées : centrales ou périphériques.

Coloration des paillettes

Pour chaque image, le pourcentage total de surfaces iridescentes est calculé, ainsi que le pourcentage représenté par chaque couleur de paillettes présentes. Ces valeurs sont calculées pour les trois images d'angles d'illumination différents. Les résultats sont présentés sous forme d'un histogramme circulaire dans l'espace colorimétrique TSV (Figure 30).

Changement de coloration angle-dépendant

Les trois images (illuminations horizontale, intermédiaire et verticale) sont comparées entre elles. Dans ces images, certaines régions de la colonie changent en couleur, tandis que d'autres deviennent plus ou moins lumineuses, et parfois les deux phénomènes sont présents

sur une même région. Les zones détectées sont celles qui varient soit en couleur soit en luminance, soit les deux en fonction de l'angle. Les deux phénomènes sont analysés séparément. Les résultats sont sous forme de cartes de variation. Le programme évalue notamment :

- l'aire des zones variant en couleur / en luminance / en couleur et en luminance, entre l'image 1 et 2, (puis 2 et 3 et 1 et 3)
- Pourcentage de zone variant en couleur et luminance / luminance et en couleur, entre l'image 1 et 2, (puis 2 et 3)
- Pourcentage de zone ayant varié en couleur / en luminance, entre l'image 1 et 2, qui continue de varier entre l'image 2 et 3.

Les cartes sont réalisées en se basant sur les propriétés des paillettes (forte luminosité et couleurs saturées) tout en éliminant les variations causées par les reflets. Afin de visualiser dans l'image les zones et les couleurs iridescentes, les trois couleurs majoritaires sont classées selon l'algorithme K-means (Figure 31). Une version simplifiée de l'image avec trois couleurs majoritaires est ainsi obtenue, avec souvent la couleur du fond et des paillettes. On peut ensuite visualiser les zones de l'image changeant de couleur entre deux angles d'illuminations différents, par exemple entre l'image 2 (illumination intermédiaire) et l'image 3 (illumination horizontale) (Figure 32).

VIII.1.c Taille des paillettes

La surface correspondant aux zones iridescentes de la colonie est évaluée à partir de clichés de microscopie optique classique sous différents agrandissements. Le laboratoire MIA a développé un programme permettant d'évaluer la taille des paillettes pour une zone sélectionnée de l'image. Lors du démarrage du programme, l'échelle de l'image est demandée à l'utilisateur, ce qui permet de connaître et calculer la taille relative d'un pixel à cette échelle. Une interface permet ensuite de définir sur l'image des rectangles englobant des paillettes que l'on souhaite sélectionner. En considérant les pixels à forte saturation, caractéristiques de l'iridescence, le programme calcule alors la surface en μm^2 de la zone iridescente. Une surface moyenne des paillettes est donnée en sortie de programme, ainsi qu'un histogramme de distribution des tailles de paillettes. Différentes images de la même zone à des échelles différentes permettent de confirmer l'exactitude des calculs de surface.

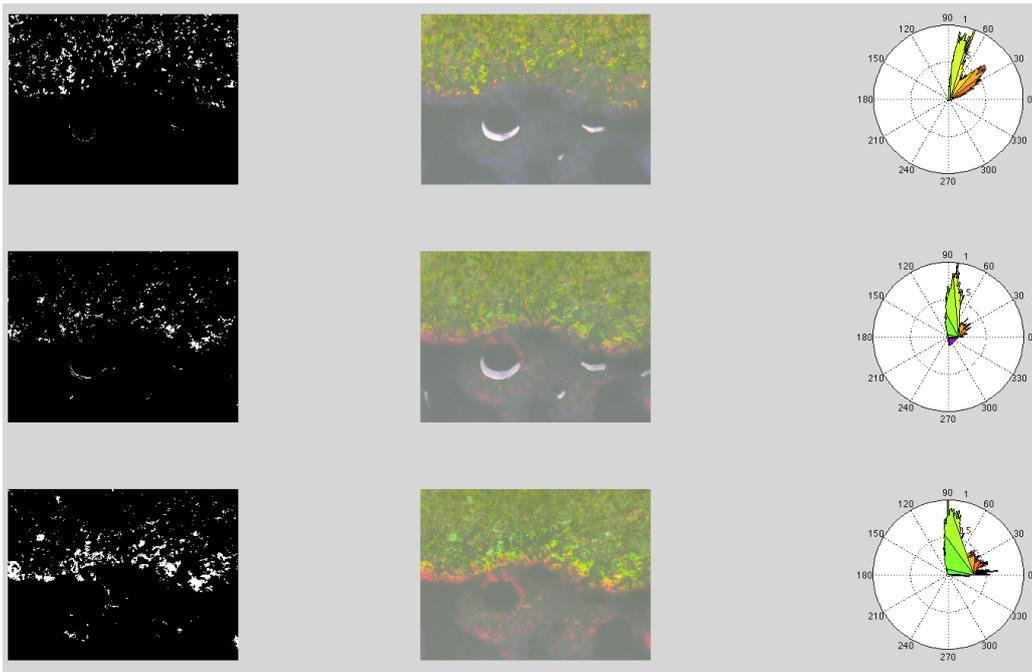


Figure 30. Exemple d'une analyse colorimétrique des paillettes.

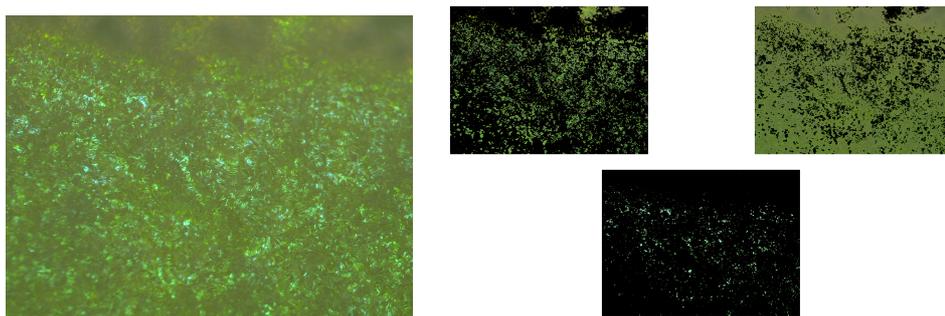


Figure 31. Cliché de base (à gauche) et sa segmentation par K-means en trois cartes correspondant aux couleurs majoritaires (à droite).

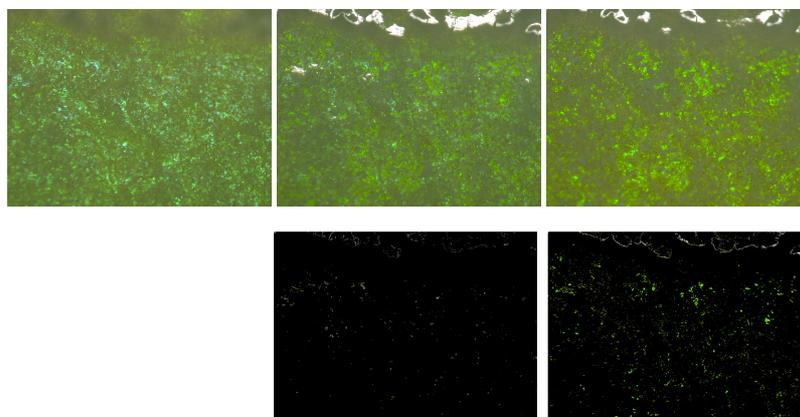


Figure 32. Illustration selon les trois angles d'illumination en microscopie (en haut) et exemple de carte de variation en couleur et luminance entre la deuxième image (orientation intermédiaire) et la troisième (horizontale).

VIII.2 Analyses des images de MET

Le phénomène d'iridescence implique la présence de structures périodiques de taille nanométrique. Les observations en MET permettent de visualiser cette périodicité. Cependant, des analyses statistiques des images sont nécessaires pour confirmer la présence d'un réseau et évaluer les dimensions associées. Dans notre étude, les informations récoltées à partir des images de MET sont les distances entre les centres, entre les bords, l'alignement des cellules et le réseau formé. L'algorithme d'extraction de ces informations est basé sur le traitement d'image par morphologie mathématique (Serra & Soille, 1994 ; Elmoataz et al, 2003).

L'application de la morphologie mathématique pour le traitement d'images en biologique est récente, elle consiste le plus souvent en l'analyse d'images de microscopie. Les applications sont nombreuses dans les domaines des sciences du vivant. Par exemple, des analyses sur des bactéries du sol ont été menées à partir d'images de fluorescence et elles renseignent sur le nombre de cellules, leur volume et leur taille (Bloem et al, 1995). Le logiciel souvent employé pour les utilisateurs des algorithmes standards de morphologie mathématique est ImageJ. Cependant, ses fonctionnalités sont trop limitées pour nos besoins, et les outils de traitement d'images ont été développés sous Matlab (McAndrew, 2004).

De manière très succincte, la morphologie mathématique est une théorie et une technique mathématique et informatique permettant l'analyse de structures, notamment pour les images numériques. C'est un outil très utilisé en traitement d'image car il permet d'extraire efficacement des composants qui sont utiles dans la représentation et la description des régions de l'image (comme la frontière ou la notion d'enveloppe convexe). Deux opérations fondamentales de la morphologie mathématique sont la dilation et l'érosion, qui correspondent à l'union (ou l'intersection) de l'image avec des translations d'une forme appelée élément structurant. Dans notre cadre applicatif, la morphologie mathématique nous a permis d'extraire les différentes cellules d'une image, et notamment leur centre, leur forme, et leur taille moyenne (analyse granulométrique). Une fois le réseau formé par les cellules extrait, des études statistiques de la distribution spatiale de ces cellules peuvent être réalisées.

Segmentation de l'image

L'extraction du réseau formé par les cellules s'effectue en plusieurs étapes (Figure 33). Tout d'abord, une analyse granulométrique donne une évaluation de la taille moyenne des cellules dans l'image, ce qui permet pour les traitements ultérieurs de connaître la taille de l'élément structurant à utiliser. Puis l'étape de filtrage morphologique permet d'extraire la géométrie des cellules tout en effaçant le fond non homogène. Le seuillage (par la méthode d'Otsu) définit des valeurs binaires de l'image (1: cellule, 0: fond) pour séparer les cellules du fond. L'étape *border killer* élimine les éléments situés aux bords qui ne sont pas entièrement dans l'image afin de ne pas biaiser les statistiques. Cette étape s'effectue avec une inversion du contraste. Enfin, la détection des cellules est obtenue par la localisation (fonction *regionprops*) des centres des régions de l'image. Les coordonnées des centres sont récupérées, l'aire des cellules, leur périmètre et leur taille sont aussi extraits. Dans les analyses du Chapitre 5, l'intérieur des cellules est quelque fois plus clair, et peut limiter l'extraction des formes. L'algorithme a donc été amélioré par une étape de remplissage des espaces intracellulaires.

Extraction du réseau

Les informations recueillies dans l'étape précédente permettent une analyse du réseau formé par les cellules contenues dans l'image (Figure 34). Une triangulation de Delaunay est effectuée avec les centres de chaque cellule pour observer la structure formée. Une transformée de Hough permet ensuite d'extraire les principaux axes d'alignements.

Modélisation des structures extraites

Une modélisation des structures identifiées par MET a été effectuée par l'utilisation du logiciel *Comsol Multiphysics*. Ces expérimentations en cours et sont réalisées par le Pr Peter Vukusic et le Dr Stephen Luke de l'université d'Exeter (Angleterre). Seuls quelques résultats préliminaires seront inclus dans ce mémoire. Un modèle de structuration par des cercles équidistants est effectué, il reprend les données de distances entre les centres déterminées précédemment lors de l'extraction des structures en morphologie mathématique. Des indices de réfraction des cellules (1.38) et de la matrice entre celles-ci (1.34) sont définis. Le logiciel évalue les propriétés optiques (spectre de diffraction) du modèle. Ce spectre théorique sera ensuite comparé avec le spectre expérimental (obtenu dans le Chapitre 1) afin de définir précisément la structure responsable de l'iridescence de *C. lytica*.

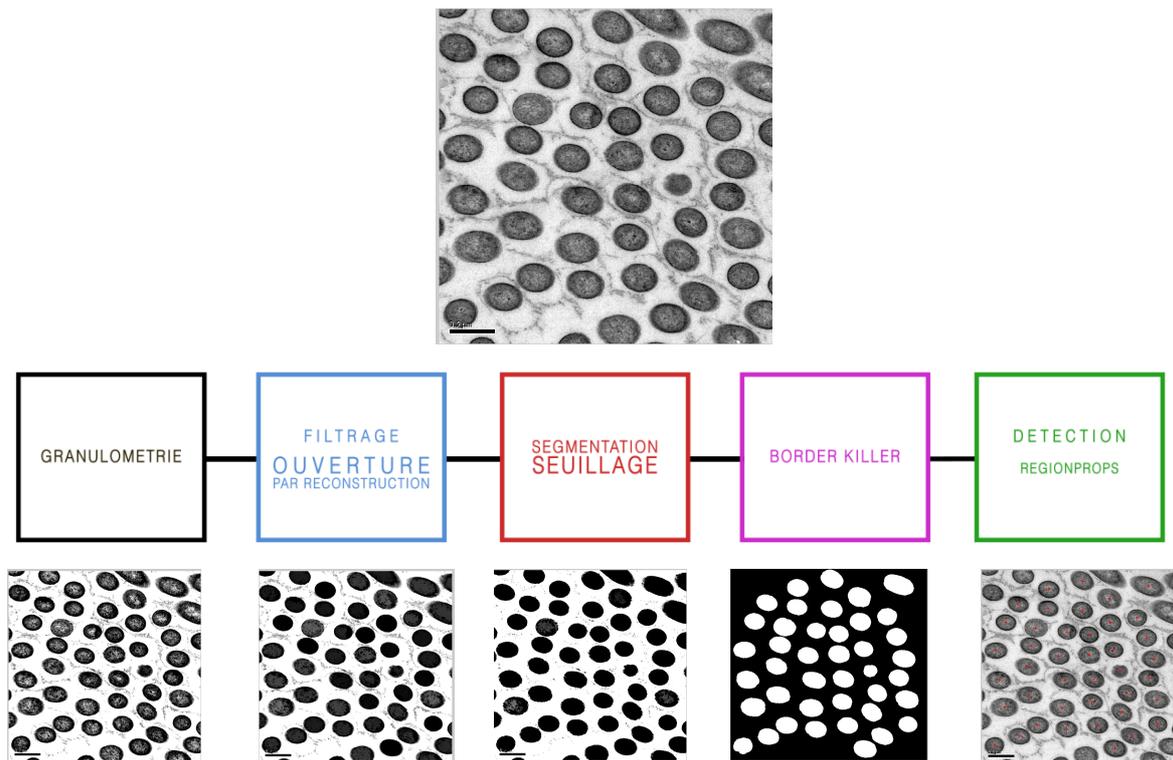


Figure 33. Etapes de segmentation des images MET à partir d'une image brute (en haut)

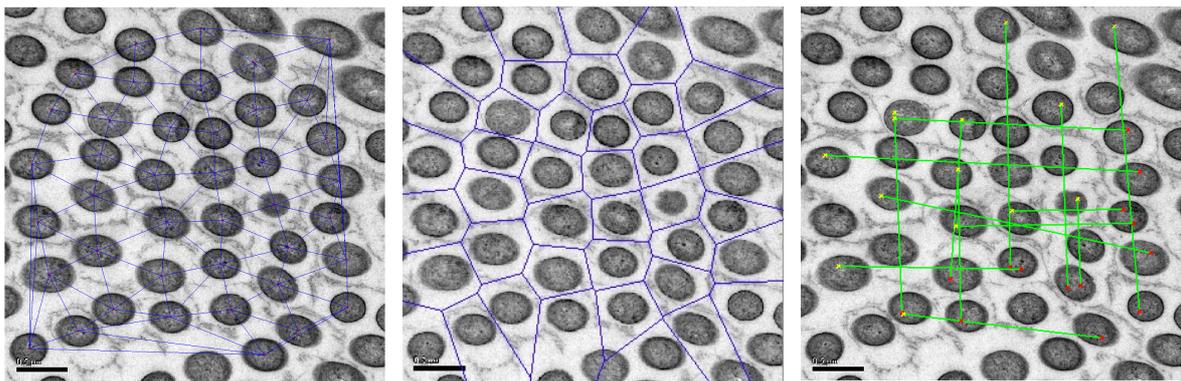
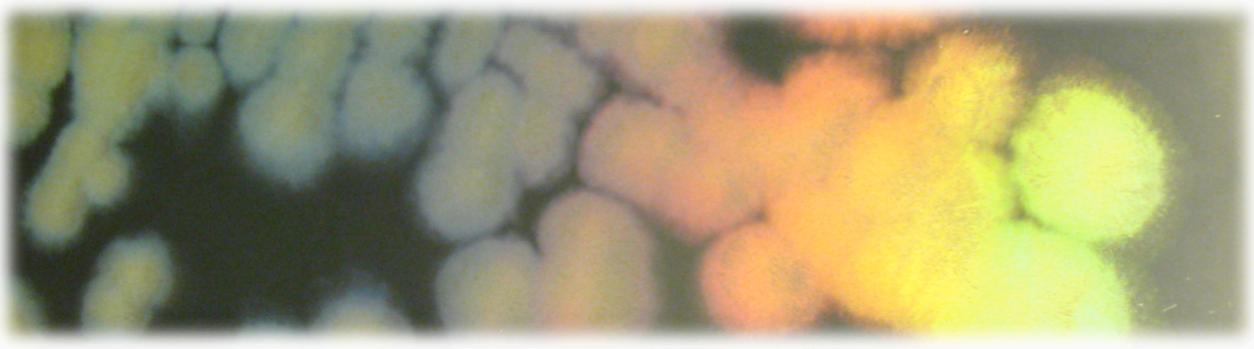


Figure 34. Images obtenues après une triangulation de Delaunay, un diagramme de Voronoï et une transformée de Hough (de droite à gauche dans cet ordre) appliqués à l'image de MET de la figure précédente.

Chapitre 1.

ISOLEMENT D'UNE BACTERIE MARINE
IRIDESCENTE ET COMPARAISON DES
IRIDESCENCES BACTERIENNES



I. Démarche scientifique

Au cours de la recherche de bactéries marines d'intérêt, une souche présentant des colonies aux colorations surprenantes fut isolée de la surface d'une anémone *Actinia equina* issue d'un estran rocheux sur l'île d'Oléron. La souche fut identifiée comme appartenant à l'espèce *Cellulophaga lytica*, une *Flavobacteriale* membre du phylum *Bacteroidetes*. *Cellulophaga lytica* CECT 8139 fut identifiée par le séquençage de son ARNr 16S, ARNr 23S et ITS avec des résultats respectifs de 100%, 100% et 99%. Afin de confirmer l'affiliation de la souche, il conviendrait de réaliser une étude sur le taux de réassociation de l'ADN génomique. Les analyses d'hybridation ADN-ADN étant longues et coûteuses, celles-ci n'ont pu être entreprises et seront entrepris dès que possible.

Les colonies arboraient une coloration verte intense. L'effet brillant variait en couleur et en intensité en fonction de l'angle d'observation. La meilleure façon d'observer ce phénomène était, dans une pièce noire, d'envoyer un faisceau de lumière direct et concentré sur les colonies de manière oblique par rapport au plan de la boîte de culture. Cette coloration des colonies était très différente des processus de coloration biochimiques (pigmentation, bioluminescence ou fluorescence) et fut suspecté comme étant de l'iridescence. Dans la littérature, aucune information sur cette caractéristique n'a été donnée lors du séquençage récent de *C. lytica* LIM-21^T (Pati et al, 2011). Une teinte métallique a seulement été mentionnée lors de la reclassification de cette souche dans le genre *Cellulophaga* (Jonhansen et al, 1999). Seules les colonies de *C. lytica* ACEM 21 sont décrites « iridescentes » lors de l'étude d'activités algicides (Skeratt et al, 2001). Les ouvrages de références concentrent les rares descriptions d'iridescence des *C. lytica* (Bowman, 2011). Parmi ces études, aucune n'a exploré cette propriété. Or, l'analyse bibliographique suggère que l'iridescence de *C. lytica* pourrait s'avérer très différente des iridescences bactériennes préalablement décrites.

Dans un premier temps, nous avons souhaité décrire de façon détaillée et illustrer au niveau macroscopique et microscopique les colorations particulières des colonies de *C. lytica* BK (= CECT 8139). Un montage d'observation en illumination directe a été spécialement mis au point pour la prise de photographie. Les illustrations faisant souvent défaut dans la littérature, ces images permettront de caractériser le phénomène. Par ailleurs, ce montage dispose d'une modulation des angles d'illumination qui nous renseigne sur les variations de couleurs, propriétés typiques d'une iridescence. Ces variations ont également été visualisées

plus finement au niveau microscopique à l'aide d'un microscope optique muni d'un anneau variant l'orientation de l'éclairage. Les conditions de culture pouvant être déterminantes dans l'observation de l'iridescence bactérienne, différents milieux ont été employés.

Aucune étude sur l'iridescence bactérienne n'expose de données physiques quantifiées permettant de prouver l'existence du phénomène. Dans l'intention de la caractériser de façon complète, nous avons voulu démontrer l'iridescence de *C. lytica* grâce à des méthodes physico-optiques. Les couleurs structurales ont été analysées lors d'expériences de spectrophotométrie où les longueurs d'ondes diffractées ont été détectées. La majorité des études sur l'iridescence examinent des ailes d'insectes ou des plumes déshydratées. Nous avons donc élaboré un montage de microspectrophotométrie adapté aux analyses inédites de l'iridescence de colonies bactériennes muqueuses.

Par la suite, nous nous sommes interrogés sur les phénomènes d'iridescence de colonies précédemment décrites et leurs similitudes avec le phénomène observé pour la souche isolée. Une prospection dans la littérature révèle que le concept de colorations structurales chez les procaryotes est vague. Les données bibliographiques sont pour la majorité anciennes, peu détaillées, utilisant des termes ambigus et pour la plupart non illustrées. Il est ainsi difficile d'appréhender les différents phénomènes. De plus, le mode d'observation le plus utilisé correspond à une transillumination des colonies, à l'opposé de l'illumination directe nécessaire à l'iridescence de la souche isolée. Afin d'évaluer la singularité de l'iridescence de *C. lytica*, nous avons souhaité clarifier les phénomènes au sein des procaryotes. Deux montages reprenant les modes d'observation en épi-illumination et en transillumination ont été mis au point. Dans cette démarche, une comparaison large de souches a été menée. Le choix des souches s'est basé sur des mentions plus ou moins détaillées du phénomène. Des souches sans description ont été incluses comme contrôles. Les descriptions d'iridescence de *C. lytica* étant peu précises, plusieurs souches issues de différentes banques de souches ont été comparées afin d'évaluer le phénomène dans cette même espèce.

Les résultats sur la caractérisation de l'iridescence de *C. lytica* BK et la comparaison des iridescences bactériennes ont été publiés en Avril 2012 dans le journal *Applied Environmental Microbiology*. Des analyses complémentaires sont également incluses dans ce chapitre : vidéos du phénomène, culture sur milieux noirs et sur membrane, test d'étalement de la colonie et observations microscopiques sur différents milieux.

Article 1.

Iridescence of a marine bacterium and classification of prokaryotic structural colors

Publié en Avril 2012 dans le journal Applied Environmental Microbiology

Iridescence of a Marine Bacterium and Classification of Prokaryotic Structural Colors

Betty Kientz,^a Peter Vukusic,^b Stephen Luke,^b and Eric Rosenfeld^a

UMR 7266 CNRS-ULR LIENSs, UFR Sciences, Université de La Rochelle, La Rochelle, France,^a and School of Physics, University of Exeter, Exeter, United Kingdom^b

Iridescence is a property of structural color that is occasionally encountered in higher eukaryotes but that has been poorly documented in the prokaryotic kingdom. In the present work, we describe a marine bacterium, identified as *Cellulophaga lytica*, isolated from the surface of an anemone, that exhibits bright green iridescent colonies under direct epi-illumination. This phenomenon has not previously been investigated in detail. In this study, color changes of *C. lytica* colonies were observed at various angles of direct illumination or observation. Its iridescent green appearance was dominant on various growth media. Red and violet colors were also discerned on colony edges. Remarkable *C. lytica* bacterial iridescence was revealed and characterized using high-resolution optical spectrometry. In addition to this, by culturing other bacterial strains to which various forms of faintly iridescent traits have previously been attributed, we identify four principal appearance characteristics of structural color in prokaryotes. A new general classification of bacterial iridescence is therefore proposed in this study. Furthermore, a specific separate class is described for iridescent *C. lytica* strains because they exhibit what is so far a unique intense glitter-like iridescence in reflection. *C. lytica* is the first prokaryote discovered to produce the same sort of intense iridescence under direct illumination as that associated with higher eukaryotes, like some insects and birds. Due to the nature of bacterial biology, cultivation, and ubiquity, this discovery may be of significant interest for both ecological and nanoscience endeavors.

The use of light and color is fundamentally important in biological systems. While the majority of animal and plant colored appearances are generated through pigmentary processes (20), some employ micron- and submicron-sized physical structures as a means to generate color appearance effects (71). These structures can interact with incident light to create preferential scattering of specific spectral colors which can generate the most intense and often functionally targeted optical effects. If the structures are spatially arranged with very periodic geometry, then the color appearance of the animal or plant takes on an often strongly angle-dependent character and the colored appearance is defined as iridescent (18, 35, 36, 78, 41, 71). Animals exhibiting iridescence or, more generally, structural color have been the subject of keen interest to both the biology and physics fields. Structural color has been particularly well studied in Insecta (22, 47, 65, 70, 72, 73), in fishes (34, 40), and in Aves (17, 25, 58, 67). One virus system has also been linked to structural coloration (79). In the marine environment, iridescence has been reported in crabs (49), seashells (6, 38), squid (68), ctenophores (76), macroalgae (21, 51), and diatoms (23, 45).

Iridescence in prokaryotes has been poorly documented since its first observation, made in 1904 by Preisz (57). Until now, the phenomenon has been observed only on colonies or concentrated cell suspensions (53, 54, 57), and detailed illustrations are limited. Various general terms such as “shine,” “sheen,” “glistening,” “metallic effect,” “bright colors,” “luster,” “glow,” “glisten,” or “rainbow-like” were employed to describe the visual effects observed (15, 19, 28). Confusion with fluorescence has also been made (8, 13, 29). The lack of such precision has created difficulty in the accurate description of the visual characteristics of bacterial iridescence.

The two most described iridescent bacteria are *Pseudomonas aeruginosa* (9, 14, 15, 16, 28, 31, 77, 80) and *Haemophilus influenzae* (8, 19, 42, 44, 55). Two distinct observation methods were used, direct epi-illumination and transillumination, respectively,

for *P. aeruginosa* and *H. influenzae*. The type of iridescence observed in certain strains of *P. aeruginosa* was described as a metallic iridescence and has been linked to cell lysis (16, 28, 80) and/or to the production of quinoline derivatives (9, 10, 77). A silvery appearance was also recently mentioned in *Aneurinibacillus migulanus* type III (2). In *H. influenzae*, colonies of capsulated cells display all spectral colors from red to blue under oblique transmitted light (transillumination). This type of iridescence was reported in several bacteria, including *Listeria marthii* (24), *Pasteurella multocida* (7, 29), coli-typhoid group bacteria (53), *Listeria monocytogenes* (39), and *Alcanivorax balearicus* (63). Several attempts were made to explain the transmitted iridescence, notably, by using spectral observations (19, 26, 44, 53, 55, 56). The phenomenon has been ascribed to either orderly arranged cells (19, 52, 53) or randomly arranged cells (27, 56). In these older works, both diffraction grating (19, 44, 52, 53, 56) and film effect (27) theories were proposed, but none could be confirmed.

Taken all together, the literature data suggest that bacterial iridescence is at best a loosely defined phenomenon that lacks rigorous description and understanding. Moreover, an intense structural color similar to some insect and vertebrate iridescence has not yet been documented in the bacterial kingdom. In this study, a marine bacterium forming intense structurally colored colonies that are spectrally brilliant in reflection has been isolated and described. Furthermore, in order to clarify the state of the art,

Received 27 October 2011 Accepted 10 January 2012

Published ahead of print 20 January 2012

Address correspondence to Betty Kientz, betty.kientz@gmail.com, or Eric Rosenfeld, eric.rosenfeld@univ-lr.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.07339-11

we have compared the optical effects in a broad range of bacteria using both epi-illumination and transillumination. Special attention was given to the strains previously described as “iridescent.”

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and bacterial isolation. Collection of samples was performed on Chassiron lighthouse rocky shore at Oléron Island, west Atlantic coast of France (46°02'48"N, 1°24'37"W) in December 2009. Various marine organisms (macroalgae, sponges, anemones, crustaceans, mollusks, starfishes, and fishes) were collected with plastic gloves, transported in sterile plastic bags (to avoid terrestrial contamination), and processed immediately for microbiological studies. Tissues from the marine organisms were washed thoroughly with sterile artificial seawater (ASW; Instant Ocean) in order to remove loosely attached epibionts. Two-centimeter-square tissue specimens were then imprinted on marine agar (MA) purchased from Dutscher (Laboratorios Conda, S.A. Pronadisa) (64). Plates were examined visually after aerobic incubation for 24 h at 20°C or 30°C.

Taxonomic identification. Genetic sequencing identified the isolated bacterial strain. Primers used for rRNA 16S gene sequencing were F1 (5'-AGAGTTTATCTCTGCTCAG-3'), R1 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), F2 (5'-CTCCTACGGGAGGCAG-3'), and R2 (5'-GACACGAGCTGACGACA-3') (75). Primers used for the 23S rRNA and the internal transcribed spacer 2 (ITS2) area were 23SF (5'-AACCCGTTGACGTTGAAAAG-3'), 23SR (5'-CTTGCTTTTCTCGGAGGATG-3'), ITSF (5'-TAGAGGTCGGCAGTTCGAGT-3'), and ITSR (5'-ATCTTCAATATGCCGGGTTG-3'). The sequences were compared with the sequences available in the NCBI database and LeBibi database (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>) by using the BLAST service to determine their phylogenetic identity.

Culture of C. lytica. The isolated marine bacterium was cultivated at 20°C or 25°C on three solid media. MA medium was employed preferentially for analysis of iridescence. Cytophaga agar (CYT) and low-nutrient (LN) media were made with ASW (30 g · liter⁻¹; Instant Ocean). CYT medium contained 1 g of tryptone, 0.5 g of yeast extract, 0.5 g of CaCl₂ · H₂O, 0.5 g of MgSO₄ · H₂O, and 15 g of agar in 1 liter of ASW. In this medium, casein was replaced by tryptone because *C. lytica* does not degrade casein (33). LN medium contained only 15 g of agar in 1 liter of ASW (32).

Bacterial strains and culture media used for iridescence comparison. Bacterial strains with their respective culture conditions are detailed in Table S1 in the supplemental material.

(i) **Bacterial strains.** A total of 74 strains were compared. Bacteria described as iridescent in previous literature were *Haemophilus influenzae* (8, 19, 42, 44, 55), *Pseudomonas aeruginosa* (9, 14, 30, 77, 80), *Alcanivorax balearicus* (63), *Aneurinibacillus migulanus* (2), *Listeria marthii* (24), *Listeria monocytogenes* (39), *Bordetella trematum* (69), *Salmonella typhi* (43), *Mannheimia haemolytica* (*Pasteurella mastitidis*) (31), and *Pasteurella multocida* (7, 12, 29). Since iridescence was mentioned in bacterial groups such as coli-typhoid (46, 53), cocci (52), or bacilli (19, 56), strains of the following species were included: *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas stutzeri*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. Control bacteria, described as not being iridescent, were *Micrococcus luteus*, *Lactococcus lactis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter cloacae*, and two marine strains, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio lentus*. Among the tested bacteria, several clinical strains were selected since bacterial iridescence has been associated with pathogenicity (30, 44, 55). Finally, four *Cellulophaga lytica* strains were compared, including the DSM 7489 strain corresponding to the LIM-21^T strain, for which the complete genomic sequence has recently been published (50).

(ii) **Culture media.** Appropriate media for iridescence observations were selected from literature data or were defined by experimental assays. Ready-to-use media (Dutscher) were nutrient agar (NA) (53), brain heart agar (BHA), and tryptic soy agar (TSA) for *Aneurinibacillus migulanus* (2),

Luria-Bertani (LB) for *Pseudomonas* culture (9), and MA for marine strains such as *Vibrio* spp. and *C. lytica*. Prepared media were tryptose agar (TrypA) with 20 g of tryptose, 1 g of glucose, 5 g of NaCl, and 15 g of agar per liter for *Listeria* spp. (39) and Tween-peptone agar (TPA) with 10 g of Tween 20, 10 g of peptone, 5 g of NaCl, 0.1 g of CaCl₂ · H₂O, and 15 g of agar per liter for *Alcanivorax balearicus* (63). For *Haemophilus influenzae* cultures, Levinthal's XV medium (Lev XV) was prepared by mixing 10 g of peptone A, 10 g of meat extract, 5 g of NaCl, and 20 g of agar per liter, with a supplement of 15 mg of X (hemin) and V (NAD⁺) factors added after autoclaving (19, 55).

Macroscopic examination of bacterial iridescence. (i) **Epi- and transillumination methods.** Iridescence of bacterial colonies was observed with the aid of a streaking procedure. One colony from a 24-h-old plate was subcultured in duplicate plates by drawing thin 5-cm linear streaks. After 24 h incubation, cultures were photographed in a dark room using two experimental arrangements of oblique epi-illumination and transillumination (see Fig. S1 in the supplemental material). The camera was a Canon Powershot A650 IS image stabilizer AiAF on the Av program. The lens was a macro, large size (12.1 megapixels) used in superfin mode. Illumination was with an E14 220- to 240-V, 11-W bulb (532 lumen at 2,700 K). For oblique epi-illumination, the plate was placed on a black backing. The optical axis of the camera formed an angle of 45° with the center of the plate. The light was fixed obliquely with an angle α of 67.5° from the plate. For transillumination measurements, samples were photographed from an angle of 45° above the petri dish with the light source directly behind it (i.e., normal incidence illumination in transmission).

(ii) **Examination of C. lytica color changes.** In order to observe the color changes as a function of the illumination angle, the epi-illumination setup was employed. Pictures were taken alternatively at five different angles of incident light. Angle α values were 22.5°, 67.5°, 90°, 112.5°, or 135°. For these experiments, *C. lytica* was grown at 20°C (instead of 25°C) to observe all colorations more effectively.

Microscopic examination of C. lytica colony colors. Detailed observations of colored colonies were performed under epi-illumination by using a numeric Keyence microscope (VHX-1000E). A VHX-1100 camera with a VH-Z20R/Z20W objective lens with adjustable magnifications of $\times 20$, $\times 30$, $\times 50$, $\times 100$, $\times 200$, and $\times 400$, the last one with a specific tool doubling the magnification, was used. To avoid specular reflections, the VH-S30 supporting mount of the camera was oriented at a 60° angle from the plate. The DEPTH UP/3D tool corresponding to the depth-from-defocus (DFD) process was employed at high magnification to focus on all optical fields and to improve image quality. In order to observe transitory colorations, the Keyence device was equipped with a VH-K20 lens ring. The support of the camera was oriented at a 90° angle. By moving the ring from right to left, three positions of illumination were used, namely, high, intermediate, and low light incidence angles.

Physical measurement of C. lytica (microspectrophotometry). Illumination was directed onto the sample through an Ocean Optics UV-visible-near infrared optical fiber that was connected to an Ocean Optics HPX-2000 light source that spans approximately 300 nm to 850 nm. The reflected light was collected using a similar optical fiber that was itself connected to an Ocean Optics USB4000-UV-visible spectrometer (see Fig. S2 in the supplemental material). The angles of illumination and of detection could be separately set and controlled to a resolution of 0.5°. For a series of chosen fixed illumination angles, the collection fiber was stepped in 2° angle steps in an arc over the sample, and reflection spectra were recorded at each angular position. In this way, the dependence of reflected color with angle and, hence, the extent of each sample's iridescence could be measured and assessed (72, 74).

RESULTS

Isolation and identification of a marine bacterium with a glitter-like color appearance. While searching for new cultivable epibiotic bacteria in the marine environment, we isolated a Gram-negative bacterium from the surface of a red anemone (*Actinia*

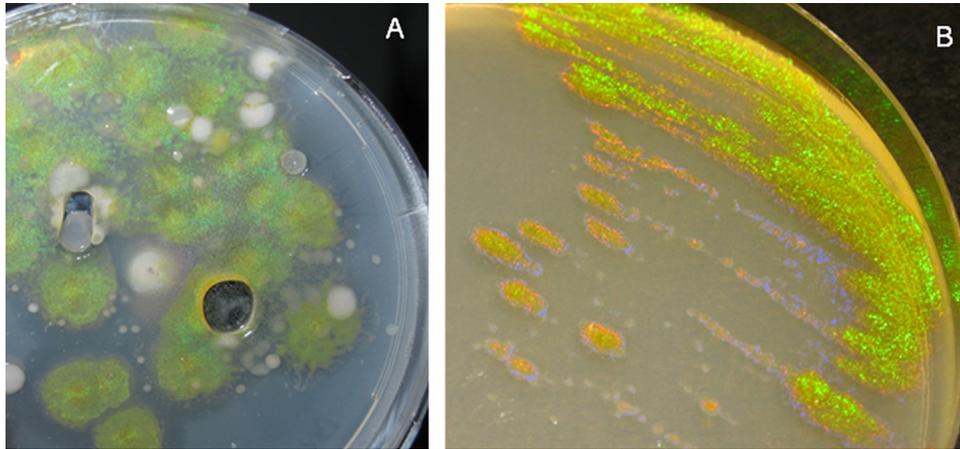


FIG 1 Observations of the marine environment-isolated *Cellulophaga lytica*. (A) The first isolation plate shows colored *C. lytica* colonies together with agarolytic and white bacterial colonies; (B) the second shows a pure culture of *C. lytica* observed under direct epi-illumination allowing examination of the intense structural color. In both cases, *C. lytica* was grown aerobically at 25°C on MA.

equine) (Fig. 1A). Colonies exhibited bright iridescent reflected color when grown on MA plates and viewed under epi-illumination (Fig. 1B). The iridescence was not visible when colonies were resuspended or cells were grown in liquid media (data not shown). Iridescent green was the dominant color, but red and blue-violet were also observed at the colonies' peripheral edges. The MA-grown colonies' color appearance comprised submillimeter-sized centers of color of varying brightness distributed across the iridescent region. This gave the colonies' color reflection and intensity a glitter-like character.

The marine strain was taxonomically identified by performing both 16S rRNA and 16S to 23S (16S-23S) ITS sequence analyses. The strain was phylogenetically affiliated with the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group and the *Flavobacteriaceae* family and was identified as *Cellulophaga lytica* (CP002534, DSM 7489) (33, 37) with 16S rRNA, 23S rRNA, and ITS sequence similarities of 100%, 100%, and 99%, respectively. A thorough analysis of literature data showed that a "metallic tinge" of the colonies was previously mentioned for the affiliated strain *C. lytica* ATCC 23178^T (DSM 7489 = CIP 103822 = LIM-21^T) (33). The relative strain LIM-21^T was recently genome sequenced, but no shiny effect was detailed in the description of its morphological appearance (50).

Coloration of *C. lytica* colonies on different culture media. Agarolytic, mucous colonies with gliding motility and the bright glitter-like color centers effect were common characteristics for all media (Fig. 2a1, b1, and c1). On MA, colonies' color appearances comprised yellow pigmentation and principally a green structural color. At the peripheral growth zones, yellow, red, and then violet were observed (Fig. 2a1). This color gradation was confirmed using the Keyence microscope (Fig. 2a2 and a3; see Movie S1 in the supplemental material). Colonies grown on CYT were larger and less pigmented (Fig. 2b1). Blue was observed in the inner zone of the colony, and green, yellow, red, and violet were also visible (Fig. 2b2 and b3). Less growth occurred on the LN medium (Fig. 2c1). Colonies were translucent in this medium, and only green iridescence was discernible (Fig. 2c2 and c3; see Movie S2 in the supplemental material).

Angle dependence of *C. lytica* colonies' coloration. On MA,

by changing the illumination angle from 22.5° to 135°, red and violet zones of the colony became green, while the central bright green region became blue or noniridescent (Fig. 2D). This angle dependence of reflected color, defined as iridescence, was the first direct evidence for a structural mechanism as the origin of the color. Color changes were also examined microscopically using the Keyence microscope (Fig. 2E; see Movie S3 in the supplemental material). Pictures demonstrated that bright green iridescence was predominant when illumination was close to grazing incidence (Fig. 2e3.h and e4.h). Violet-to-red color changes were observed at colony edges (Fig. 2e3.h and e3.l). Different iridescent color centers appeared and disappeared when the illumination position was modified from high to low incidence (black arrows in Fig. 2e4.h and e4.l). The image associated with an intermediate angle of illumination exhibited color centers which overlapped (Fig. 2e3.i and e4.i).

Physical evidence of *C. lytica* iridescence. The data presented in Fig. 3 show optical reflection bands that unequivocally represent the iridescence of *C. lytica* bacterial colonies by the change in their color with angle. For instance, under illumination at an angle of -70° , the principal reflected color is green over a 70° angle range (-60° to $+10^\circ$). However, within this angle range, the peak reflection wavelength changes continuously from approximately 550 nm to approximately 500 nm. This band of reflected color extends still further toward higher positive angles, the peak wavelength of which decreases to approximately 410 nm at a scattered angle of $+70^\circ$. Three other reflected bands of color are shown on this map of reflectance data: each of these shows peak wavelengths that are also angle dependent: two at near-UV wavelengths and one in the near infrared.

Overall comparison of bacterial iridescence. For a better understanding of bacterial structural color effects, we examined the iridescence of a broad range of bacterial strains. The extended classification of these bacterial optical effects is presented in Table S1 in the supplemental material, with a selection of images presented in Fig. 4. We propose a model of four separate bacterial iridescence categories: rainbow-diffuse (D) and rainbow-edge (R) appearances under transillumination and metallic (M) and glitter-like (G) appearances under epi-illumination.

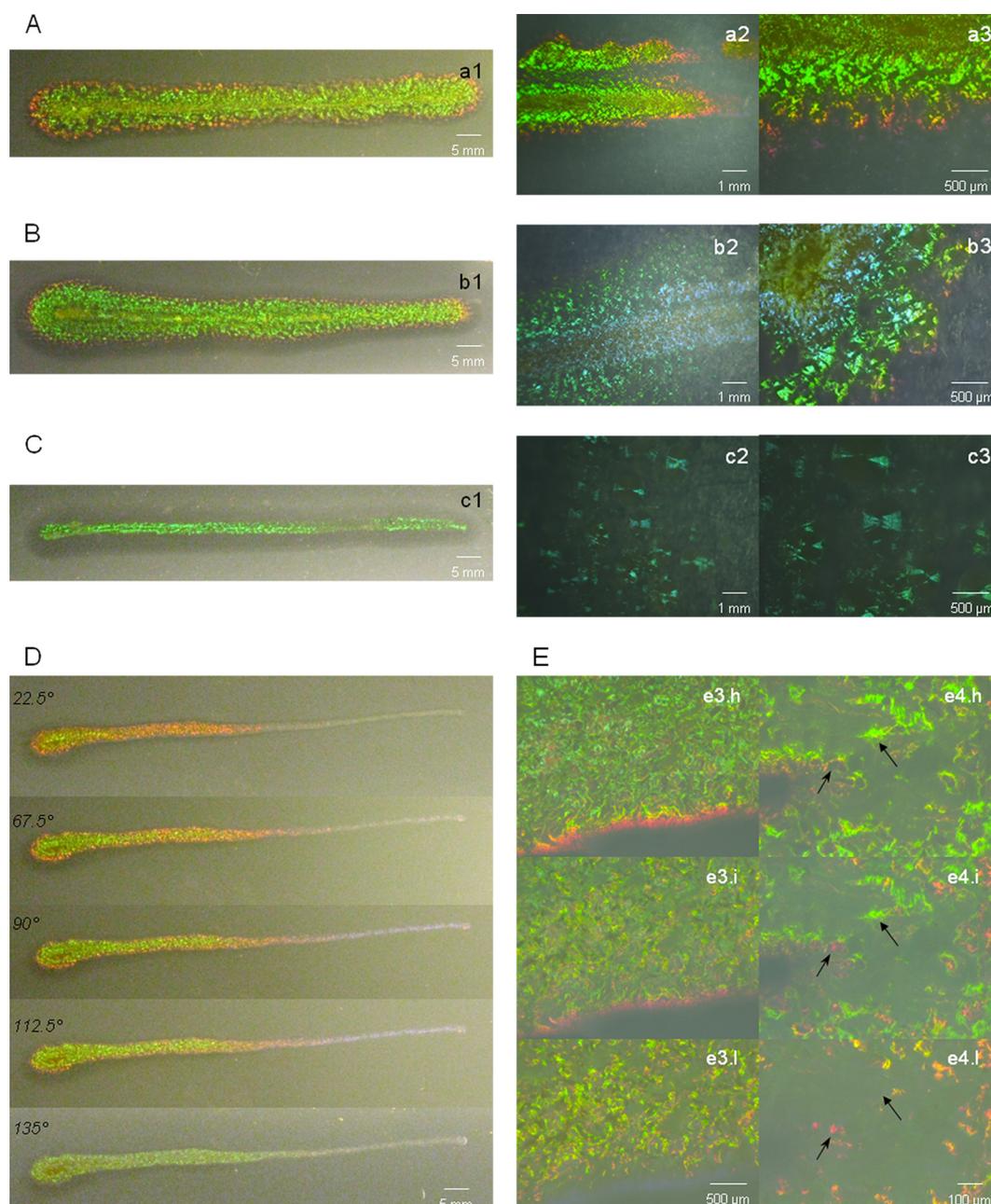


FIG 2 Macroscopic and microscopic observation of *C. lytica* colonies' coloration. Colonies were pictured after 24 h growth on MA (A, D, and E), CYT (B), and LN (C). The inoculation was a thin 5-cm linear streak. Gliding motility can be identified as the spreading zone from the colony center. Bacterial agarolysis corresponds to the dark halo visible on colony edges. Pictures were taken under epi-illumination with a light angle of 67.5° at the macroscopic level (a1 to c1) or using Keyence microscope examination with 60° light incidence using a $\times 30$ objective lens (a2 to c2) and a $\times 100$ objective lens (a3 to c3). Evaluation of color changes at the macroscopic level was performed at diverse illumination angles (D). At the microscopic level (E), examination was performed at high (h), intermediate (i), and low (l) angles of incidence light with a $\times 100$ (e3) and a $\times 400$ (e4) objective lens. Arrows indicate positions of the color center appearing and disappearing as glitters.

The rainbow-diffuse category comprises bacterial colonies that exhibited all spectral colors ranging from red to blue only under the condition of transillumination (Fig. 4). Various color intensities were observed within this category. A large number of bacterial strains also displayed this visual effect (see Table S1 in the supplemental material). The rainbow-edge iridescence was visible only on colonies' edges. This phenomenon does not appear to have previously been described in literature. A few strains, namely,

Bacillus cereus (Fig. 4), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Aneurinibacillus migulanus*, displayed rainbow-edge iridescence, with these four expressing a common characteristic of thick and opaque colonies.

The metallic category comprised colonies exhibiting a silvery appearance under epi-illumination. As described in the literature (9), the $\Delta lasR$ mutant of *P. aeruginosa* exhibited a faintly silver appearance (Fig. 4). The metallic appearance of *Aneurinibacillus*

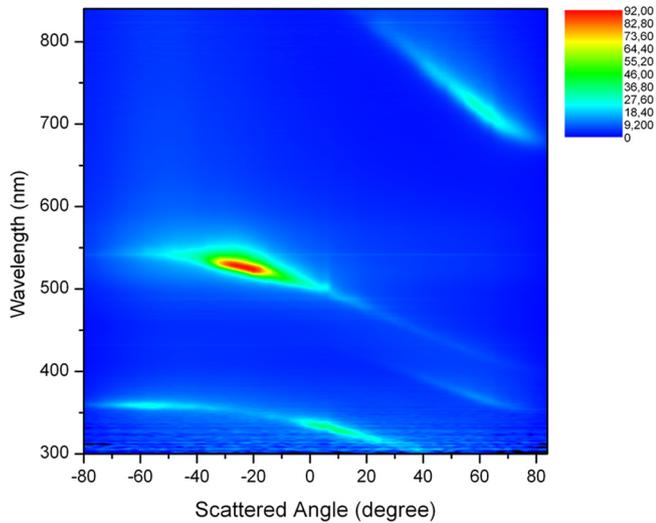


FIG 3 Color map showing the angle-dependent spectral reflectance of *Cellulophaga lytica* and confirming its iridescent appearance. The *C. lytica* sample was illuminated at a fixed light angle of -70° . Scattered wavelengths from 300 nm to 850 nm were recorded at different detection angles from -80° to 85° with 2° angle step resolution (the illumination plane and the detection plane were offset from each other by 3° to enable unobstructed detection over the full angle range). The color scale indicates the relative intensity of reflectance. The following emitted colors are given by the indicated wavelength value: UV, <400 nm; violet, 400 to 435 nm; blue, 435 to 490 nm; cyan, 490 to 520 nm; green, 520 to 560 nm; yellow, 560 to 590 nm; orange, 590 to 620 nm; red, 620 to 700 nm; and infrared, >700 nm.

migulanus type III previously described (2) could not be reproduced (see Table S1 in the supplemental material).

C. lytica strains were not iridescent under transillumination (Fig. 4). Their glitter-like iridescence is characterized principally by an intense green iridescent reflection. This novel iridescence is significantly higher in intensity than that of the bacterial structural coloration of all other three categories (Fig. 4). The iridescence of *C. lytica* was also found in another strain, DSM 2040, but not in the two strains CIP 103822 and DSM 2039. Moreover, the genome-sequenced strain DSM 7489 displayed only very-low-intensity iridescent color.

DISCUSSION

A marine bacterium exhibiting a bright iridescently colored colony appearance has been isolated in this study. Although other forms of bacterial iridescence have been described in selected literature, the phenomenon has never been comprehensively investigated or discussed.

The comparison of diverse bacteria by two illumination protocols, transillumination and epi-illumination, enabled the classification of four categories of bacterial iridescence. The rainbow-diffuse iridescence was common in particular in smooth colonies and was present in mucous, capsulated, and pathogenic bacteria. This iridescence, which has never been explained, has previously been used as an easily observed criterion to discriminate between capsulated and noncapsulated strains of *H. influenzae* (26, 54, 55).

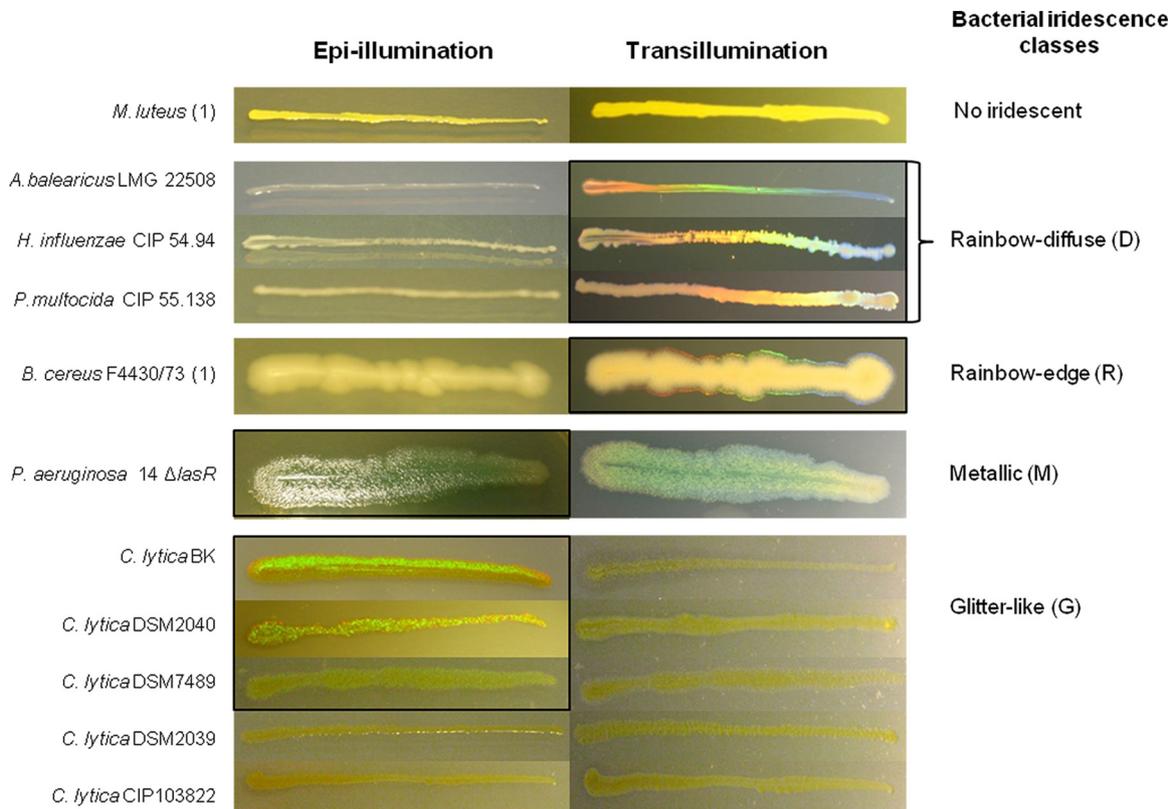


FIG 4 Examples of bacterial colonies belonging to different structural color categories. Observations were processed on epi- and transillumination. Iridescence categories are rainbow-diffuse (D), consisting of diffuse colors of the light spectrum; rainbow-edge (E), consisting of shining light spectrum color only on edges; metallic (M), consisting of silvery luster; and glitter-like (G), consisting of iridescent green in the middle and red and violet on the colony edges. Culture conditions are informed in Table S1 in the supplemental material.

The rainbow-edge iridescence was less common and might occur only at specific thicknesses of the colonies.

Only a few *P. aeruginosa* strains exhibited the metallic appearance. Surprisingly, two *P. aeruginosa* strains (ATCC 27853 and a clinical mucous strain) had both rainbow-diffuse (under transillumination) and metallic (under epi-illumination) iridescence. Metallic reflections in *P. aeruginosa* 14 $\Delta lasR \Delta pqsh$ have been linked to the accumulation of the 4-hydroxy-2-heptylquinoline molecule (9, 10, 77). However, no explanation as to how the accumulated molecule creates a metallic-looking reflection has yet been presented. Since metallic appearance is not associated with a change of color with angle, the term “metallic iridescence” should not be used.

A novel iridescence category for the appearance of isolated *C. lytica* was discovered and termed “glitter-like” iridescence. The practical measurement of a broad range of spectrophotometric reflection data on *C. lytica* colonies has enabled us to prove this structural color and to construct the map of wavelength-dispersive reflection bands. These represent a clear iridescence effect, namely, a change of reflected color with angle.

Interestingly, certain *C. lytica* strains appeared noniridescent. The sequenced strain LIM-21^T (ATCC 23178^T = DSM 7489) (50) exhibited low-intensity iridescence. Described to be identical in the bacterial collection banks, the strains DSM 7489 and CIP 103822 were found to have different colony morphologies; this has possibly led to their different iridescent characteristics. The *C. lytica* organism isolated in this study has the most intense glitter-like appearance.

The iridescence of *C. lytica* was mentioned only superficially in two studies. Colonies of *C. lytica* ATCC 23178^T with “metallic tinge” were evoked (33). The term “iridescent” was used only once in an algicidal bioactivity study of *C. lytica* ASM 21 (66). “Greenish metallic iridescence” was mentioned in the *Cellulophaga* genus in *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology* (5). It is noteworthy that *Cellulophaga (Cytophaga) lytica* was first related to the group *Bacteroides* and the order *Cytophagales* before its reclassification within the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group and the order *Flavobacteriales* (33). The unique illustration of *C. lytica* colony in the book *The Prokaryotes* does not show iridescence but shows only common yellow-pigmented colonies. Another picture of a *Cytophaga* species showed a very weak red color appearance described as iridescence (62). Since that date, “reddish-greenish iridescence” has been employed as a descriptor for strains belonging to the order *Cytophagales* in the second edition of *The Prokaryotes* or in *Bergey’s manual* but without additional explanations (37, 59, 60). Moreover, no mention or illustration of iridescence was found in the most recent editions (3, 4, 61). Glitter-like iridescence within the genus *Cellulophaga* and in the family *Flavobacteriaceae* is under investigation.

Structures responsible for the coherent scattering that creates the *C. lytica* iridescence are under investigation by electron microscopy; however, specialized preparation protocols are needed and under development for observation of the micron- and sub-micron-scale biofilm structures in their original state. However, since iridescence involves periodicity, then intercellular communication mechanisms may be involved in the multicellular organization (1, 11). Although these mechanisms are still unknown, it is possible that iridescence implies associated biological roles for spatial organization that offer advantage for the ensemble population. In addition, the iridescence of *C. lytica* colonies was ob-

served under epi-illumination. This manner of illumination is more natural and ubiquitous than transillumination and may also indicate potential ecobiological roles for the phenomenon.

In many higher organisms, structural colors have been strongly linked to biological functions associated with conspecific and interspecific communication purposes. However, these same structures can also serve noncommunication functions such as those related to thermoregulation, UV protection, light filtering, water repellency, mechanical friction reduction, or desiccation prevention (18). In lower organisms such as diatoms, the strong light manipulation associated with the periodic nanostructure on diatom frustule walls might influence the collection of more light into the photoreceptors for more optimized photosynthetic efficiencies (23, 45, 48). In contrast to these examples, the functional roles of iridescence in bacteria have never been explored. Also unanswered is whether bacterial iridescence occurs in natural habitats. *C. lytica*’s iridescence might provide a selective advantage under the relatively extreme conditions (high salinity, temperature variation, desiccation, and light exposure) of its habitats.

ACKNOWLEDGMENTS

Betty Kientz was a Ph.D. student with a grant from the Ministère de la Recherche et de l’Enseignement Supérieur. Peter Vukusic acknowledges the support of AFOSR grant FA9550-10-1-0020.

We are indebted to Deborah Hogan (Dartmouth Medical School), Olivier Gaillot (CHU Lille, Lille, France), and Jocelyne Caillon (CHU Nantes, Nantes, France) for providing bacterial strains. H. Agogue’s expert technical assistance with preliminary 16S rRNA gene sequence analysis is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Bassler BL. 2002. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109:421–424.
- Berditsch M, Afonin S, Ulrich AS. 2007. The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6620–6628.
- Bernardet J-F, Nakagawa Y. 2006. An introduction to the family Flavobacteriaceae, p 455–480. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (ed), *The prokaryotes*, 3rd ed, vol 7. Springer, New York, NY.
- Bowman JP. 2006. The marine clade of the family Flavobacteriaceae: the genera *Aequorivita*, *Arenibacter*, *Cellulophaga*, *Croceibacter*, *Formosa*, *Gelidibacter*, *Gillisia*, *Maribacter*, *Mesonina*, *Muricauda*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychroserpens*, *Robiginitalea*, *Salegentibacter*, p 677–694. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (ed), *The prokaryotes*, 3rd ed, vol 7. Springer, New York, NY.
- Bowman JP. 2011. Genus IX. *Cellulophaga* Johansen, Nielsen and Sjøholm 1999, 1238^{VP}, p 176–180. In Krieg NR, et al. (ed), *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, the Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes, 2nd ed, vol 4. Springer, New York, NY.
- Brink DJ, van der Berg NG, Botha AJ. 2002. Iridescent colors on seashells: an optical and structural investigation of *Helcion pruinosus*. *Appl. Optics* 41:717–722.
- Brogden KA. 1980. Physiological and serological characteristics of 48 *Pasteurella multocida* cultures from rabbits. *J. Clin. Microbiol.* 11:646–649.
- Chandler CA, Fothergill LD, Dingle JH. 1939. The pattern of dissociation in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 37:415–427.
- Cugini C, Morales DK, Hogan DA. 2010. *Candida albicans*-produced farnesol stimulates *Pseudomonas* quinolone signal production in LasR-defective *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microbiology* 156:3096–3107.
- D’Argenio DA, et al. 2007. Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* 64:512–533.

11. Davies DG, et al. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295–298.
12. DeAngelis PL, Jing W, Drake RR, Achyuthan AM. 1998. Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. *J. Biol. Chem.* 273:8454–8458.
13. De Kruif PH. 1921. Dissociation of microbial species. I. Coexistence of individuals of different degrees of virulence in cultures of the Bacillus of rabbit septicemia. *J. Exp. Med.* 33:773–789.
14. Dickinson L. 1948. The bacteriophages of *Pseudomonas pyocyanea*. 1. The effect of various substances upon their development. *J. Gen. Microbiol.* 2:154–161.
15. Dickinson L, Codd S. 1952. The bacteriophages of *Pseudomonas pyocyanea*. 2. Bacteriophage reproduction in an iridescent strain. *J. Gen. Microbiol.* 6:1–13.
16. Don PA, van den Ende M. 1950. A preliminary study of the bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hyg. (Lond.)* (48):196–214.
17. Doucet SM, Shawkey MD, Hill GE, Montgomerie R. 2006. Iridescent plumage in satin bowerbirds: structure, mechanisms and nanostructural predictors of individual variation in colour. *J. Exp. Biol.* 209:380–390.
18. Doucet SM, Meadows MG. 2009. Iridescence: a functional perspective. *J. R. Soc. Interface* 6(Suppl 2):S115–S132.
19. Engboek HC. 1950. The phenomenon of iridescence in bacterial cultures, with particular reference to Pfeiffer's bacillus. *Acta Pathol. Microbiol.* 27:388–393.
20. Fox DL. 1976. Animal biochromes and structural colours: physical, chemical, distributional & physiological features of coloured bodies in the animal world, 2nd ed. University of California Press, Berkeley, CA.
21. Gerwick WH, Lang NJ. 1977. Structural, chemical and ecological studies on iridescence in *Iridaea* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 13:121–127.
22. Ghiradella H. 1991. Light and color on the wing: structural colors in butterflies and moths. *Appl. Optics* 30:3492–3500.
23. Gordon R, Losic D, Tiffany MA, Nagy SS, Sterrenburg FAS. 2009. The glass menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology. *Trends Biotechnol.* 27:116–127.
24. Graves LM, et al. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:1280–1288.
25. Greenewalt CH, Brandt W, Friel DD. 1960. The iridescent colors of hummingbird feathers. *Proc. Am. Philos. Soc.* 104:249–253.
26. Guillot M. 1941. Relation entre certaines propriétés optiques des bactéries et leur forme géométrique vraie. Diffraction de la lumière par les cultures et symétrie de la bactérie. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 1100–1103.
27. Guillot M. 1942. Critères physiques d'homogénéité d'une culture de microbes vivants. *C. R. Soc. Biol.* 720–721.
28. Hadley P. 1924. Transmissible lysis of *Bacillus pyocyaneus*. *J. Infect. Dis.* 34:260–304.
29. Heddleston KL, Wessman G. 1975. Characteristics of *Pasteurella multocida* of human origin. *J. Clin. Microbiol.* 1:377–383.
30. Hoffman LR, et al. 2009. *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J. Cyst. Fibros.* 8:66–70.
31. Jasmin AM. 1945. An improved staining method for demonstrating bacterial capsules, with particular reference to *Pasteurella*. *J. Bacteriol.* 50:361–363.
32. Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. 1996. High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Mar. Biol.* 126:1–7.
33. Johansen JE, Nielsen P, Sjøholm C. 1999. Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49:1231–1240.
34. Land M. 1972. The physics and biology of animal reflectors. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24:75–106.
35. Lee DW. 1991. Ultrastructural basis and function of iridescent blue colour of fruits in *Elaeocarpus*. *Nature* 349:260–262.
36. Lee DW, Taylor GT, Irvine AK. 2000. Structural fruit coloration in *Delarbee michieana* (Araliaceae). *Int. J. Plant Sci.* 161:297–300.
37. Lewin RA, Lounsbury DM. 1969. Isolation, cultivation and characterization of flexibacteria. *J. Gen. Microbiol.* 58:145–170.
38. Liu Y, Shigley J, Hurwit K. 1999. Iridescent color of a shell of the mollusk *Pinctada margaritifera* caused by diffraction. *Opt. Express* 4:177–182.
39. Luppi A, Rocourt J, Bucci G, Maini P. 1986. Isolement de *Listeria* de l'eau du Pô. *Boll. Ist. Sieroter. Milan* 65:108–111.
40. Lythgoe JN, Shand J. 1989. The structural basis for iridescent colour changes in dermal and corneal iridophores in fish. *J. Exp. Biol.* 141:313–325.
41. Meadows MG, et al. 2009. Iridescence: views from many angles. *J. R. Soc. Interface* 6(Suppl 2):S107–S113.
42. Mulder J. 1939. *Haemophilus influenzae* of the respiratory type as a cause of purulent meningitis. *J. Pathol. Bacteriol.* 48:175–185.
43. Nicolle P, Jude A, Le Minor L. 1950. Relation entre l'intensité de l'irisation présentée par certaines colonies de *Salmonella* et leur constitution antigénique. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 78:572–582.
44. Nogrady G, Guérault A. 1964. Conditions favorisant l'iridescence bactérienne et l'observation du phénomène. *Rev. Can. Biol.* 23:367–373.
45. Noyes J, Sumper M, Vukusic P. 2008. Light manipulation in a marine diatom. *J. Mater. Res.* 23:3229–3232.
46. Ogg JE, Zelle MR. 1957. Isolation and characterization of a large cell possibly polyploid strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 74:477–484.
47. Parker AR. 1998. The diversity and implications of animal structural colours. *J. Exp. Biol.* 201:2343–2347.
48. Parker AR, Townley HE. 2007. Biomimetics of photonic nanostructures. *Nat. Nanotechnol.* 2:347–353.
49. Parker AR, Mckenzie DR, Ah Yong ST. 1998. A unique form of light reflector and the evolution of signalling in *Ovalipes* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Proc. R. Soc. Lond. B Biol.* 265:861–867.
50. Pati A, et al. 2011. Complete genome sequence of *Cellulophaga lytica* type strain (LIM-21^T). *Stand. Genomic Sci.* 4:221–232.
51. Pellegrini L, Pellegrini M. 1982. Iridescent bodies of *Cystoseira stricta* Sauvageau (Phaeophyta, Fucales): their fine structure, development and nature in vegetative cells. *Phycologia* 21:34–46.
52. Pijper A. 1918. Diffraction-phenomena in cultures of microorganisms. *Med. J. S. Afr.* 14:211–218.
53. Pijper A. 1923. Diffraction in biological structures. I. The structure of colonies of the coli-typhoid group. *S. Afr. Med. Rec.* 17:243–248.
54. Pijper A. 1952. Dimensional differentiation, filtration and separation of bacteria. *J. Pathol. Bacteriol.* 64:529–538.
55. Pittman M. 1931. Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *J. Exp. Med.* 53:471–493.
56. Ponder E. 1934. Diffraction patterns produced by bacteria. *J. Exp. Biol.* 11:54–57.
57. Preisz H. 1904. Studien über Morphologie und Biologie des Milzbrandbacillen (mit besonderer Berücksichtigung der Sporenbildung auch bei anderen Bacillen). *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Orig.* 35:280–293.
58. Prum RO, Torres R. 2003. Structural colouration of avian skin: convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. *J. Exp. Biol.* 206:2409–2429.
59. Reichenbach H. 1989. Genus I. Cytophaga Winogradsky 1929, 577, AL emend, p 2015–2050. In Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 3. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
60. Reichenbach H. 1992. The order Cytophagales, p 3631–3675. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H (ed), The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, NY.
61. Reichenbach H. 2006. The order Cytophagales, p 549–590. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (ed), The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, 3rd ed, vol 7. Springer, New York, NY.
62. Reichenbach H, Dworkin M. 1981. The order Cytophagales (with addenda on the genera *Herpetosiphon*, *Saprospira*, and *Flexithrix*), p 356–379. In Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (ed), The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria, 1st ed, vol 1. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
63. Rivas R, et al. 2007. *Alcanivorax balearicus* sp. nov., isolated from Lake Martel. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:1331–1335.
64. Schulz B, Guske S, Dammann U, Boyle C. 1998. Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* 25:213–227.
65. Seago AE, Brady P, Vigneron J-P, Schultz TD. 2009. Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural colour mechanisms in beetles (Coleoptera). *J. R. Soc. Interface* 6(Suppl 2):S165–S184.
66. Skerratt JH, Bowman JP, Hallegraef G, James S, Nichols PD. 2002. Algal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 244:1–15.
67. Stavenega DG, Leertouwer HL, Marshall NJ, Osorio D. 2011. Dramatic

- colour changes in a bird of paradise caused by uniquely structured breast feather barbules. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol.* 278:2098–2104.
68. Sutherland RL, Mäthger LM, Hanlon RT, Urbas AM, Stone MO. 2008. Cephalopod coloration model. I. Squid chromatophores and iridophores. *J. Opt. Soc. Am. A* 25:588–599.
 69. Vandamme P, et al. 1996. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:849–858.
 70. Vukusic P, Wootton RJ, Sambles JR. 2004. Remarkable iridescence in the hindwings of the damselfly *Neurobasis chinensis chinensis* (Linnaeus) (Zygoptera: Calopterygidae). *Proc. R. Soc. Lond. B Biol.* 271:595–601.
 71. Vukusic P, Sambles JR. 2003. Photonic structures in biology. *Nature* 424:852–855.
 72. Vukusic P, Sambles JR, Lawrence CR, Wootton RJ. 1999. Quantified interference and diffraction in single *Morpho* butterfly scales. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol.* 266:1403–1411.
 73. Vukusic P, Sambles JR, Lawrence CR, Wootton RJ. 2001. Structural colour: now you see it-now you don't. *Nature* 410:36.
 74. Vukusic P, Stavenga DG. 2009. Physical methods for investigating structural colours in biological systems. *J. R. Soc. Interface* 6(Suppl 2):S133–S148.
 75. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697–703.
 76. Welch V, Vigneron J-P, Lousse V, Parker A. 2006. Optical properties of the iridescent organ of the comb-jellyfish *Beroë cucumis* (Ctenophora). *Phys. Rev. E* 73041916:1–7.
 77. Wensinck F, van Dalen A, Wedema M. 1967. Iridescent material and the effect of iron on its production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 33:73–86.
 78. Whitney MW, et al. 2009. Floral iridescence, produced by diffractive optics, acts as a cue for animal pollinators. *Science* 323:130–133.
 79. Williams RC, Smith KM. 1958. The polyhedral form of the Tipula iridescent virus. *Biochim. Biophys. Acta* 28:464–469.
 80. Zierdt CH. 1971. Autolytic nature of iridescent lysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 37:319–337.

II. Données supplémentaires de l'article

Les données supplémentaires de l'article sont accessibles sur le site internet du journal (<http://aem.asm.org/>) et présentées ci-dessous avec une traduction des légendes.

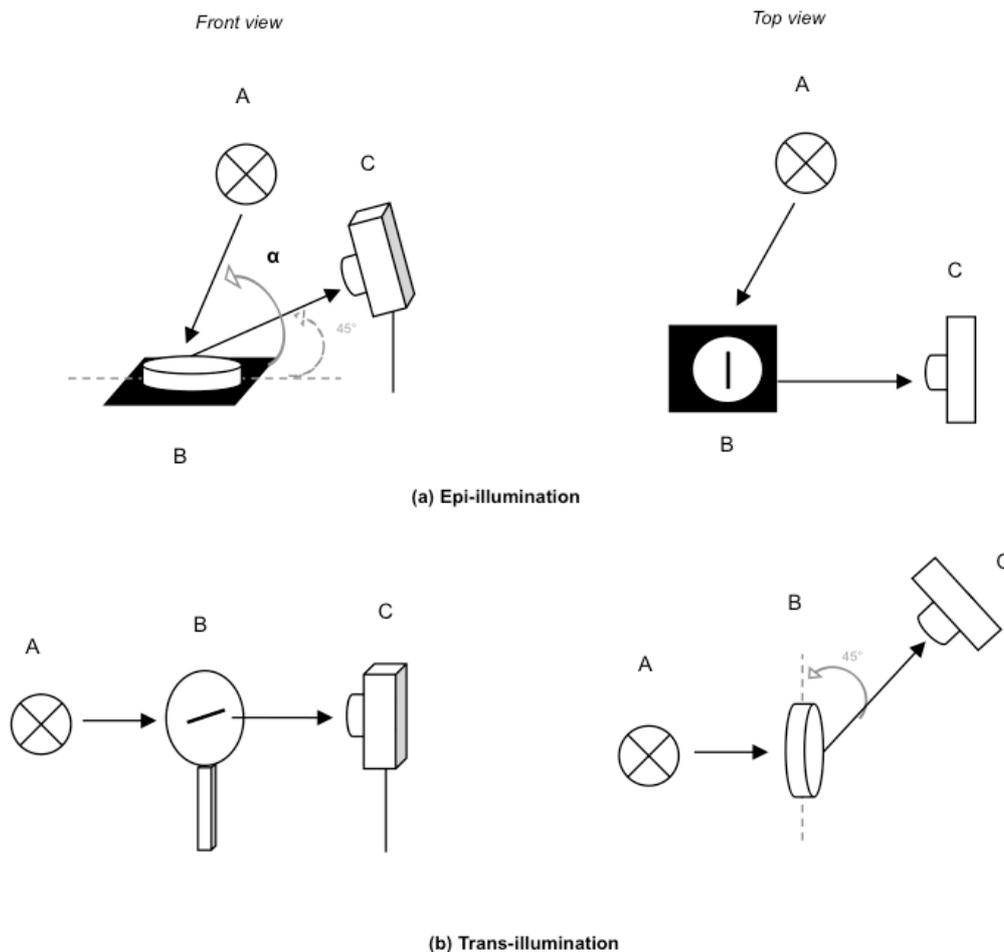


Figure S1. Montages expérimentaux pour l'observation macroscopique des iridescences bactériennes. Dans une pièce noire, le dispositif comprend une source de lumière (A), la boîte de Pétri avec une culture en strie (B) et un appareil photographique (C). L'iridescence est observée en épi-illumination (a) ou en transillumination (b). Sous épi-illumination, cinq angles d'éclairage (α) sont disponibles : 22.5° , 67.5° , 90° , 112.5° ou 135° permettant l'observation des couleurs transitoires. Lors de la comparaison des iridescences, l'angle α de 67.5° est conservé.

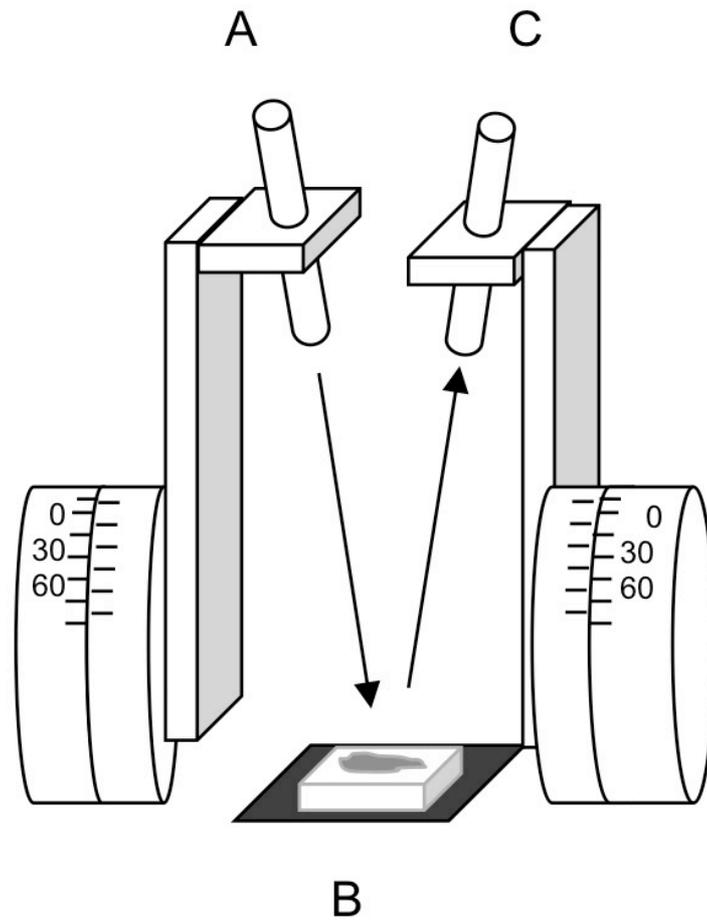


Figure S2. Montage de microspectrophotométrie. Un morceau d'agar et de colonie (B) est illuminé par une source de lumière (A). Les longueurs d'ondes diffractées sont collectées par le détecteur (C) relié à un spectrophotomètre assisté par ordinateur.

Table S1. Iridescence d'une grande variété de bactérie observée selon deux méthodes (trans- et épi-illumination).

Souches bactériennes	Code	Origine	Culture		Iridescence	
			Milieu	T °C	Transillumination	Epi-illumination
Gram positives						
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 4698	Souchier LIENSs	NA	37°C	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Souchier LIENSs			-	-
	(1)	Souchier LIENSs			+ ^D	-
	(2)*	Dr Jocelyne Caillon			+ ^D	-
<i>Staphylococcus epidermis</i>	(1)	Souchier LIENSs			+ ^D	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	Souchier LIENSs			-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	CIP 52.92	Souchier LIENSs		30°C	+ ^D	-
<i>Bacillus megatherium</i>	(1)	Souchier LIENSs			-	-
<i>Bacillus cereus</i>	F4430/73(1)	Souchier LIENSs	BHA		++ ^E	-
	(2)*	Souchier LIENSs			++ ^E	-
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	LMG 15427 ^T	Collection LMG			++ ^E	-
<i>Listeria marthii</i>	DSM 23813	Collection DSMZ	Tryp A		+ ^D	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	EGD wild type	Dr Olivier Gaillot			-	-
	ROG 005*	Dr Olivier Gaillot			-	-
	LQ28*	Dr Olivier Gaillot			+ ^D	-
	(1)*	Souchier LIENSs			+ ^D	-
	ATCC 35150	Souchier LIENSs			+ ^D	-
<i>Lactococcus lactis</i>	INA 45	Souchier LIENSs	TSA		+ ^D	-
Gram negatives						
<i>Haemophilus influenzae</i>	DSM 10001	Collection DSMZ	Lev XV		-	-
	DSM 11970	Collection DSMZ			-	-
	Uncapsulated*	Dr Olivier Gaillot			-	-
	Capsulated f*	Dr Olivier Gaillot			+ ^D	-
	DSM 10000	Collection DSMZ			+ ^D	-
	DSM 11969	Collection DSMZ			+ ^D	-
	CIP 54.94	Collection CIP			++ ^D	-
	Capsulated b*	Dr Olivier Gaillot			++ ^D	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Souchier LIENSs	LB		+ ^D	+ ^M
	Pa14 WT	Dr Deborah Hogan			+ ^D	-
	Pa14 $\Delta lasR$	Dr Deborah Hogan			-	++ ^M
	Pa14 $\Delta lasR \Delta pqsh$	Dr Deborah Hogan			-	+ ^M
	Mucuous*	Dr Jocelyne Caillon			+ ^D	+ ^M
	Nonmucuous*	Dr Jocelyne Caillon			+ ^D	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	(1)	Souchier LIENSs			+ ^D	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	(1)*	Souchier LIENSs	NA		+ ^D	-
<i>Escherichia coli</i>	(1)	Souchier LIENSs			+ ^D	-
	ATCC 25922	Souchier LIENSs			+ ^D	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(1)	Souchier LIENSs			++ ^D	-
	(2)*	Souchier LIENSs			+ ^D	-
	(3)*	Souchier LIENSs			+ ^E	-
	CIP 53153	Souchier LIENSs			-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	(1)	Souchier LIENSs			+ ^D	-
	(2)	Souchier LIENSs			+ ^D	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	CIP 5858	Souchier LIENSs			+ ^D	-
<i>Salmonella typhi</i>	(1)	Souchier LIENSs			+ ^D	-
	(2)*	Souchier LIENSs			+ ^D	-
<i>Serratia marcerens</i>	CIP 67.55	Souchier LIENSs			+ ^D	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	(1)*	Dr Jocelyne Caillon			++ ^E	-
<i>Mannheimia haemolytica</i>	CIP 103426	Collection CIP	Tryp A		++ ^D	-
<i>Pasteurella multocida</i>	CIP 55.129	Collection CIP			-	-
	CIP 55.130	Collection CIP			+ ^D	-
	CIP 55.138	Collection CIP			+ ^D	-
	CIP 103286	Collection CIP			++ ^D	-
	LMG 2851	Collection LMG			+ ^D	-
	LMG 4222	Collection LMG			-	-
<i>Alcanivorax balearicus</i>	LMG 22508	Collection LMG	TPA	30°C	++ ^D	-
<i>Bordetella trematum</i>	CIP 105306	Olivier Gaillot	Tryp A		+ ^D	-
<i>Salmonella enterica</i>	CIP 54.100	Collection CIP			+ ^D	-
	CIP 60.62	Collection CIP			+ ^D	-
	LMG 10396	Collection LMG			-	-
	LMG 14933.1	Collection LMG			-	-
	LMG 16739	Collection LMG			+ ^D	-
	LMG 22714	Collection LMG			+ ^D	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	(1)*	Souchier LIENSs			+ ^D	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CIP 80.27	Collection CIP			-	-
	CIP 81.42	Collection CIP			+ ^D	-
	(1)*	Souchier LIENSs			+ ^D	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	CIP 6321	Souchier LIENSs			+ ^D	-
<i>Vibrio anguillarum</i>	(1)	Souchier LIENSs	MA		-	-
<i>Vibrio lesteus</i>	(1)	Souchier LIENSs			-	-
<i>Cellulophaga lytica</i>	CIP 103822	Collection CIP		25°C	-	-
	DSM 2039	Collection DSMZ			-	-
	DSM 2040	Collection DSMZ			-	+ ^G
	DSM 7489 [†]	Collection DSMZ			-	+ ^G
	BK (cette étude)	Souchier LIENSs			-	++ ^G

Classes d'iridescence : "Rainbow-diffuse" (D), "Rainbow-edge" (E), Métallique (M), et "Glitter-like" (G)

Intensité d'iridescence, - : non iridescente, + : iridescente, ++ : intenses iridescente. * Souche clinique, † Souche séquencée.

Origines spécifiques: Dr Olivier Gaillot, CHU Lille, France; Dr Jocelyne Caillon, CHU Nantes, France; Dr Deborah Hogan, Dartmouth Medical School, USA.

Vidéos

Le CD contenant les fichiers vidéo et le plan de celui-ci sont disponibles à la fin du manuscrit en Annexe 4, page 273.

Vidéo « Chapitre 1. a » (Movie #1 dans l'article). Colonie de *C. lytica* (MA) x30. Iridescence d'une colonie de *C. lytica* après une croissance sur du MA, observée à l'aide du microscope Keyence avec un agrandissement x30. La plaque subit une rotation continue de 360°. La souche est cultivée à l'aide d'une inoculation en strie sur une gélose de MA incubée 24h à 25°C. Spécifiquement pour cette observation, de l'encre noire est ajoutée au milieu permettant de limiter la réflexion de la lumière par l'agar.

Vidéo « Chapitre 1. b » (Movie #2 dans l'article). Colonie de *C. lytica* (LN) x100. Iridescence d'une colonie de *C. lytica* après croissance sur du LN, observée à l'aide du microscope Keyence avec un agrandissement x100. La plaque subit une rotation continue de 360°. La souche est cultivée à l'aide d'une inoculation en strie sur une gélose LN incubée 24h à 25°C.

Vidéo « Chapitre 1. c » (Movie #3 dans l'article). Colonie de *C. lytica* (MA) x 200 sous des angles d'incidence variables de la lumière. Observation des colorations transitoires des colonies après croissance sur du MA, observées à l'aide du microscope Keyence avec un agrandissement x200. En déplaçant l'anneau de variation de lumière, l'illumination varie de façon continue d'une orientation verticale à horizontale. La souche est cultivée à l'aide d'une inoculation en strie sur une gélose de MA incubée 24h à 25°C.

III. Analyses complémentaires de l'étude

III.1 Autres vidéos du phénomène

Vidéo « Chapitre 1. d ». Colonie de *C. lytica* (MA) x100. Iridescence d'une colonie de *C. lytica* après croissance sur du MA, observée à l'aide du microscope Keyence avec un agrandissement x100. La plaque subit une rotation continue de 360°. Les différentes colorations sont bien visualisées avec cet agrandissement. Les zones varient en intensité lors de la rotation.

Vidéo « Chapitre 1. e ». Colonie de *C. lytica* (CYT) x200. Iridescence d'une colonie de *C. lytica* après croissance sur du CYT, observée à l'aide du microscope Keyence avec un agrandissement x200. La plaque subit une rotation continue de 360°. Sur ce milieu, l'iridescence est intense et la colonie moins pigmentée.

Vidéo « Chapitre 1. f ». Colonie de *C. lytica* (CYT) x100 sous des angles d'incidence variables de la lumière. Observation des colorations transitoires des colonies après croissance sur du CYT à l'aide du microscope Keyence avec un agrandissement x100. En déplaçant l'anneau de variation de lumière, l'illumination varie de façon continue d'une orientation verticale à horizontale. Les colonies sont majoritairement vertes en illumination directe (verticale) et bleues en lumière rasante (horizontale) sur ce milieu.

Vidéo « Chapitre 1. g ». Colonie de *C. lytica* (MA) x50 avec rotation de la caméra. Iridescence d'une colonie de *C. lytica* après croissance sur du MA, observée à l'aide du microscope Keyence avec un agrandissement x50. La caméra subit une rotation au dessus de l'échantillon de 50° à -45°. Pour des angles rasants l'iridescence est plus intense et verte. L'orientation verticale fait apparaître des colorations bleutées dans les colonies. Des formations en cercles sont remarquées.

III.2 Méthodes de culture différentes

III.2.a Culture sur milieux noirs

Des géloses supplémentées d'encre noire sont utilisées pour permettre une observation plus aisée de l'iridescence (Figure 35). Toutes les couleurs sont observées au maximum de leur intensité. Normalement non visible sur une gélose sans encre, du bleu est distingué pour des angles d'illumination rasants (135°) (Figure 35A). L'encre noire semble limiter la perte d'intensité due aux réflexions dans l'agar. Cette méthode de culture est adaptée à l'observation des colonies iridescentes mais pas à la prise de photographie. En effet, les couleurs sont très intenses, l'appareil sature rapidement et la mise au point est ardue. Par ailleurs, la croissance est limitée après 48h. Aucune étude n'évalue l'influence de l'encre sur la physiologie bactérienne. Pour ces raisons, la culture sur milieux noirs n'a pas été conservée dans les études ultérieures.

III.2.b Culture sur membrane

Afin d'évaluer si l'iridescence est visible dans des conditions favorisant la formation de biofilm, une méthode de culture sur membrane est testée. Un biofilm se développe, la pigmentation jaune-orange est importante et une iridescence verte est observée (Figure 36). Cependant l'intensité est plus faible que lors d'une culture sur gélose.

III.3 Test d'étalement de la colonie

En contraste avec les structures iridescentes rigides d'ailes de papillons, les colonies de *C. lytica* ont une consistance muqueuse. Malgré son aspect fragile, le biofilm contient pourtant un degré élevé de structuration permettant l'expression d'une iridescence. Afin d'évaluer la solidité de ces structures, un test d'étalement des colonies est pratiqué. A l'aide d'une spatule, des colonies sont retirées de la gélose et étalées sur une surface plastique noire (Figure 37). L'apparence pailletée des colonies n'est pas conservée, cependant les couleurs d'iridescence sont visibles. Au fur et à mesure du dessèchement rapide du biofilm, celui-ci arbore des variations de couleurs d'iridescence : le vert, le bleu, le rouge et finit par devenir transparent.

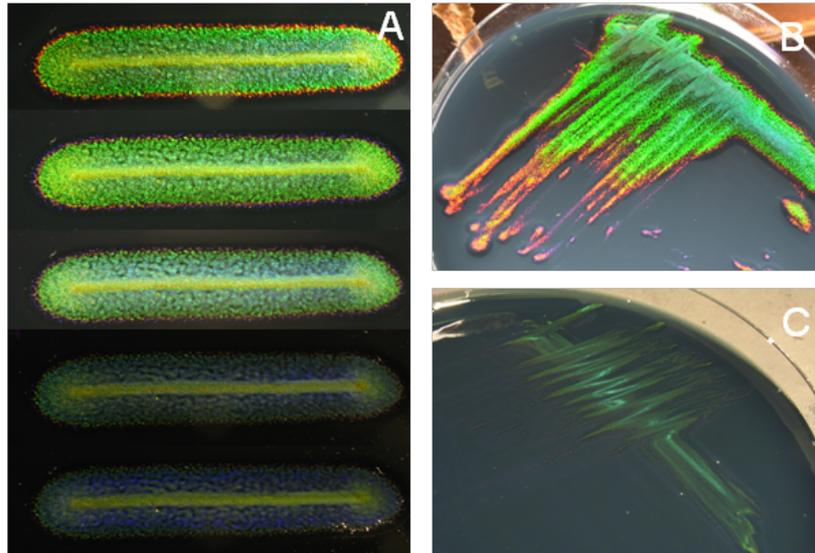


Figure 35. Culture de *C. lytica* CECT 8139 sur milieux noirs, MA noir (A), CYT noir (B) et LN noir (C). L'inoculation en strie est appliquée pour la culture milieu MA noir (A) avec les différents angles d'illumination de haut en bas respectivement : 22.5°, 67.5°, 90°, 112.5° et 135°.

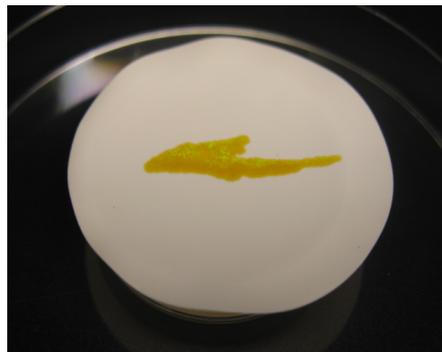


Figure 36. Biofilm de *C. lytica* CECT 8139 en culture sur une membrane au contact de milieu MB.

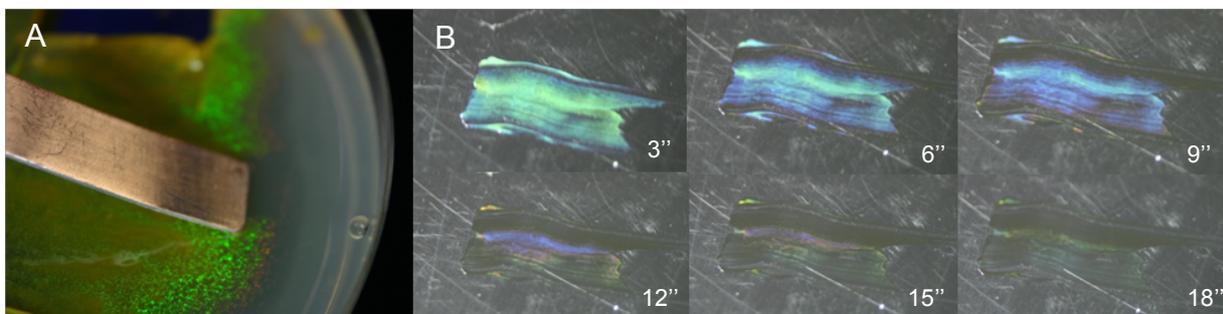


Figure 37. Colonie de *C. lytica* CECT 8139 issue d'une culture sur MA (A), étalée sur une feuille de plastique noire et photographiée environ toutes les trois secondes (B).

III.4 Observations microscopiques

III.4.a Variations de l'illumination sur différents milieux

Une analyse similaire a été réalisée dans l'article 1 sur milieu MA. L'étude est étendue ici avec des cultures sur CYT, LN et MA noir. De plus, les transitions des couleurs sont observées plus progressivement avec des angles d'illumination intermédiaires. Les couleurs d'iridescence principales sur les milieux CYT et LN sont vertes et bleues respectivement en orientation lumineuse directe et rasante (Figure 38). Sur le milieu MA noir, les colorations rouges et violettes en bords de colonie changent en fonction de l'orientation de la lumière. Le rouge se distingue mieux en lumière rasante. Au centre des colonies, pour une orientation verticale, la couleur dominante correspond à du vert/jaune ; en lumière rasante elle est essentiellement verte/bleue. Cette variation de couleurs est également visible sur la vidéo « Chapitre 1. f ».

III.4.b Rotation de la caméra

Pour observer l'iridescence au niveau microscopique avec un changement d'angle d'observation, la caméra peut subir une rotation de -45° à 50° par rapport à son axe vertical (0°). La source lumineuse étant issue de la caméra, des changements d'angle d'observation et d'illumination sont obtenus simultanément. Pour un angle rasant, le rouge est facilement distingué sur les bords des colonies avec un dégradé de jaune, puis de vert dominant (Figure 39). L'orientation directe laisse apparaître une coloration bleue à l'intérieur de la colonie. Ces données sont également visibles sur la vidéo « Chapitre 1. g ».

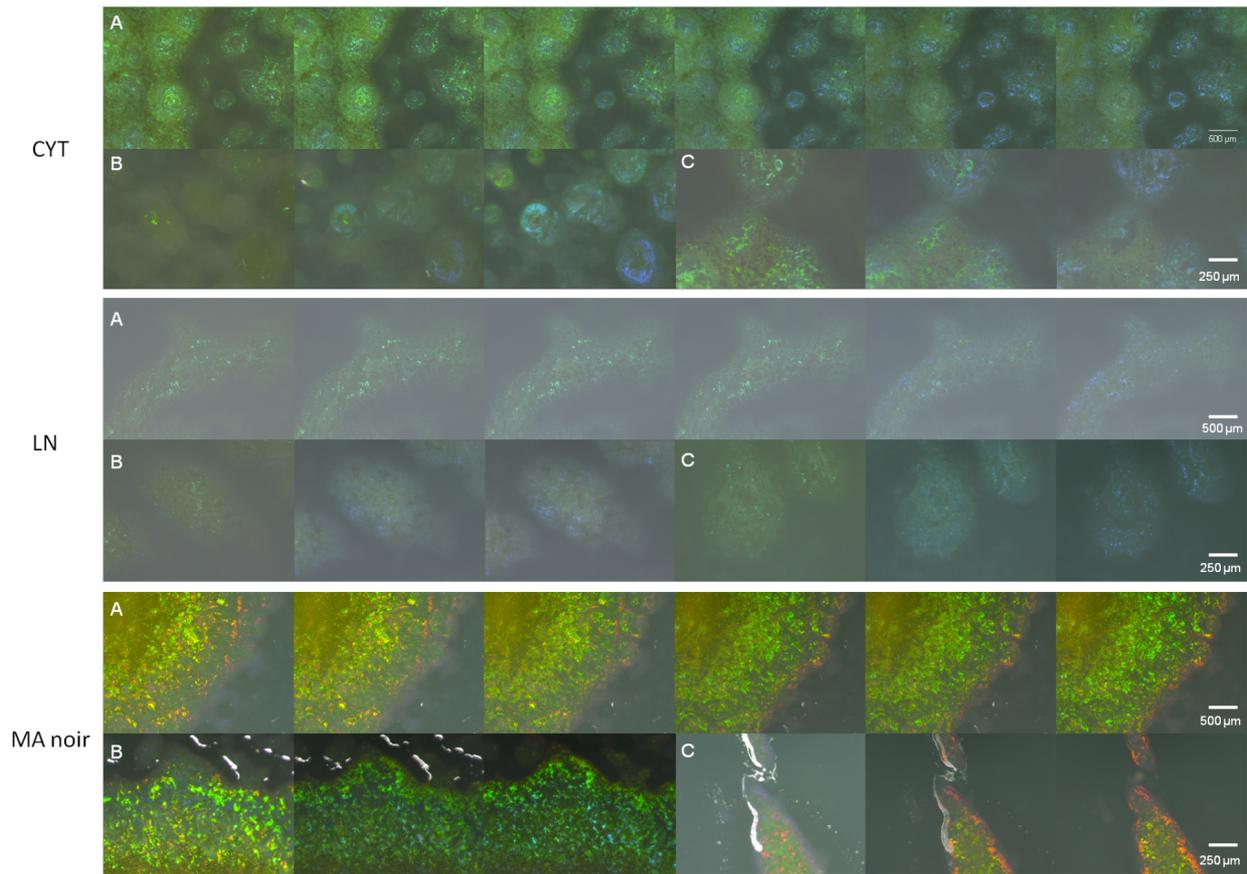


Figure 38. Observations au microscope Keyence des variations de colorations selon l'orientation de l'illumination de *C. lytica* CECT 8139. Les images de gauche correspondent à une lumière directe (orientation verticale), celles de droite correspondent à une incidence rasante (orientation horizontale) avec des incidences intermédiaires entre les deux. La variation est plus progressive (A) ou restreinte à trois clichés (B, C) sur milieux CYT, LN et MA noir. Les grossissements correspondent aux x100 (A) et x200 (B, C).

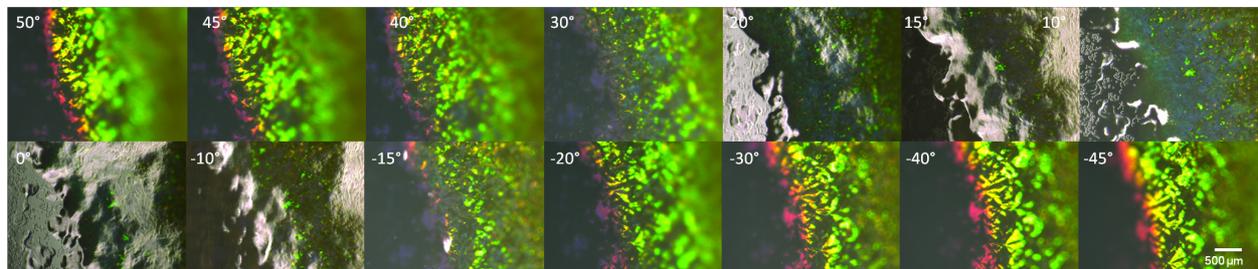


Figure 39. Images microscopiques des colorations de *C. lytica* CECT 8139 sur MA en fonction de l'angle d'observation.

IV. Principaux résultats et discussion

Les procédés expérimentaux spécifiquement adaptés à l'observation de l'iridescence bactérienne ont permis de recueillir des données précises. En particulier, la conception de montages en transillumination et épi-illumination appliqués à la prise de photographie a été essentielle. La méthode d'inoculation en strie s'est montrée appropriée à l'observation des différentes iridescences bactériennes. L'épuisement de la colonie par cette technique autorise une bonne visualisation des changements de coloration des colonies de *C. lytica* BK (= CECT 8139) en fonction de l'angle d'illumination. De plus, l'examen microscopique à l'aide de l'anneau de variation d'illumination permet une observation détaillée du phénomène. Ce dernier étant difficile à photographier, les vidéos apportent une valeur ajoutée dans son appréhension. L'addition d'encre aux milieux gélosés améliore également la perception de l'iridescence. Ces innovations techniques apportent les bases de l'observation des iridescences bactériennes.

Les analyses macroscopiques et microscopiques des effets de coloration atypiques de *C. lytica* CECT 8139 mettent en évidence une iridescence intense. Ce phénomène se caractérise par des centres microscopiques brillants tels des paillettes. Bien que la couleur majoritaire soit verte, un dégradé de jaune, rouge, violet et bleu se distingue en bordure des colonies. Lors de changements d'angles d'illumination, les paillettes varient en couleur et en intensité. Nous avons déterminé que l'illumination rasante est privilégiée pour un maximum d'intensité. Le phénomène est également influencé par le milieu de culture. En effet, sur le milieu pauvre LN composé d'eau de mer et d'agar, les colonies transparentes sont essentiellement vertes iridescentes. La motilité par « gliding » et l'agarolyse sont présentes sur les colonies de *C. lytica* CECT 8139.

Nous voulions donner une confirmation concrète de la couleur structurale exprimée par les colonies de *C. lytica* CECT 8139. De façon inédite, une preuve physico-optique a été apportée grâce à une analyse en microspectrophotométrie. Ces données montrent clairement un changement des longueurs d'ondes diffractées en fonction de l'angle de détection, confirmant une iridescence. La carte spectrale révèle une diffraction importante dans le vert puis le bleu et de manière inattendue dans l'ultraviolet et l'infrarouge.

Après avoir caractérisé l'iridescence de *C. lytica* CECT 8139, le deuxième objectif consistait à démontrer sa singularité au sein des iridescences bactériennes, celles-ci étant sujettes à de nombreuses ambiguïtés dans la littérature. La comparaison de 74 souches a révélé divers phénomènes d'iridescences. Quatre catégories ont alors été définies. Nous proposons ainsi la première classification des iridescences bactériennes. En transillumination, l'iridescence « rainbow-diffuse » correspond à un effet arc-en-ciel d'intensité moyenne sur toute la colonie. Ce phénomène est commun à diverses souches et notamment à celles d'origine clinique. Par cette méthode d'éclairage, un deuxième phénomène encore inconnu dans la littérature a été observé sur quelques souches et dénommé « rainbow-edges ». Toutes les couleurs du spectre sont visibles de façon intense mais exclusivement sur les bords des colonies. En épi-illumination, l'apparence « métallique » décrite précédemment a été retrouvée chez des *P. aeruginosa*. L'iridescence de *C. lytica* CECT 8139 en épi-illumination est très différente des autres phénomènes. Ainsi, une nouvelle catégorie a été spécialement créée. Ce phénomène, illustré par des centres iridescents, est nommé iridescence « glitter-like » (« tel des paillettes »). Ces analyses démontrent qu'un mode d'observation adapté est essentiel pour détecter l'iridescence et caractériser le phénomène. Dans les conditions basiques d'expérimentation, le phénomène peut être difficile à observer ce qui peut expliquer en partie l'omission des effets pour certaines souches.

De façon intéressante, différentes intensités du phénomène ont été observées au sein de l'espèce *C. lytica*. Deux des souches commandées n'expriment aucune iridescence sur MA : *C. lytica* CIP103822 et *C. lytica* DSM 2039. La souche séquencée *C. lytica* DSM 7489 n'est que faiblement iridescente. Des écotypes d'iridescence pourraient donc exister au sein de cette espèce. En se basant sur les correspondances des souches, *C. lytica* CIP 103822 et *C. lytica* DSM 7489 devraient être identiques (Tableau 11, page 74). Dans notre étude, les colonies des deux souches sont différentes par leur iridescence mais également par leur aspect. *C. lytica* DSM 7489 possède une motilité « gliding » plus visible. Ceci peut être dû à une erreur de correspondance entre les souches, à une variabilité phénotypique ou encore une instabilité génétique des souches.

Cette étude présente des travaux inédits et essentiels à la caractérisation de l'iridescence originale d'une souche marine. Par ailleurs, elle clarifie pour la première fois les différents phénomènes et établit les bases fondamentales, techniques et méthodologiques de l'iridescence au sein des procaryotes.

V. Perspectives de l'étude

L'iridescence des colonies de *C. lytica* CECT 8139 est désormais prouvée, illustrée et détaillée ; elle est de plus singulière. Cette souche environnementale exprime un effet intense en épi-illumination, ce phénomène semble donc plus naturel que l'iridescence en transillumination. En effet, l'illumination directe est une voie d'exposition utilisée par les organismes supérieurs iridescents. En comparaison avec les autres iridescences bactériennes, il est donc plus aisé de soupçonner des rôles biologiques ou écologiques pour l'iridescence « glitter-like » de *C. lytica*. Les fonctions de l'iridescence sont le plus souvent associées à des communications inter- et intra-spécifiques. Excepté dans le cas d'une symbiose, les bactéries ne semblent avoir que peu d'intérêt à utiliser ces fonctions de communication. Des rôles non-communicatifs liés aux propriétés optiques et structurales de l'iridescence seraient plus appropriés tels la thermorégulation, la photoprotection ou des propriétés antisalissure (Doucet & Meadows, 2009 ; Seago et al, 2009).

Cette étude démontre que l'iridescence bactérienne n'est pas composé d'un phénomène unique. L'iridescence en transillumination (rainbow-diffuse) a été décrite comme critère d'identification de souches virulentes, encapsulées et muqueuses (Nogrady & Guérault, 1964). Dans nos travaux, certaines souches non pathogènes sont « rainbow-diffuse » telle *Alcanivorax balearicus*. Cette méthode de reconnaissance ne semble donc pas adaptée à toutes les espèces bactériennes. Il serait intéressant de comparer un panel encore plus étendu de souches. Les structures iridescentes en transillumination et l'effet métallique ne seront pas élucidés dans cette thèse. Plusieurs auteurs ont tenté d'expliquer les phénomènes mais aucune hypothèse n'a pu être validée. Ces structures sont donc encore inconnues et pourraient être explorées grâce à des outils de microscopie comme par exemple la microscopie électronique à transmission ou la microscopie confocale.

La découverte de cette souche a soulevé un grand nombre de question, en particulier car le phénomène est original et produit par une bactérie de l'environnement. Dans la suite de ce mémoire nous avons souhaité étudier : la modulation de l'iridescence de *C. lytica* par culture (Chapitre 2), l'iridescence de *Bacteroidetes* et le lien avec la motilité « gliding » (Chapitre 3), la présence et la distribution des bactéries iridescentes dans divers biotopes marins (Chapitre 4) et l'élucidation des structures responsables de l'iridescence (Chapitre 5).

Chapitre 2.

INFLUENCE DE FACTEURS ABIOTIQUES
DANS L'IRIDESCENCE DE *C. lytica*



I. Démarche scientifique

Dans le chapitre précédent, nous avons caractérisé l'iridescence singulière de *C. lytica* CECT 8139. Le profil d'iridescence commun aux milieux MA et CYT correspond à des centres de couleurs intenses à dominance verte avec un dégradé de jaune, rouge, violet et bleu sur les bords de colonie. Dans ces zones périphériques, la densité cellulaire est supposée plus faible. Par ailleurs, le test d'étalement de la colonie montre un changement de couleur selon l'épaisseur du biofilm. Afin de préciser ce lien, nous avons souhaité réaliser un test en goutte de densité croissante.

Dans l'étude précédente, nous avons remarqué que les colonies sont transparentes et présentent une iridescence uniquement verte sur le milieu LN. Certains facteurs de culture semblent par conséquent influencer sur l'iridescence des colonies. Les composants du milieu pauvre LN sont les sels marins et l'agar. Ces données indiquent que le phénomène est conservé en condition de croissance limitée. Dans ce chapitre, nous souhaitons donc étudier l'expression de l'iridescence de *C. lytica* CECT 8139 en fonction de facteurs abiotiques. *C. lytica* CECT 8139 est issue d'un estran rocheux et plus particulièrement de la surface d'une anémone. Les conditions de ce milieu marin sont stressantes en raison du cycle des marées (variations de température, de salinité et d'exposition à la lumière). Les organismes vivant dans cet environnement doivent également résister à la dessiccation. Dans ce chapitre nous avons employé certaines conditions de culture qui miment celles retrouvées dans le biotope de *C. lytica*. Par ces expériences, nous souhaitons évaluer la conservation de l'iridescence dans diverses conditions afin de nous guider sur le potentiel de survie *in situ* de la souche et les rôles bio-écologiques associés.

L'iridescence de *C. lytica* CECT 8139 a été suivie en jouant par exemple sur les paramètres suivants : une cinétique de croissance, une large gamme de température, une variation d'exposition à la lumière, une orientation des cultures (test de gravité), des essais de solidité du milieu en modulant la concentration en agar et l'ajout ou le retrait de certains composés du milieu. Les facteurs liés au biotope correspondaient à un besoin en sels marins, une salinité élevée et une température basse.

Ces analyses ont été publiées dans le journal *FEMS Microbiology Letters* en Août 2012. Les données sur l'influence du magnésium et du calcium, ainsi que l'effet du dessèchement de la gélose sont exposées dans la partie analyses complémentaires.

Article 2.

Effect of abiotic factors on the unique glitter-like iridescence of *Cellulophaga lytica*

Publié en Août 2012 dans le journal FEMS Microbiology Letters

Effect of abiotic factors on the unique glitter-like iridescence of *Cellulophaga lytica*

Betty Kientz, Pauline Marié & Eric Rosenfeld

UMR 7766 CNRS, LIENSS Littoral Environnement & Sociétés, Université de La Rochelle, La Rochelle, France

Correspondence: Eric Rosenfeld, UMR 7266 CNRS-ULR, LIENSS, University of La Rochelle, Bâtiment Marie Curie, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.
Tel.: +33 5 46 45 82 28; fax: +33 5 46 45 82 65; e-mail: eric.rosenfeld@univ-lr.fr

Received 10 April 2012; revised 18 May 2012; accepted 18 May 2012.

DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02614.x

Editor: Aharon Oren

Keywords

bacterial iridescence; marine bacterium; *Cellulophaga lytica*; environmental stresses.

Abstract

Iridescence is a property of structural color that has been poorly documented in the prokaryotic kingdom. We recently isolated a *Cellulophaga lytica* strain that exhibits, on solid media, a unique intense glitter-like iridescence in reflection. Iridescence of *C. lytica* CECT 8139 was optically and physically characterized but physiological significance of the phenomenon was not. In the present work, we investigated the effect of key abiotic factors on *C. lytica*'s growth and iridescence. Special attention was paid to conditions that mimic rocky shore ecosystem, the natural biotope of *C. lytica*. We found that *C. lytica*'s iridescence required the presence of seawater. The phenomenon was not influenced by light exposure or plate orientation during growth. *Cellulophaga lytica*'s iridescence occurred under a wide range of culture conditions notably under psychrophilic, halophilic, and hydric stress conditions. Changes in colonies' colors (blue, violet, red, yellow, and green) were linked to cell density. These data indicate that iridescence is induced under conditions that mimic the natural biotope of *C. lytica*.

Introduction

In living organisms, coloration processes can have diverse origin. The most common process is pigmentation where molecules, pigments, change the color of reflected or transmitted light as the result of wavelength-selective absorptions. In contrast, iridescence is a structural color. Micron- and sub-micron-sized structures are responsible for light interferences. The periodicity and dimension of these structures confer the property to reflect specific wavelengths and create intense colors. A particularity of iridescence is angle-dependent color changes (Fox, 1976; Vukusic *et al.*, 2001). This appearance has been well studied in higher organisms particularly in Insecta (Ghiradella, 1991; Vukusic *et al.*, 2004; Seago *et al.*, 2009), Aves (Greenewalt *et al.*, 1960; Prum & Torres, 2003; Doucet *et al.*, 2006), and in fishes (Land, 1972; Lythgoe & Shand, 1989). Iridescence is also encountered in viruses (Williams & Smith, 1958) and in marine organisms such as stenophore (Welch *et al.*, 2006) and diatoms (Noyes *et al.*, 2008). Iridescence has been poorly studied in the

prokaryote kingdom. Both direct illumination and trans-illumination have been used to observe colonies' iridescence on solid media (Pijper, 1923; Nogrady & Guérault, 1964; Zierdt, 1971). Recently (Kientz *et al.*, 2012), a comparison of a wide range of bacterial strains permitted to defined four classes of iridescence: rainbow-diffuse and rainbow-edge iridescences under trans-illumination and, metallic appearance and intense glitter-like iridescence under direct illumination. *Cellulophaga lytica* was the unique bacterium belonging to the latter class. As this type of iridescence occurred under direct natural light exposure, it was described as a more natural coloration effect. The visual appearance corresponds to sub-millimeter-sized centers of color of varying brightness distributed across the biofilm giving a glitter-like character. Iridescent green is the dominant color, but red and blue-violet are also observed at the colonies' edges on classical marine media.

Though the physiology of *C. lytica* has never been thoroughly characterized, some microbiological features (Johansen *et al.*, 1999) and genomic data (Pati *et al.*,

2011) suggest that the bacterium is well adapted to extreme conditions. Moreover, *C. lytica* is frequently isolated from coastal shore. In this biotope, high variations of temperature, salinity, or light exposure are common. It is still unknown whether *C. lytica*'s iridescence can occur under such conditions, *in vitro* or in natural habitats.

In the present work, we examine the effect of key abiotic factors on *C. lytica*'s iridescence. Several stress conditions that mimic the natural biotope of the bacterium were preferentially employed.

Materials and methods

Culture media

Unless otherwise specified, agar concentration was 1.5%. Ready-to-use media marine agar (MA), nutrient agar (NA), tryptic soy agar (TSA), and Luria–Bertani (LB) were purchased from Dutscher (France). Cytophaga agar (CYT ASW) and low nutrient (LN ASW) media were made with artificial seawater (ASW) Instant Ocean[®] (30 g L⁻¹ in pure water). CYT ASW medium contained 1 g tryptone, 0.5 g yeast extract, 0.5 g CaCl₂·2H₂O, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, and 15 g agar in 1 L of ASW (Johansen *et al.*, 1999). Casein was replaced by tryptone because *C. lytica* does not degrade casein (Kientz *et al.*, 2012). LN ASW medium only contained agar (15 g) in 1 L of ASW (Jensen *et al.*, 1996). In the modified media LN Ye ASW and LN Tryp ASW, yeast extract and tryptone were added at 0.5 and 1 g L⁻¹, respectively, that is, at the same proportion as in CYT ASW medium.

NA NaCl, LB NaCl, and TSA NaCl media were supplemented with NaCl to reach a final concentration of 30 g L⁻¹. NA ASW, LB ASW, and TSA ASW media were prepared to determine seawater requirement and response to salinity stress. They were made as marine media with ASW Instant Ocean[®] (30 g L⁻¹ in pure water). In contrast, CYT ASW and LN ASW marine media were transformed into salted media LN NaCl and CYT NaCl by replacing the seasalts by 30 g L⁻¹ of NaCl.

Variation of the salinity was also tested with supplementation of final NaCl concentrations ranging from 30 to 70 g L⁻¹.

Culture conditions

The iridescent strain of *C. lytica* CECT 8139 (Kientz *et al.*, 2012) was grown aerobically in the dark. The common temperature of incubation was fixed at 25 °C. In control experiments, the bacterium was grown in jars under hypoxia or anoxia using campygen or anaerogen sachets (Oxoid[®]), respectively. Hypoxic and anoxic conditions were controlled using anaerobic indicator strips (Oxoid[®]).

Growth and iridescence evaluation

Iridescence was observed with the aid of a streaking procedure. One colony from a 24-h-old plate was subcultured in triplicate plates drawing thin 5-cm linear streaks. Cultures were photographed in a dark room using an experimental arrangement of oblique epi-illumination at a fixed illumination angle of 60 °C (Kientz *et al.*, 2012). The light source was a lamp (Kaiser RB 218N HF copy lighting unit) of 18 W, 5400 K, the operating voltage corresponds to AC 220–240 V, 50 Hz. The camera was a Nikon D1500 18-55 VR on Av program with f 22, the lens was a macro, large size (12.1 Mega pixels) used in superfine mode.

Colony density viewed by microscopy

Drop tests were used to normalize cell density. Cells were suspended in 1 mL of sterile ASW to reach a final OD (600 nm) of one unit. Serial dilutions were performed from 10⁻¹ to 10⁻⁸ with sterile ASW. Drops of 10 µL were then disposed on a MA plate and incubated 24 h at 25 °C.

Detailed observations were made under epi-illumination using the numeric Keyence Microscope VHX-1000E. A VHX-1100 camera was used with a VH-Z20R/Z20W objective lens with adjustable magnification of ×20 and ×100. To avoid specular reflections, the VH-S30 supporting mount of the camera was oriented at a 60° angle from the plate. With this process and particularly at high magnification, images were focused only on the central field. The DEPTH UP/3D tool corresponding to the D.F.D (Depth From Defocus) process was employed to focus on all optical fields and to improve image quality.

Results

Growth and iridescence kinetics of *C. lytica*

For analysis of *C. lytica*'s iridescence, MA was employed preferentially because the bacterium grew readily with multicolor iridescence on this rich medium. *Cellulophaga lytica*'s iridescence could be distinguished at early growth stages (Fig. 1a). Violet, red, and yellow were first observed. The dominant green iridescence with red edges appeared after 12 h of growth. At later stages of growth, the inner parts of the colonies contained few blue glitters and were losing the bright effect. Typical growth characteristics of *C. lytica* were observed. Both gliding motility and agarolysis were easily visualized after 36–72 h of growth. After 24 h of growth at 25 °C, *C. lytica*'s iridescence was conserved several days at 4 °C (Fig. 1b). Colonies exhibited larger red edges intensely iridescent.

Table 1. Growth and iridescence of *Cellulophaga lytica* on MA under various culture conditions

Incubation time	Incubation temperature									
	0 °C	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	50 °C
24 h										
Growth*	–	–	+	+	++	++	++	+	+	–
Iridescence [†]			++	++	+++	+++	++	+	–	
			V	V/R	G/R	G/R	G/R	G/R		
72 h										
Growth*	–	+	+	++	++	++	++	+	+	–
Iridescence [†]		++	+++	+++	++	+	+	–	–	
		V	R	G/R	G/R	G/R	G			

Incubation time	Oxygenation			Light exposure		
	Normoxia	Hypoxia	Anoxia	Dark	Light 24 h	Light/dark 12 h/12 h
24 h						
Growth*	++	+	–	++	++	++
Iridescence [†]	+++	++		+++	+++	+++
	G/R	R		G/R	G/R	G/R

*Apparent growth was quantified using the following symbols: –, none; +, moderate; ++, good.

[†]Iridescence and observed colors: –, none; +, low; ++, good; +++, bright. V, violet; R, red; G, green; G/R: middle green with red edges.

Table 2. Growth and iridescence of *Cellulophaga lytica* on various media and under hypersaline stress

A	Culture media												
	MA*	LN NaCl	LN ASW	LN Ye ASW	LN Tryp ASW	CYT NaCl	CYT ASW	NA NaCl	NA ASW	LB NaCl	LB ASW	TSA NaCl	TSA ASW
Growth [†]	++	–	++	++	++	+	++	+	++	–	+	+	++
Iridescence [‡]	+++		+++	+++	+++	+	+++	–	+		+	–	–
	G/R		G	G/R	G/R	G/R	G/R		R		R		

B	NaCl final concentration (after 24 h at 25 °C on MA)				
	30 g L ⁻¹	40 g L ⁻¹	50 g L ⁻¹	60 g L ⁻¹	70 g L ⁻¹
Growth [†]	++	++	+	+	–
Iridescence [‡]	+++	+++	++	+	
	G/R	G/R	R	R	

*With seawater.

[†]Apparent growth: –, none; +, moderate; ++, good.

[‡]Iridescence and observed colors: –, none; +, low; ++, good; +++, bright. V, violet; R, red; G, green; G/R, middle green with red edges.

Effects of gravity, O₂, light, and incubation temperature on growth and iridescence of *C. lytica*

By incubating the plates in different positions, we found that colonies' morphologies and iridescence were unaffected in response to changes in the direction of gravity (data not shown).

The three major environmental factors O₂, light, and temperature were tested. As shown in Table 1, *C. lytica*'s iridescence was not influenced by light exposure varia-

tion. *Cellulophaga lytica* was unable to grow under anoxia. Under oxygen limitations (hypoxia), the bacterium grew more slowly but iridescence was conserved.

As previously shown in the strain DSM 7489 (Pati *et al.*, 2011), the iridescent strain of *C. lytica* was able to grow from 5 °C (after 72 h) to 40 °C (Table 1). At 24 h of growth, the optimum temperatures for growth and iridescence intensity were 20 and 25 °C. Iridescence brightness was inhibited or lost at high incubation temperatures (35 and 40 °C). At 72 h of growth, iridescence was lowered at 25 and 30 °C. Interestingly, iridescence

was favored at low temperatures (5 and 10 °C) even if the bacterium grew more slowly. In these conditions, iridescent colors were modified (violet and red as dominant colors) likely due to reduced thicknesses of the colonies.

Iridescence and colony density

Using a drop test, we examined the relationships between color appearances and microbial density (Fig. 2). At low cell density (10^{-6} dilution), light blue was observed. The 10^{-5} dilution permitted to observe the violet iridescence stage before bright red. The 10^{-4} dilution led to red colonies with violet colors on edges. At higher cell densities (10^{-3} to 10^0), the central parts of the colonies became yellow and then green with violet and red at the edges. Pictures at high magnifications permitted to observe that all colors were conserved at the edges: blue then violet, red, yellow, and the main green iridescence. After 48 and 72 h of growth, gliding motility and the dominant bright green iridescence were observed. These data show that microbial density strongly influences iridescent colors of *C. lytica*.

Growth and iridescence of *C. lytica* on various media

No iridescence was observed on salted media such as CYT NaCl, NA NaCl, LB NaCl, and TSA NaCl (Table 2A, Fig. 3). *Cellulophaga lytica* did not grow on LN NaCl. Interestingly, the presence of seasalts in LN ASW permitted the growth and iridescence. On CYT ASW, LB ASW, and NA ASW media, iridescence was also induced. On NA ASW, iridescence was less intense in the inner parts and, on LB ASW, red colors were dominant. On TSA ASW, no iridescence was observed.

On LN ASW medium, only green iridescence was observed while on CYT ASW or MA media the usual green with red and violet edges were observed (Kientz *et al.*, 2012). One of the differences between CYT ASW and LN ASW media is the presence of tryptone and yeast extract in CYT ASW. The importance of these factors was tested by adding tryptone or yeast extract at the same proportion (0.5 or 1.0 g L $^{-1}$) as in CYT ASW medium. For those media (LN Ye ASW and LN Tryp ASW), iridescence profiles were similar to those observed on CYT ASW or MA. Gliding motility was visible for iridescent colonies after 72 h of growth.

Effects of hypersaline and hydric stresses

Cellulophaga lytica is potentially exposed to salinity variations and hypersaline conditions in its biotope. As shown in Table 2B, *C. lytica*'s iridescence was conserved even at

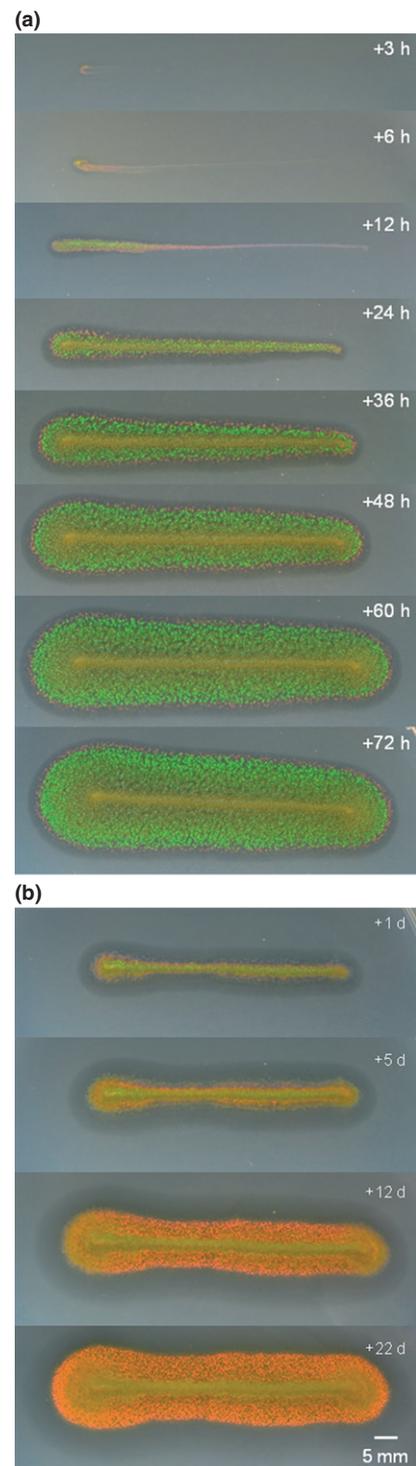


Fig. 1. Iridescence kinetics of *Cellulophaga lytica* at 25 °C and in cold storage. *Cellulophaga lytica* was grown on MA medium at (a) 25 °C and (b) 25 °C during 24 h followed by a period of storage at 4 °C for 1, 5, 12, and 22 days. Gliding motility can be identified as the spreading zone from the colony center. Agarolysis corresponds to the dark halo visible on colony edges. Pictures were taken under epi-illumination.

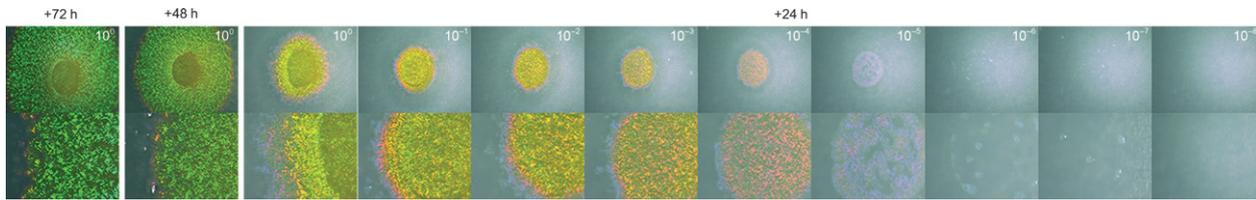


Fig. 2. Observation of *Cellulophaga lytica*'s iridescence at various cell densities (drop test). Colonies were observed using the Keyence microscope with 60° light incidence using a $\times 20$ objective lens (top line) and a $\times 100$ objective lens (bottom line).

high (sub-lethal) NaCl concentrations. As growth was inhibited under hypersaline conditions, red iridescence was more visible.

Changes in agar concentration potentially affect several physico-chemical parameters such as moisture, hydrostatic and osmotic pressures, and solidity of the surface. On soft agar plates (0.25–0.50%), colonies had a particular smooth aspect and no iridescence was observed (Fig. 4). However, after 72 h of growth on 0.5% agar plate, iridescence could be observed on the inner part of the colony. In this specific condition, a second phase of growth and gliding motility may occur on older cells used as a support. The optimum agar concentration was 1.5%. At concentration higher than 2.0%, growth was lowered and no iridescence was observed. These conditions were favorable for agarolysis but unfavorable for gliding motility.

Discussion

Natural or *in vitro* conditions that favor or inhibit the unique iridescence of *C. lytica* colonies are unknown. We thus examined the effect of key environmental factors to determine the possible conservation of the iridescence in the natural environment.

Cellulophaga lytica is a nonphotosynthetic bacterium which potentially encounters a plethora of light or dark conditions in its natural habitats (tidal flats, rocks, pelagic zones...). Accordingly, we found that *C. lytica*'s iridescence seems biologically uninfluenced by light exposure, even if light is physically essential for the phenomenon.

Drop tests permitted to follow colors' apparitions linked with population density level. Under growth-limited conditions (e.g. 24 h under hypoxia), low cell density colonies appeared red. A higher cell density was needed to generate bright green-dominant iridescence. However, iridescence could be lost in the inner parts of the colonies, may be owing to an altered physiology of the older cells or a too high cell density. As already described in higher organisms, changes in the color of iridescence are owing to modifications in structure dimensions. Such hypothesis is currently being investigated in *C. lytica* in our laboratory.

Interestingly, seawater was required for iridescence. The only presence of seasalts with agar (LN ASW medium) allowed both growth and iridescence. On rich NA ASW and LB ASW modified media, iridescence was not as bright as on marine MA or CYT ASW media. It is admitted that rich media are not recommended to cultivate marine bacteria. For example, high concentrations of peptone or yeast extract have been proved to depress growth of marine bacteria (Buck, 1974; Martin & MacLeod, 1984; Button *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1996). A low iridescence was observed on TSA ASW. In this medium, tryptone concentration is high (17 g L^{-1}) compared to CYT ASW (1 g L^{-1}) and NA ASW (3 g L^{-1} of peptone).

On LN ASW, a likely stressful medium containing only seawater and agar, transparent colonies with only green iridescence were observed. In this particular condition, a moderate supplementation with yeast extract (0.5 g L^{-1}) or tryptone (1 g L^{-1}) permitted to observe the common green/red profile of iridescence. All together, these data suggest that *C. lytica*'s iridescence can occur under many nutritional conditions providing that essential seawater components are present.

Iridescence in *C. lytica* colonies was conserved under cold stress. During storage at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, the change in iridescent colors was probably due to the psychrophilic growth of *C. lytica*. High temperature was not in favor of iridescence. Low temperatures are more common in the natural environment of *C. lytica* (Johansen *et al.*, 1999). *Cellulophaga lytica*'s iridescence was also conserved under NaCl stress (or hydric stress at high agar concentrations) even at sub-lethal concentrations. Hypersaline conditions are potentially encountered by the halotolerant bacterium *C. lytica* in its biotopes (Lewin & Lounsbury, 1969; Bowman, 2006; Pati *et al.*, 2011). Thus, conservation of iridescence under low temperatures, hypersalinity, and high osmolarity reinforces the idea that *C. lytica*'s iridescence might occur in environmental conditions.

Interestingly, iridescence could not be observed on too soft media. A minimal solidity of the support (agar-agar gel in this study) was required to probably keep the cells in a nonplanktonic state. The latter may be crucial for the establishment of the iridescent structures within the colonies. One iridescent strain of *C. lytica* (ACEM 21)

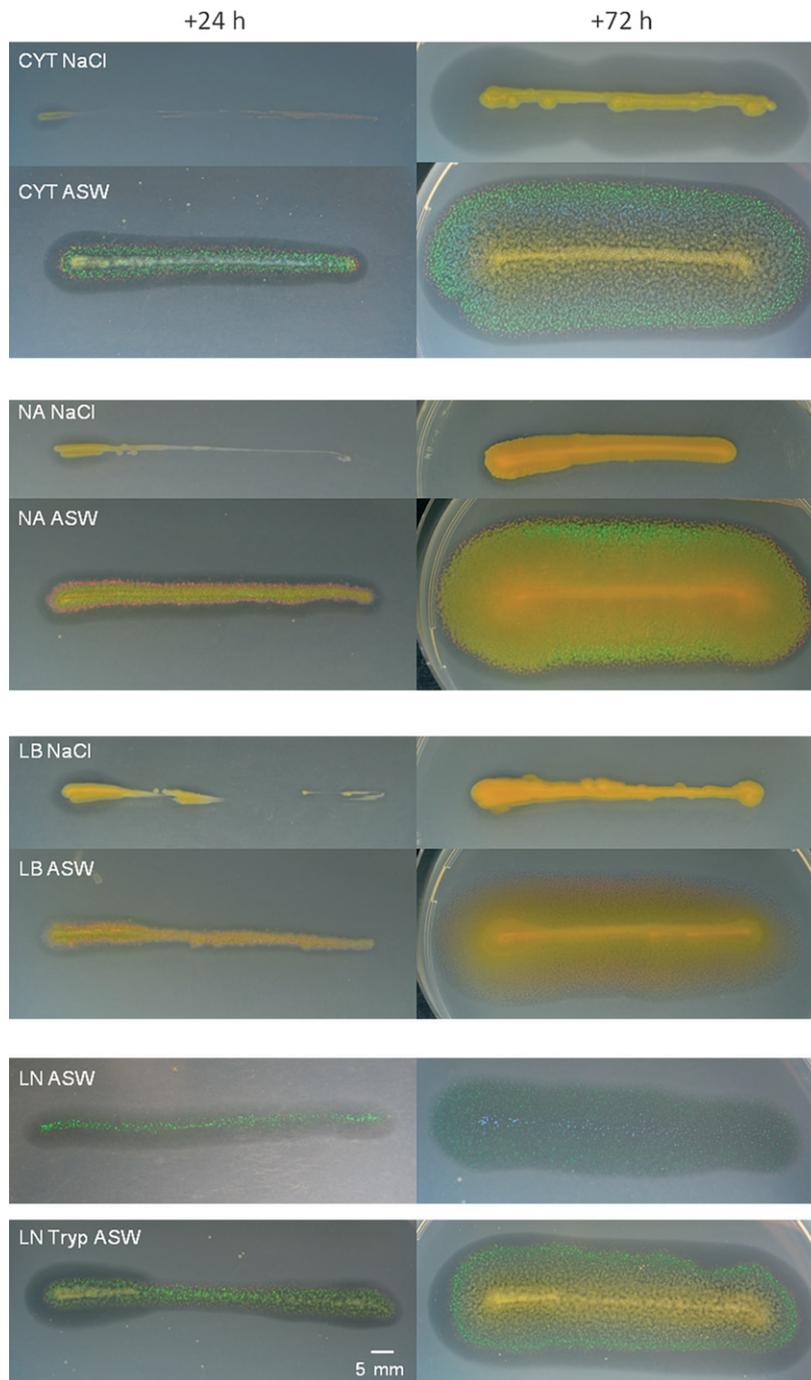


Fig. 3. Growth and iridescence of *Cellulophaga lytica* on various culture media. *Cellulophaga lytica* was grown during 24 h (left) or 72 h (right) on different culture media: CYT NaCl, CYT ASW, NA NaCl, Na ASW, LB NaCl, LB ASW, LN ASW, and LN ASW tryp. Gliding motility can be identified as the spreading zone from the colony center. Agarolysis corresponds to the dark halo visible on colony edges. Pictures were taken under epi-illumination.

was previously described for its algicide properties (Skerratt *et al.*, 2002). We can thus hypothesize that *C. lytica*'s iridescence might occur on the surface of some macroalgae (agar-like supports) or microalgal blooms. *Celluloph-*

aga lytica's iridescence was inhibited on too solid media (agar 2.5–3.0%). Minimal water availability was probably required for gliding motility and iridescence of *C. lytica*. Importantly, by compiling all the results (see Figs 1–4),

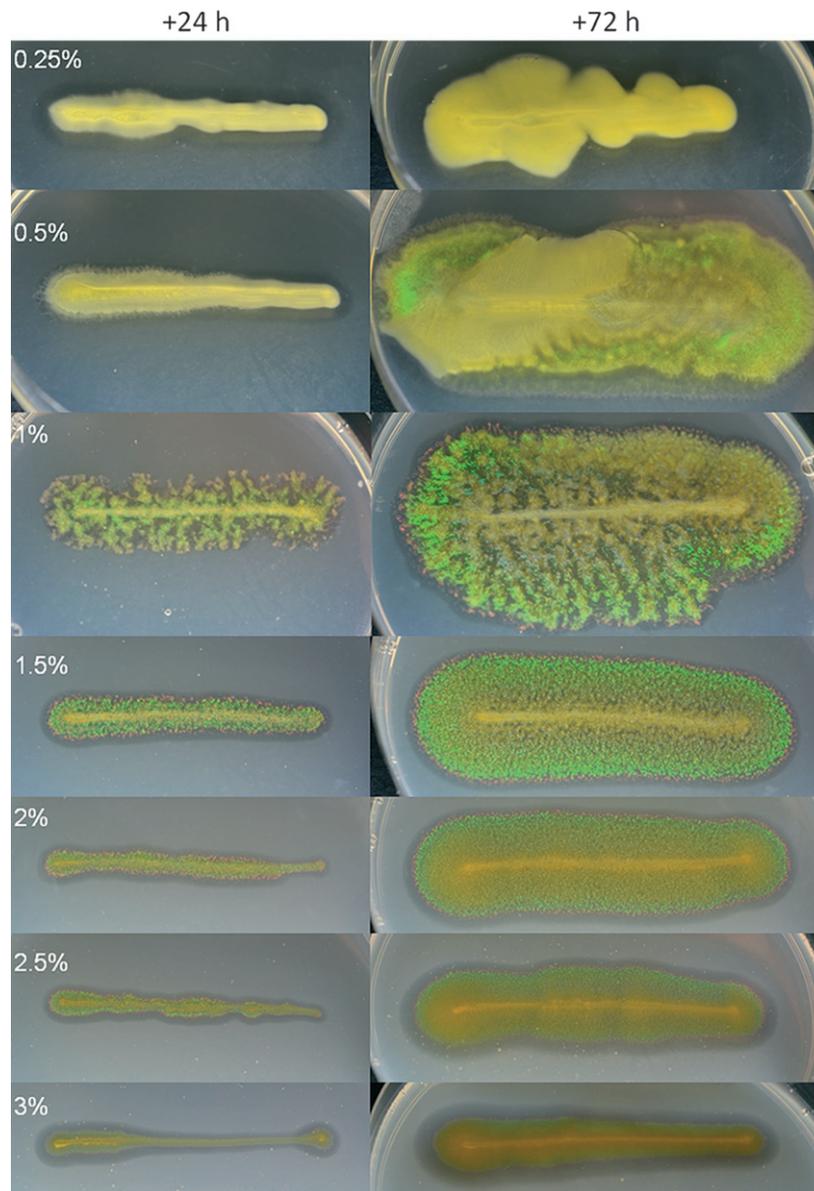


Fig. 4. Growth and iridescence of *Cellulophaga lytica* on MA medium at various agar concentrations. *Cellulophaga lytica* was grown during 24 h (left) or 72 h (right). Pictures were taken under epi-illumination.

we observed that the conditions that favor gliding motility also favor iridescence. Gliding motility, which locally involves driving forces much higher than gravity forces (Mignot *et al.*, 2007), may be therefore essential, in time and space, for the establishment of the iridescent structures. This hypothesis is currently being studied in our laboratory.

The iridescent bacterium has been isolated from rocky shore ecosystem where extreme conditions of salinity, temperature variation, desiccation, and light exposure select adapted organisms. It is possible that *C. lytica*'s structural color may provide an additional selective

advantage under these relatively extreme conditions. Higher marine organisms have already been reported as iridescent in a rocky shore ecosystem. For example, a member of the Rhodophyta was found to exhibit a structural color formed by a multilayered tissue which was supposed to prevent desiccation (Gerwick & Lang, 1977). One or more potential noncommunicative functions of structural color, that is, desiccation prevention, thermoregulation, UV protection, light filtering, water repellency, or friction reduction (Doucet & Meadows, 2009), might help *C. lytica* to adapt to a rocky shore ecosystem. Spectrophotometric profile of *C. lytica* colonies revealed

strong coherent scattering of UV and IR wavelengths in addition to colors in visible spectral range (Kientz *et al.*, 2012). This may indicate thermoregulatory and/or photo-protective roles. Further work is necessary to clarify this issue. An experimental approach is also currently under development to determine whether iridescence can be directly observed in the natural biotopes of *C. lytica*.

Acknowledgements

Betty Kientz was a Ph.D. student with a grant from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

References

- Bowman JP (2006) The marine clade of the family *Flavobacteriaceae*. *The Prokaryotes*, 3rd edn, Vol. 7 (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH & Stackebrandt E, eds), pp. 677–694. Springer, New York, NY.
- Buck JD (1974) Effects of medium composition on the recovery of bacteria from seawater. *J Exp Mar Biol Ecol* **15**: 25–34.
- Button DKF, Schut F, Quang P, Martin R & Robertson BR (1993) Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microbiol* **59**: 881–891.
- Doucet SM & Meadows MG (2009) Iridescence: a functional perspective. *J R Soc Interface* **6**(suppl 2): S115–S132.
- Doucet SM, Shawkey MD, Hill GE & Montgomerie R (2006) Iridescent plumage in satin bowerbirds: structure, mechanisms and nanostructural predictors of individual variation in colour. *J Exp Biol* **209**: 380–390.
- Fox DL (1976) *Animal Biochromes and Structural Colours: Physical, Chemical, Distributional & Physiological Features of Coloured Bodies in the Animal World*, 2nd edn. University of California Press, Berkeley, CA.
- Gerwick WH & Lang NJ (1977) Structural, chemical and ecological studies on iridescence in *Iridaea* (Rhodophyta). *J Phycol* **13**: 121–127.
- Ghiradella H (1991) Light and color on the wing: structural colors in butterflies and moths. *Appl Opt* **30**: 3492–3500.
- Greenewalt CH, Brandt W & Friel DD (1960) The iridescent colors of hummingbird feathers. *Proc Am Philos Soc* **104**: 249–253.
- Jensen PR, Kauffman CA & Fenical W (1996) High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Mar Biol* **126**: 1–7.
- Johansen JE, Nielsen P & Sjøholm C (1999) Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **49**: 1231–1240.
- Kientz B, Vukusic P, Luke S & Rosenfeld E (2012) Iridescence of a marine bacterium and classification of prokaryotic structural colors. *Appl Environ Microbiol* **78**: 2092–2099.
- Land M (1972) The physics and biology of animal reflectors. *Prog Biophys Mol Biol* **24**: 75–106.
- Lewin RA & Lounsbury DM (1969) Isolation, cultivation and characterization of Flexibacteria. *J Gen Microbiol* **58**: 145–170.
- Lythgoe JN & Shand J (1989) The structural basis for iridescent color changes in dermal and corneal iridophores in fish. *J Exp Biol* **141**: 313–325.
- Martin P & MacLeod RA (1984) Observations on the distinction between oligotrophic and eutrophic marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **47**: 1017–1022.
- Mignot T, Shaevitz JW, Hartzell PL & Zusman DR (2007) Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science* **315**: 853–856.
- Nogrady G & Guérault A (1964) Conditions favorisant l'iridescence bacterienne et l'observation du phénomène. *Rev Can Biol* **23**: 367–373.
- Noyes J, Sumper M & Vukusic P (2008) Light manipulation in a marine diatom. *J Mater Res* **23**: 3229–3232.
- Pati A, Abt B, Teshima H *et al.* (2011) Complete genome sequence of *Cellulophaga lytica* type strain (LIM-21T). *Stand Genomic Sci* **4**: 221–232.
- Pijper A (1923) Diffraction in biological structures. I. The structure of colonies of the coli-typhoid group. *S African Med Rec* **17**: 243–248.
- Prum RO & Torres R (2003) Structural coloration of avian skin: convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. *J Exp Biol* **206**: 2409–2429.
- Seago AE, Brady P, Vigneron J-P & Schultz TD (2009) Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural color mechanisms in beetles (Coleoptera). *J R Soc Interface* **6**(suppl 2): S165–S184.
- Skerratt JH, Bowman JP, Hallegraeff G, James S & Nichols PD (2002) Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Mar Ecol Prog Ser* **244**: 1–15.
- Vukusic P, Sambles JR, Lawrence CR & Wootton RJ (2001) Structural color: now you see it-now you don't. *Nature* **410**: 36.
- Vukusic P, Wootton RJ & Sambles JR (2004) Remarkable iridescence in the hindwings of the damselfly *Neurobasis chinensis chinensis* (Linnaeus) (Zygoptera: Calopterygidae). *Proc Biol Sci* **271**: 595–601.
- Welch V, Vigneron J-P, Lousse V & Parker A (2006) Optical properties of the iridescent organ of the comb-jellyfish *Beroë cucumis* (Ctenophora). *Phys Rev E* **73**: 0419161–0419167.
- Williams RC & Smith KM (1958) The polyhedral form of the Tipula iridescent virus. *Biochim Biophys Acta* **28**: 464–469.
- Zierdt CH (1971) Autolytic nature of iridescent lysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **37**: 319–337.

II. Analyses complémentaires de l'étude

II.1 Influence du Calcium et du Magnésium

Comme décrit dans l'article, les milieux salés n'induisent aucune iridescence, excepté pour le milieu CYT NaCl où celle-ci est de faible intensité. Ce milieu contient du tryptone, de l'extrait de levure et des sels de calcium et de magnésium ainsi que du NaCl, mais aucuns sels marins. Le Calcium et le Magnésium sont des minéraux majeurs dans le milieu marin. Puisque l'iridescence nécessite des sels marins, nous avons soupçonné que ces cations contribuaient à induire le phénomène. Leur influence est testée sur le milieu NA NaCl où aucune iridescence n'est visible. L'induction est réalisée en additionnant de manière individuelle ou combinée $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Ces éléments sont également substitués au milieu CYT NaCl. Les concentrations utilisées sont celles retrouvées dans le milieu CYT : $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Les résultats montrent une induction d'une iridescence rouge peu intense lors de l'ajout combiné des sels (Tableau 13, Figure 40). Lorsque ces éléments sont supprimés du milieu CYT NaCl, l'iridescence est inhibée et la croissance affectée. Il n'existe donc pas d'élément unique, essentiel à l'iridescence mais plutôt une combinaison de la présence de plusieurs sels.

Tableau 13. Modulation de l'iridescence de *C. lytica* CECT 8139 par le calcium et la magnésium.

	NA NaCl			CYT NaCl			
		+ Mg	+ Ca	+ Ca + Mg	- Mg	- Ca	- Ca - Mg
Croissance ¹	++	++	+	++	+	+	+
Iridescence ²	-	-		+	+	-	-
				R	V/R		

¹ la croissance est caractérisée par l'utilisation de ces symboles ; - : aucune, + : modérée, ++ : bonne.

² Iridescence et couleurs observées - : aucune, + : faible, ++ : moyenne, +++ : intense. R : rouge, V/R : verte au centre et rouge sur les bords

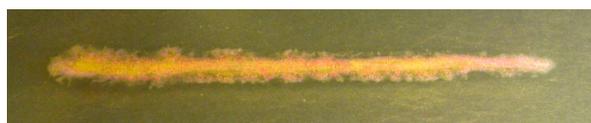


Figure 40. Colonie de *C. lytica* CECT 8139 sur le milieu NA NaCl + Ca + Mg.

II.2 Effet du dessèchement extrême de la gélose

Lorsque les colonies sont photographiées durant 24h sous illumination, nous avons observé une déshydratation excessive de la gélose conduisant à la cristallisation des sels du milieu. La croissance est réduite voire inhibée sur le milieu sec après plusieurs heures. De façon intéressante, l'iridescence est encore observée près des cristaux. Les colonies précédemment vertes iridescentes, deviennent bleues ou rouges, en passant par du violet très intense (Figure 41). Ces conditions, également observées lors des tests en goutte confirment le lien entre les variations de couleurs d'iridescence et une diminution de la densité microbienne et/ou de l'épaisseur de la colonie. Elle confirme également que l'iridescence peut être conservée en conditions de stress.

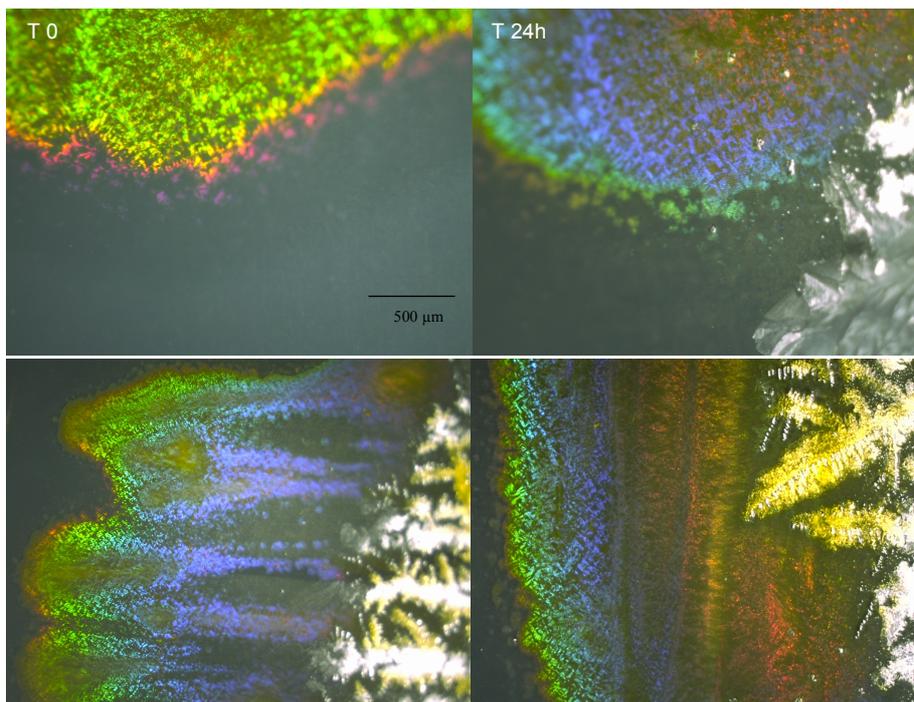


Figure 41. Variations des couleurs d'iridescence des colonies lors du dessèchement de la gélose (MA). Le bord de la colonie est observé à T0 et après 24h de culture sous une lumière provoquant une déshydratation de la gélose. Les clichés suivants sont des exemples supplémentaires des colorations près de la cristallisation.

III. Principaux résultats et discussion

Dans ce chapitre, les variations de couleurs ont été directement corrélées à une densité cellulaire. Les colonies sont transparentes puis, bleues, violettes et rouges pour des densités respectives de 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} . Une densité minimale est donc essentielle à la construction des structures iridescentes. Pour des densités supérieures, du jaune et finalement du vert sont observés. Après plusieurs heures de croissance, le centre de la colonie perd de son intensité. Cette perte d'iridescence peut refléter une désorganisation probable des structures iridescentes lorsque le biofilm est trop dense ou lorsque les cellules sont plus âgées voir mortes. Le dessèchement excessif de la gélose permet également de lier une couleur d'iridescence et une épaisseur de colonie.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la modulation de l'iridescence par des facteurs abiotiques. L'orientation de la boîte de culture n'a aucun effet sur l'iridescence. Les forces impliquées dans la mise en place des structures iridescentes semblent donc être supérieures à la force de gravité. Différentes expositions à lumière n'influent pas sur l'expression de l'iridescence, même si la lumière est indispensable à l'observation du phénomène. La solidité du milieu se révèle en revanche déterminante avec une concentration optimale en agar de 15 g.L^{-1} . Les géloses trop molles ne permettent pas d'obtenir une solidité adéquate pour la formation des structures. Dans cette condition, après 3 jours d'incubation, l'iridescence est observée sur la colonie dans une zone de croissance surnuméraire. Dans le cas des géloses dures, la croissance, l'iridescence et la motilité « gliding » sont affectées, ce qui peut être dû aux stress hydrique et salin combinés pouvant entrer en jeu pour ces concentrations élevées en agar.

C. lytica CECT 8139 est capable de se développer sur divers types de milieux salés, marins, riches ou pauvres. Les milieux salés inhibent l'iridescence. Une iridescence d'intensité faible a été induite à partir du milieu non iridescent, par l'ajout combiné de calcium et de magnésium. Divers composants de l'eau de mer entrent donc en jeu dans l'expression de l'iridescence. A partir du milieu pauvre LN (profil d'iridescence exclusivement vert), le profil commun d'iridescence vert/rouge est induit par l'addition de substrats carbonés (tryptone ou extrait de levure).

Des facteurs clés du biotope de *C. lytica* CECT 8139 ont été testés. Nous avons pu démontrer que la présence de sels marins est indispensable à l'expression du phénomène. Ce besoin en eau de mer est très intéressant car il correspond aux conditions environnementales de la souche. Les expérimentations de salinité révèlent une conservation de l'iridescence même pour des concentrations subléthales en NaCl. L'iridescence est, de plus, visible pour des températures basses. Les températures optimales d'iridescence (10°C - 20°C) sont inférieures à la température optimale de croissance (25°C) décrite dans la littérature. La conservation au froid (4°C) est également favorable à l'iridescence, celle-ci étant rouge probablement en raison d'une densité cellulaire réduite à cette température. La souche peut être conservée à 4°C plusieurs semaines tout en poursuivant sa croissance et son iridescence.

Ces données montrent une conservation de l'iridescence de *C. lytica* CECT 8139 dans des conditions stressantes de salinité et de température. Ces conditions étant rencontrées dans son biotope, nous pouvons supposer que l'iridescence « glitter-like » de la souche est exprimée *in situ*. De plus, l'iridescence est visible sur le milieu LN qui contient de l'eau de mer et de l'agar (un sucre complexe extrait de macroalgues). Ce milieu pourrait mimer en quelque sorte un mode de vie épiphyte. Afin de compléter ces données, la croissance et l'iridescence de *C. lytica* CECT 8139 pourraient être observées sur un milieu réalisé à partir d'extrait de macroalgues.

IV. Perspectives de l'étude

Les conditions de stress testées dans cette étude sélectionnent habituellement les organismes. L'expression de l'iridescence pourrait être corrélée avec des stratégies de survie dans les biotopes de *C. lytica* CECT 8139. Les colorations structurales sont répandues dans l'environnement marin et exprimées par divers types d'organismes : poissons (Lythgoe & Shand, 1989), crabes (Parker et al, 1998), cnidaires (Welch et al, 2006), céphalopodes (Mäthger et al, 2009), macroalgues (Gerwick & Lang, 1977 ; Pellegrini & Pellegrini, 1982 ; Craigie & Gordon, 1992), éponge (Aizenberg, 2004), vers marins (Trzeciak & Vukusic, 2009), mollusques (Tan et al, 2004) et diatomées (Furhmann et al, 2004 ; Gordon et al, 2009). Des rôles non-communicatifs associés à l'iridescence ont été décrits. Pour certaines macroalgues iridescentes, des fonctions de photoprotection, de protection contre la dessiccation, l'action des vagues ou la colonisation bactérienne (Dangeard, 1941 ; Gerwick & Lang, 1977) ont été avancées. Dans d'autres environnements, diverses fonctions de l'iridescence ont été révélées : photoprotection, thermoregulation, réduction des frictions, renforcement des tissus et propriétés antisalissures (Doucet & Meadows, 2009). Toutes ces fonctions seraient utiles à la survie sur des estrans rocheux.

Dans les deux chapitres suivants, nous souhaitons étudier la présence et la distribution de souches iridescentes « glitter-like ». Le Chapitre 3 explore les phénomènes d'iridescence au sein du phylum *Bacteroidetes* auquel appartient *C. lytica*. Dans le Chapitre 4, la recherche de souches marines iridescentes entreprend de préciser les niches écologiques associées au phénomène.

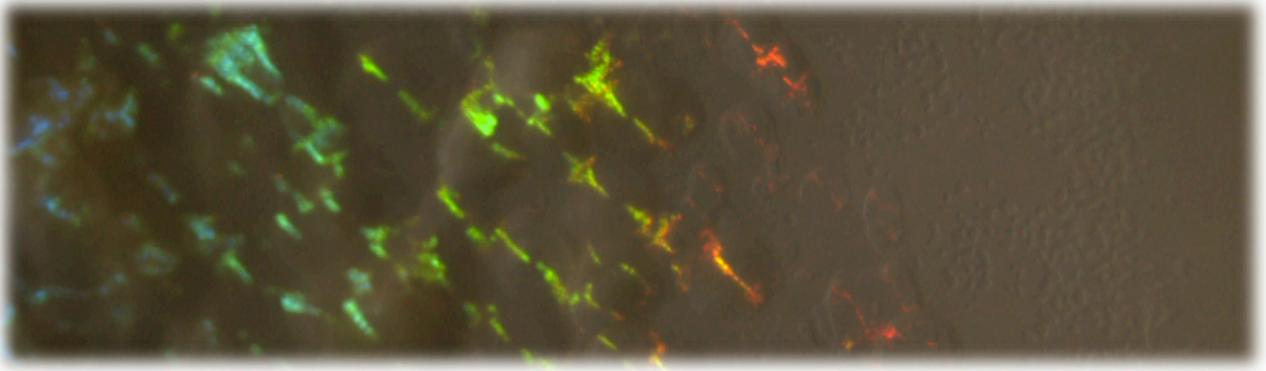
Les composés de l'eau de mer qui influent sur le phénomène pourraient être évalués lors d'une étude complémentaire. Un plan d'expérience serait à réaliser afin de préciser la contribution des différents facteurs. Des conditions biotiques seraient également intéressantes à expérimenter comme la compétition entre des souches iridescentes et non-iridescentes de la même espèce ou d'espèces différentes et également l'effet de molécules dont certaines sont potentiellement rencontrées par la bactérie dans l'environnement. Sur ce thème nous avons entrepris des essais préliminaires sur l'effet de certaines molécules de stress sur la croissance et l'iridescence de *C. lytica* CECT 8139 : KCN, H₂O₂, CCCP, 5 hydroxy-indole, etc. Ces tests sont à compléter par l'utilisation de gammes de concentrations étendues et ne sont donc pas détaillés dans ce mémoire. La souche montre une bonne résistance aux composés toxiques.

L'iridescence ne semble pas sous le contrôle d'autoinducteurs du *quorum sensing*. L'inhibition de l'iridescence en présence de 5 hydroxy-indole est l'un des résultats intéressants, cet effet étant indépendant de la croissance.

Dans cette étude, des conditions non iridescentes ont été obtenues, une croissance sur le milieu NA NaCl par exemple. Celles-ci se révèlent très utiles pour les futures analyses sur l'élucidation des structures iridescentes car elles serviront de contrôles (Chapitre 5). Nous avons également remarqué, dans les conditions non-iridescentes, que les colonies se déplacent peu sur la gélose alors qu'elles envahissent le milieu en conditions iridescentes. Le lien entre l'iridescence et la motilité « gliding » sera étudié dans le chapitre suivant.

Chapitre 3.

IRIDESCENCE DES *BACTEROIDETES* ET
LIEN AVEC LA MOTILITE « GLIDING »



I. Démarche scientifique

Les données des chapitres précédents suggèrent que le caractère iridescent « glitter-like » de *C. lytica* CECT 8139 pourrait être observé dans le biotope marin. Nous supposons alors que le phénomène est exprimé par d'autres souches de l'environnement. Comme pour la majorité des descriptions d'iridescence bactérienne dans la littérature, les mentions du phénomène chez les *Bacteroidetes* sont très ambiguës. Des termes sans définition précise tels « shine », « glistening » et « iridescent » sont mentionnés. Ces effets sont évoqués de façon générale pour toutes les *Cytophagales* (Lewin & Lounsbery, 1969 ; Reichenbach, 1989 ; 1992). De nombreuses *Bacteroidetes* ont subi des reclassifications, c'est le cas pour *Cellulophaga* [*Cytophaga*] *lytica*. Anciennement classée dans les *Cytophagales*, elle fut reclassée parmi les *Flavobacteriales* (Johansen et al, 1999). De ce fait, les mentions d'iridescence ont été importées dans ce nouvel ordre et sont évoquées de manière commune pour les membres des ordres *Cytophagales* et *Flavobacteriales* (Reichenbach, 1992 ; Bernadet, 2011).

Dans ce chapitre, des espèces d'origines diverses, toutes membres du phylum *Bacteroidetes* ont été comparées (Annexe 2, page 267). Dans un premier temps, nous avons voulu identifier les souches iridescentes « glitter-like » au sein de ce phylum, afin de clarifier les phénomènes décrits. Ces données nous permettront d'évaluer l'expression de ce phénomène par différentes souches. Un total de 22 souches a été comparé : 16 marines et 6 terrestres et ceci afin de répondre à deux objectifs. Le premier correspond à l'identification des origines communes aux souches iridescentes. Le deuxième objectif consiste à déterminer si des souches issues du milieu terrestre sont capables d'exprimer le phénomène sur des milieux sans sels marins. Des bactéries non décrites comme iridescentes ont été employées comme contrôles. Toutes les souches du genre *Cellulophaga* ont été incluses pour une analyse exhaustive de ce genre bactérien. Par ailleurs, différentes souches de l'espèce *C. lytica* ont été analysées car différents écotypes d'iridescence ont été observés dans le Chapitre 1.

Dans l'étude précédente, nous avons montré que le milieu de culture est déterminant pour l'observation de l'iridescence bactérienne. Les cultures ont donc été réalisées sur dix milieux différents, cinq marins et cinq terrestres. L'iridescence a été observée par une culture en strie et photographiée en épi-illumination. En complément des illustrations, nous avons caractérisé physiquement l'iridescence des souches par microspectrophotométrie.

Les données du Chapitre 2 montrent que *C. lytica* présente une motilité « gliding » rapide en condition d'iridescence. En revanche, aucune motilité n'est visible avec des colonies non-iridescentes. Nous avons souhaité approfondir ces données par l'analyse de la relation entre l'iridescence et la motilité « gliding » des souches. Ce mode de déplacement est commun à de nombreuses *Bacteroidetes* (Lapidus & Berg, 1982 ; Mc Bride, 2001 ; 2004). Les cellules glissent rapidement sur la gélose, les bords de colonie ont une allure « déchiquetée » qui reflète l'envahissement du substrat. Le lien entre iridescence et motilité « gliding » a donc été étudié par l'observation macroscopique des colonies de souches *Bacteroidetes*. Une cinétique a permis de visualiser la motilité de la colonie et sa vitesse de déplacement par l'utilisation d'une loupe binoculaire. Celle-ci contient un système de transillumination qui permet d'observer les déplacements mais qui, en revanche, n'est pas adapté à la visualisation de l'iridescence. Un éclairage en épi-illumination comprenant deux fibres optiques a du être ajouté au dispositif. La formation des paillettes a également été suivie à la loupe binoculaire en réduisant l'éclairage de transillumination avec la souche iridescente intense *C. lytica* DSM 2040. Des analyses microscopiques de la motilité cellulaire ont ensuite été réalisées dans des conditions iridescentes et non-iridescentes de *C. lytica* CECT 8139. Dans cette étude, un mutant spontané de *C. lytica* CECT 8139 faiblement iridescent et affecté dans sa motilité a été particulièrement examiné.

Les résultats de ces analyses ont été acceptés pour publication au journal *PLoS One* le 23 Novembre 2012.

Article 3.

**Glitter-like iridescence within the *Bacteroidetes*
especially *Cellulophaga spp.*: optical properties and
correlation with gliding motility**

Accepté le 23 Novembre 2012 dans le journal PLoS One

Glitter-like iridescence within the *Bacteroidetes* especially *Cellulophaga spp.*: optical properties and correlation with gliding motility

Betty Kientz^{1*}, Adrien Ducret², Stephen Luke³, Peter Vukusic³, Tâm Mignot² and Eric Rosenfeld^{1*}

¹UMR 7266 CNRS Littoral Environnement et Sociétés, University of La Rochelle, La Rochelle, France, ²UMR 7283 CNRS Laboratoire de Chimie Bactérienne, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, University of Aix-Marseille, Marseille, France, ³School of Physics, University of Exeter, Exeter, United Kingdom

* E-mail: eric.rosenfeld@univ-lr.fr.

Abstract

Iridescence results from structures that generate color. Iridescence of bacterial colonies has recently been described and illustrated. The glitter-like iridescence class, created especially for a few strains of *Cellulophaga lytica*, exhibits an intense iridescence under direct illumination. Such color appearance effects were previously associated with other bacteria from the *Bacteroidetes* phylum, but without clear elucidation and illustration. To this end, we compared various bacterial strains to which the iridescent trait was attributed. All *Cellulophaga* species and additional *Bacteroidetes* strains from marine and terrestrial environments were investigated. A selection of bacteria, mostly marine in origin, were found to be iridescent. Although a common pattern of reflected wavelengths was recorded for the species investigated, optical spectroscopy and physical measurements revealed a range of different glitter-like iridescence intensity and color profiles. Importantly, gliding motility was found to be a common feature of all iridescent colonies. Dynamic analyses of “glitter” formation at the edges of *C. lytica* colonies showed that iridescence was correlated with layer superposition. Both gliding motility, and unknown cell-to-cell communication processes, may be required for the establishment, in time and space, of the necessary periodic structures responsible for the iridescent appearance of *Bacteroidetes*.

Introduction

Iridescence is a property of structural color arising from the interaction of light with micron- and sub-micron-sized periodic structures. The intense colors created exhibit angle-dependent color changes [1], [2], [3]. This form of color-appearance is found in natural or artificial organic/inorganic objects (*e.g.* opals, soap bubbles, compact discs) and in living organisms. Iridescence has been well studied in higher organisms, particularly Insecta [4], [5], [6], Aves [7], [8], [9], and fishes [2], [10]. Iridescence is also encountered in viruses [11], in marine organisms [12] and diatoms [13]. In animals, both communicative (*e.g.* species and sex recognition, predation avoidance) and non-communicative roles (*e.g.* photoprotection, thermoregulation, water repellency, friction reduction) were attributed to iridescence [14].

Iridescence expressed by bacterial colonies has been a vague concept in the literature. Only a few authors have studied the structural colors of prokaryotes [15], [16], [17], [18], [19], [20]. Ambiguous terms have been used for describing diverse visual effects of colonies or concentrated cell suspensions, but often with imprecise definitions. Images were rarely published and consequently the development of understanding of the visual colors was challenging. The comparison of a wide range of bacteria in [21] presented direct evidence of at least four categories of bacterial structural color. A novel and intense glitter-like iridescence class was created especially for a few strains of the marine bacterium *Cellulophaga lytica*. Glitter-like iridescence observed macroscopically under oblique direct illumination arose from bright millimeter- and sub-millimeter-sized centers of color distributed across the colony. The dominant glitter-like colors were observed to be green at the colonies' centers and were red and blue-violet at the colonies' peripheral edges. Importantly, and for the first time, the structural origin of the bacterial color appearance was verified by spectrophotometric data showing the reflected wavelengths under a broad range of light incidence angles. Several strains of *C. lytica* were compared and, interestingly, the intensity levels of iridescence were strongly different within the species.

The “iridescence” or “metallic tinge” of *C. lytica* colonies were mentioned only superficially in previous studies [22], [23]. Vague terms have been employed such as “greenish metallic iridescence” for the *Cellulophaga* genus [24] and “glistening”, “shine” or “shiny” for the

Bacterioidetes [25]. These vague descriptions did not yield conclusions about the origin and nature of the observed colored appearances. Moreover, for some sample strains, relevant information relating to appearance was sometimes lost. For example, *Flavobacterium* [*Cytophaga*] *johnsoniae* and “*Sporocytophaga cauliformis*” were described as “greenish iridescent” [26] but without mention of the phenomenon in a more recent edition [24].

It was recently shown in *C. lytica* CECT 8139 that culture conditions can be the determining factor for the onset of iridescent appearance [27]. Thus, iridescent traits of many strains may have been overlooked due to non-optimal or inappropriate culture media conditions. In *Cellulophaga* spp. and other *Flavobacteriales* and *Cytophagales*, a close inspection of the optical properties may help to clarify the microbiology and ecology of iridescence.

In this study, we thoroughly examined the iridescence phenomena within all *Cellulophaga* species, and some closely related species from the *Bacterioidetes* phylum, on various culture media. Several *C. lytica* strains were included in order to evaluate the phenomenon within the species. *Bacterioidetes* strains described in previous studies as “green iridescent”, “iridescent”, “shiny” or “glistening” were selected to elucidate the color appearance effects. Illustrations of colonies are presented at the macroscopic and microscopic levels together with additional spectrophotometric data to describe the various intensities and iridescence profiles. Special attention was paid to the potential link between iridescence and gliding motility.

Materials and methods

Bacterial strains

Strains are listed in Table 1 with recommended culture conditions and information on previous descriptions of their iridescence. “Reddish-greenish iridescence” and “metallic tinge” have been mentioned for *Cellulophaga* sp. [22], [26], so all strains belonging to this genus were included. Four *C. lytica* strains were incorporated in the study, including the genome-sequenced strain Lim 21^T also registered as DSM 7489 and CIP 103822 [28]. The non-iridescent mutant of *C. lytica* CECT 8139 was obtained by spontaneous mutagenesis after cell-suspension dilution and following culture growth on MA.

Culture conditions

Most of the culture media employed in this study comprised recommended media by strains catalogue DSMZ, CIP and BCCM/LMG (Table 1). For each strain, the culture media tested and the growth temperatures are listed in Table 2. Bacteria from the *Bacteroidetes* phylum have marine, freshwater or soil origins, thus both marine media (i) and terrestrial media (ii) were prepared.

(i) Marine media comprised ready-to-use Marine agar (MA) medium from Dutscher (Laboratorios Conda, S.A. Pronadisa®) and salted Nutrient agar (sNA) (Dutscher) with a supplement of NaCl 25 g L⁻¹. Prepared media were made with artificial seawater (ASW) Instant Ocean® (30 g L⁻¹). Cytophaga agar (CYT) contained 1 g tryptone, 0.5 g yeast extract, 0.5 g CaCl₂.2 H₂O, 0.5 g MgSO₄.7 H₂O, and 15 g agar in 1 L of ASW [22], [29], [30]. This medium was adapted with casein replaced by tryptone because *C. lytica* does not degrade casein. Low nutrient medium (LN) contained 15 g of agar in 1 L of ASW [31]. Recommended for *Zobellia uliginosa*, Seawater yeast peptone agar (SY) contained 5 g peptone, 3 g yeast extract, 12 g agar, 250 ml distilled water and 750 ml ASW.

(ii) Terrestrial media comprised ready-to-use Trypticase soy agar (TSA) and Nutrient agar (NA) (Dutsher). CY-agar (CY) was prepared by adding 3 g casitone, 1.36 g CaCl₂.2H₂O, 1 g yeast extract and 15 g of agar in 1 L of distilled water [26]. Recommended for *Flavobacterium flevensis*, C/10 contained 3 g casitone, 1.36 g CaCl₂.2H₂O and 15 g of agar in 1 L of distilled water [32]. *Flavobacterium aquatile* medium (Flav) was prepared by adding 2 g Na-caseinate, 0.5 g yeast extract, 1 g proteose peptone, 0.5 g K₂HPO₄ and 15 g of agar in 1 L of distilled water [33], [34].

Species	Strains	Origin	Country	Reference	Culture Medium	T°C	Mention of iridescence Description	Reference
Bacteria with glitter-like iridescence								
<i>Cellulophaga lytica</i>	CECT 8139	Surface of an anemone <i>Actinia equine</i>	Oléron island, France	[21]	MA	20°C	Glitter-like	[21]
	DSM 2040	Seawater aquarium	La Jolla, USA	[30]	CYT	20°C	Glitter-like	[21]
	DSM 7489 ^{1(s)}	Beach mud from limon	Costa Rica				Reddish-greenish iridescence	[26] [#]
	CIP 103822 ^{1(s)}						Greenish metallic iridescence	[24] [#]
	CIP 103822 ^{1(s)}						Metallic tinge	[22]
Bacteria with suspicion of glitter-like iridescence								
<i>Promyobacterium flavum</i>	DSM 3577	Rhizosphere of tomato plant	Russia	[43]	NA	25°C	Greenish iridescent	[26] [#]
<i>Flavobacterium [Cytophaga] succinicans</i>	DSM 4002	Eroded fin of a fingerling chinook salmon	USA	[26] [#]	CY	25°C	Greenish iridescent	[26] [#]
<i>Sporocytophaga cauliformis</i>	DSM 3657	Water	Lake Bodensee, Germany	[26] [#]	CY	20°C	Greenish iridescent	[26] [#]
<i>Flavobacterium [Cytophaga] johnsoniae</i>	DSM 2064 ^(s)	ND	ND	[44]	CY	30°C	Almost greenish iridescent	[26] [#]
<i>Flavobacterium [Cytophaga] fievensis</i>	DSM 1076	Freshwater lake	The Netherlands	[32]	C/10	20°C	Iridescent	[26] [#]
Bacteria with suspicion of iridescence								
<i>Cellulophaga baltica</i>	CIP 106307	Surface of brown alga <i>Fucus serratus</i>	Baltic Sea, Denmark	[22]	MA	25°C	Metallic tinge	[22]
<i>Cellulophaga fucicola</i>	CIP 106308	Surface of brown alga <i>Fucus serratus</i>	Kattegat sea, Denmark	[22]	MA	25°C	Metallic tinge	[22]
<i>Cellulophaga pacifica</i>	LMG 21938	Seawater	Gulf Peter, Japan	[45]	MA	28°C	Shiny	[45]
<i>Psychroflexus [Flavobacterium] gondwanensis</i>	DSM 5423	Organic lake	Antarctica	[46]	MA	28°C	Shiny	[26] [#]
<i>Flavobacterium aquatile</i>	DSM 1132 ^(s)	Deep well	Kent, England	[33]	Flavo	30°C	Glistening	[26] [#]
<i>Maribacter dokdonensis</i>	DSM 17201	Seawater	South Korea	[47]	MA	28°C	Glistening	[48]
Bacteria with no description of iridescence								
<i>Cellulophaga algicola</i>	DSM 14237 ^(s)	Diatom <i>Melosira</i> and macrophyta	Eastern Antarctic coast	[49]	MA	10°C	-	-
<i>Cellulophaga tyrosinoxydans</i>	DSM 21164	Seawater	Korea	[50]	MA	28°C	-	-
<i>Cellulophaga geojensis</i>	CCUG 60801	Marine sand	Geoje island, Korea	[51]	MA	25°C	-	-
<i>Leeuwenhoeikiella [Cytophaga] marinoflava</i>	DSM 3653	Seawater	Scotland	[26] [#]	CYT	20°C	-	-
<i>Flavobacterium degerlachei</i>	DSM 15718	Microbial mat	Antarctica	[52]	R2A	20°C	-	-

¹ The strain DSM 7489 was also registered as Lim-21 and CIP 103822 [28].

^(s) Genome sequenced strains.

[#] These references correspond to editions of the "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" or "The Prokaryotes".

ND: not detailed

Imaging colonies' iridescence appearance

The iridescence appearance of colonies was observed with the aid of a streaking procedure [21]. One colony from a 24 h-old plate was subcultured on a new plate drawing a 5 cm-linear streak in triplicate. Cultures were photographed after 24 h of growth in a dark room using an experimental arrangement of oblique epi-illumination at a fixed illumination angle of 60°. The light source was a lamp (Kaiser RB 218 N HF copy lighting unit) of 18 W, 5400 K, the operating voltage correspond to AC 220-240 V, 50 Hz with an operating frequency of 40 kHz. The camera was a Nikon D1500 18-55 VR on Av program with f 22 (12.1 Mega pixels). The lens was a macro, large-size used in superfin mode.

Gliding motility

Gliding motility was observed using timelapse microscopy. Pictures of colony edges were taken using an Olympus SZ61 stereomicroscope every 1 min for 20 min. The plates were observed under transverse illumination using a SCOTT KL 1500-halogen light source (150 W). For closest observations, colony edges were also observed in phase-contrast using an automated and inverted epi-fluorescence microscope TE2000-E-PFS (Nikon, France). The microscope was equipped with "The Perfect Focus System" that automatically maintains focus on a point of interest. Images were recorded with a CoolSNAP HQ 2 (Roper Scientific, Roper Scientific SARL, France) and a 40x/0.75 DLL "Plan-Apochromat" or a 100x/1.4 DLL objective. Due to the short working distances of 100x or 40x objectives, a 1 cm sided cube of colony growing on agar was cut and inverted on a coverslip.

Physical measurement of glitter-like iridescence (microspectrophotometry).

The diverse intensity and iridescence profiles of glitter-like iridescence were measured by microspectrophotometry [35]. Selected bacterial strains were included so that their various color-appearance effects could be evaluated. Samples were epi-illuminated and reflected light was collected from the same side of the sample. The angle of illumination and of detection could be separately set and controlled to a resolution of 0.5°. The illumination plane and the detection plane were offset from each other by 3° to enable unobstructed detection over the full collection angle range. Illumination was directed onto the sample through an Ocean Optics UV-Vis-NIR optical fiber that was connected to an Ocean Optics HPX-2000 light source, spanning approximately 300 nm to 850 nm. The reflected light was collected using a similar optical fiber that was connected to an Ocean Optics USB 4000-UV-VIS spectrometer.

For a series of chosen fixed-incidence illumination angles, the collection fiber was stepped in 5° angle steps in an arc over the sample, and reflection spectra were recorded at each position. In this way, the dependence of reflected color with angle, and hence the extent of each sample's iridescence, could be measured and assessed.

Results

Iridescence within the Bacteroidetes phylum

In relation to previous descriptions of optical effects (Table 1), the glitter-like iridescence of several *Bacteroidetes* strains was investigated on several culture media (Table 2). The best media for iridescence observation were CYT and CY respectively for marine and terrestrial strains. The sNA and TSA-rich media did not appear to give rise to discernable iridescence. The brightness of the iridescence and the observed colors previously reported as having an “iridescent profile” were different within the species (Table 2, Figure 1). However, the glitter-like iridescence that was defined as being green with red edges was common to most iridescent *Bacteroidetes*. Red or yellow iridescence was also observed in a few species. A green iridescence profile was typical of most transparent colonies growing on LN medium. *C. baltica* exhibited a red iridescence after 24 h of growth but could acquire the green and red iridescence after 48 h / 72 h (data not shown). Except for *C. algicola* and *C. lytica* CIP 103822, all *Cellulophaga spp.* were iridescent (Figure 1 A, B).

Three terrestrial strains were iridescent. *F. johnsoniae* had moderate iridescence intensity which was higher than the other strains, *S. cauliformis* and *F. succinicans* (Figure 1 D).

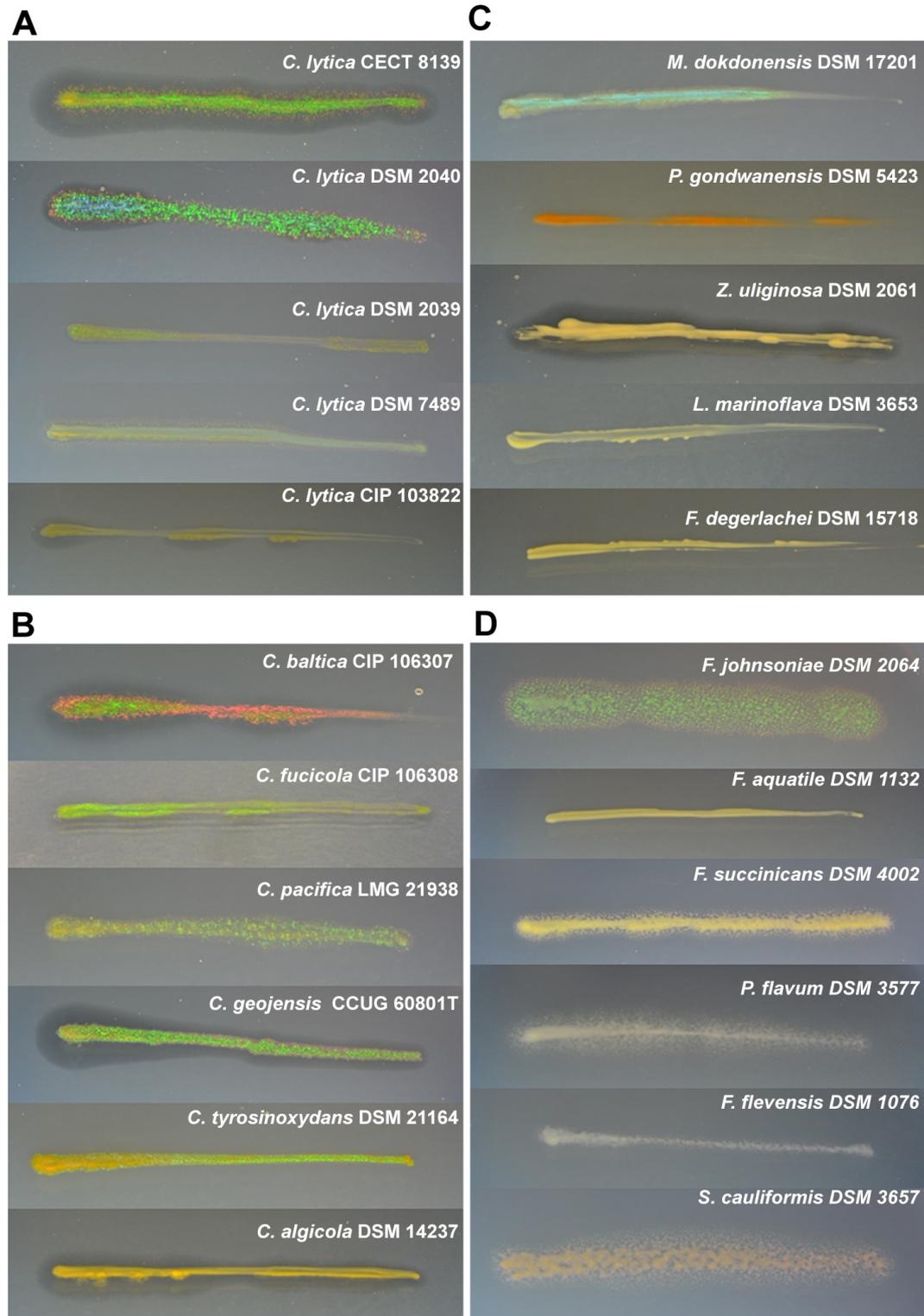


Figure 1. Iridescence colors of *Bacteroidetes*. Iridescence was observed after 24 h of growth (or 48 h for *Z. uliginosa* and *P. gondwanensis*) on CYT medium (A, B, C), for marine strains, or CY medium (D) for terrestrial strains.

Table 2. Iridescence phenomenon of strains belonging to the *Bacteroidetes* phylum

Strain	Code	Media										T°C
		MA		SYP		CYT		LN		sNA		
		Growth ¹	Iridescence ²	Growth	Iridescence	Growth	Iridescence	Growth	Iridescence	Growth	Iridescence	
Marine strains												
<i>Maribacter dokdonensis</i> **	DSM 17201	++	+ G	++	+ G	++	+++ G	++	+ G	+	-	28°C
<i>Cellulophaga lytica</i> *	CECT 8139	++	+++ G/R	++	++ G/R	++	++ G/R	++	++ G	+	-	25°C
	DSM 2040	++	+++ G/R	++	++ G/R	++	+++ G/R	++	+++ G	+	-	
	DSM 7489 ¹	++	+ G/R	++	+ G/R	++	+ G/R	++	+ G	+	-	
	DSM 2039	++	-	++	-	++	++ Y	++	++ G	+	-	
	CIP 103822	++	-	++	-	++	-	++	-	+	-	
<i>Cellulophaga baltica</i> *	CIP 106307	++	+ R	++	+ R	++	+++ R	++	+ R	+	-	
<i>Cellulophaga fucicola</i> *	CIP 106308	++	+ G/R	++	+ G/R	++	++ G/R	++	+ G	+	-	
<i>Cellulophaga pacifica</i> **	LMG 21938	++	+ G/R	++	+ G/R	++	++ G/R	++	-	+	-	
<i>Cellulophaga geojensis</i>	CCUG 60801 ¹	++	+ G/R	++	+ G/R	++	++ G/R	++	++ G	+	-	
<i>Cellulophaga tyrosinoxydans</i>	DSM 21164	++	-	++	-	++	++ G	++	+ G	+	-	
<i>Cellulophaga algicola</i>	DSM 14237 ¹	+	-	++	-	++	-	+	-	-	-	
<i>Psychroflexus gondwanensis</i> **	DSM 5423	++	-	++	-	+	-	+	-	+	-	
<i>Zobellia uliginosa</i>	DSM 2061	++	-	++	-	+	-	+	-	+	-	
<i>Leeuwenhoekiella marinoflava</i>	DSM 3653	++	-	++	-	+	-	+	-	+	-	20°C
<i>Flavobacterium degerlachei</i>	DSM 15718	++	-	++	-	+	-	+	-	+	-	
Terrestrial strains												
		CY		Flavo		C/10		TSA		NA		
<i>Flavobacterium johnsoniae</i> *	DSM 2064	++	++ G/R	++	+ G/R	++	++ G/R	++	-	++	+ G/R	30°C
<i>Flavobacterium aquatile</i> **	DSM 1132	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	
<i>Flavobacterium succinicans</i> *	DSM 4002	++	+ R	++	-	++	-	++	-	++	-	25°C
<i>Promyobacterium flavum</i> *	DSM 3577	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	
<i>Flavobacterium flevensis</i> *	DSM 1076	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	20°C
<i>Sporocytophaga cauliformis</i> *	DSM 3657	++	+ R	++	-	++	+ R	++	-	++	+ R	

* Strains previously described with "metallic tinge" or "greenish" appearances

** Strains previously described with "glistening" or "shiny" appearances

¹ Apparent growth: -, none; +, moderate; ++, good; +++, intense.

² Iridescence and observed colors: -, none; +, low; ++, good; +++, bright. R, red; Y, Yellow; G, Green; G/R, middle green with red edges.

Spectrophotometric profiles of glitter-like iridescences

Optical reflection associated with different glitter-like iridescent profiles observed macroscopically was quantified using microspectrophotometry (Figure 2). The data shows optical reflection bands that unequivocally represent iridescence, and therefore structurally-generated color, of bacterial colonies on account of the change in their reflected wavelengths with angle. A common form of spectral map (presenting sample intensity vs wavelength vs detection angle) was typical to the iridescence profiles of all structurally colored samples. Main reflected wavelengths (700 nm, 530 nm, 380 nm, and 310 nm) are represented by the areas with higher intensity in coloring, visible for example on *C. lytica* DSM 2040 (Figure 2 A). A higher intensity of green-red (G/R) iridescence results in narrower band of reflected wavelengths (Figure 2 A).

The main scattering peaks were conserved for the different color profiles but with a displacement within the spectra (Figure 2 B). For the green profile of LN-grown colonies, the main peak was at lower wavelengths, *i.e.* at 500 nm instead of 530 nm for the G/R profile (Figure 2 B). Higher wavelengths at 600 nm and 635 nm were obtained for yellow and red

iridescent profiles, respectively. A fifth peak at 380 nm was discerned for the red iridescent *C. baltica* (Figure 2 B). Under non-iridescent conditions with *C. lytica* CIP 103822 on CYT medium and *C. lytica* CECT 8139 on sNA, no reflection peaks were observed. The background of reflected colors was due to pigmentation and the agar medium (Figure 2 C).

Correlation between gliding motility and iridescence

Gliding bacteria move individually or in swarms, resulting in the formation of typical colonies that have thin spreading edges [36]. Gliding motility might be required for the establishment of periodic structures within the iridescent colonies. In order to test this hypothesis, we attempted to isolate a mutant of *C. lytica* CECT 8139 impaired in gliding motility. A spontaneous gliding-negative mutant was obtained. Interestingly, this mutant is almost non-iridescent, harboring only a residual iridescence when the colony edges were observed microscopically (Figure 3 A). A strong link between gliding motility and wild-type iridescence may thus exist. To reinforce this hypothesis, a rigorous microscopic inspection of colony edges was performed in the *Bacteroidetes* strains (Figure 3 B, C). Since iridescence and colony edges were not in the same focal plane, the optical effects were hard to observe in this test. All iridescent colonies exhibited spreading edges, a hallmark of gliding bacteria. Interestingly, these typical edges were absent in colonies that appeared non-iridescent at the macroscopic level (*e.g.* *C. algicola* and *C. lytica* CIP 103822). However, typical edges of gliding bacteria were found in some non-iridescent strains, in particular for terrestrial bacteria. Moreover, no correlation was found between the intensity of iridescence and the gliding rates for the tested strains (Table 3).

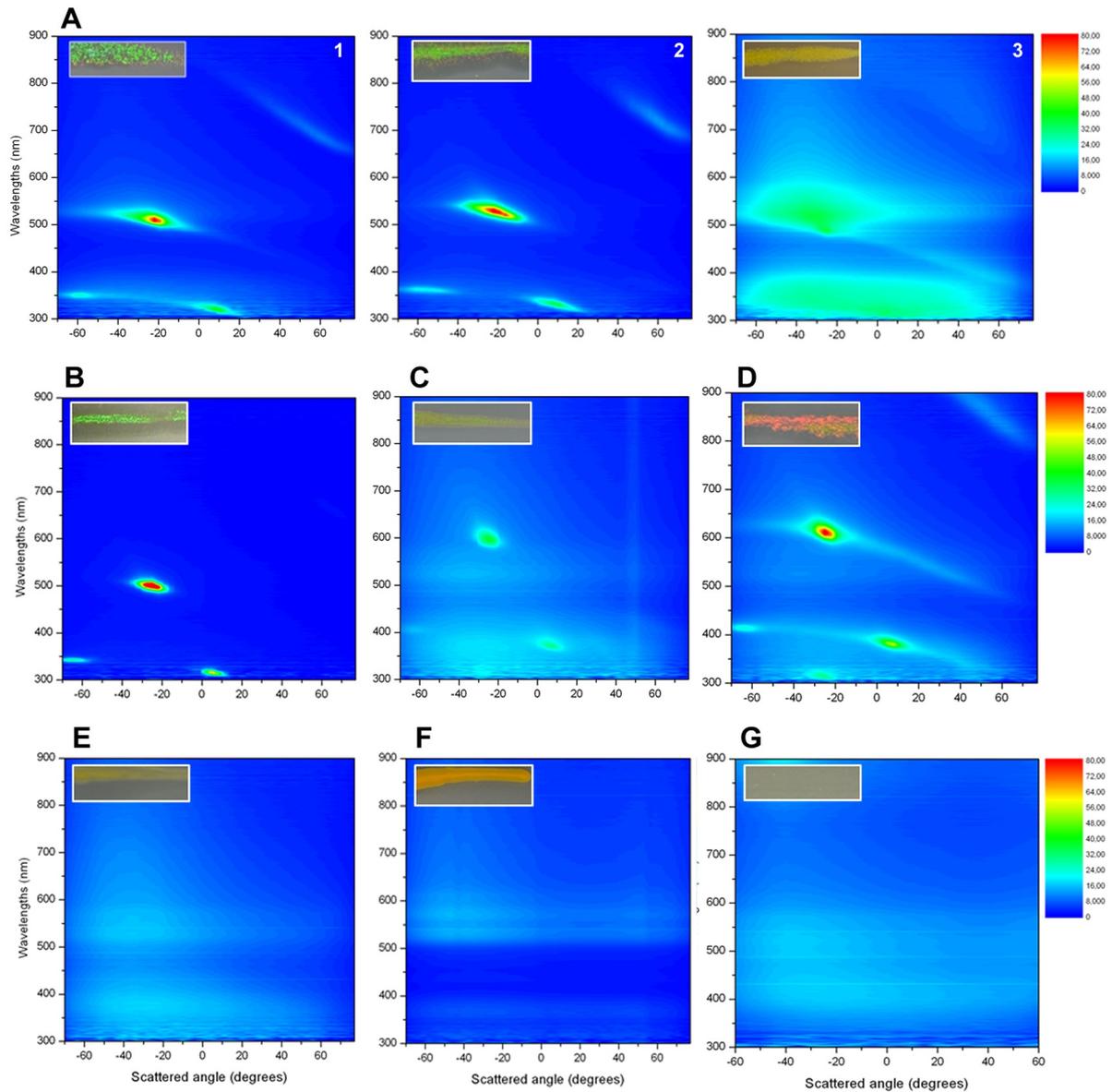


Figure 2. Spectral properties of the different glitter-like iridescence profiles. The color maps show the angle-dependent spectral reflectance of *Cellulophaga spp.* colonies grown 24 h on different media. Samples were illuminated at a fixed light angle of -70° . Scattered wavelengths from 300 nm to 850 nm were recorded at different detection angles from -65° to 70° with 5° angle step resolution. Results are shown using a color intensity scale.

As shown in the small inserts (upper left in each color map), iridescence profiles correspond to: (A) green and red iridescence profile with high intensity from *C. lytica* DSM 2040, moderate intensity from *C. lytica* CECT 8139, and low intensity from *C. lytica* DSM 7489; (B) other color profiles with green profile from *C. lytica* DSM 2040 on LN, yellow profile from *C. lytica* DSM 2039 and red iridescence profile from *C. baltica* CIP 106307; (C) non-iridescent controls with *C. lytica* CIP 103822, *C. lytica* CECT 8139 on sNA and the CYT agar control.

Wavelength values: UV, <400 nm; violet, 400 to 435 nm; blue, 435 to 490 nm; cyan, 490 to 520 nm; green, 520 to 560 nm; yellow, 560 to 590 nm; orange, 590 to 620 nm; red, 620 to 700 nm; and infrared, >700 nm.

Table 3. Gliding motility and iridescence on CYT or CY media

Species	Strains	Iridescence ¹	Gliding motility	
			Typical edges ²	Rate ³
Marine strains (CYT medium)				
<i>Cellulophaga lytica</i>	CECT 8139	++	++	Fast
	CECT 8139 mutant	~	-	
	DSM 2040	+++	++	Fast
	DSM 7489 [†]	+	+	Moderate
	DSM 2039	++	+	Slow
	CIP 103822	-	-	
<i>Cellulophaga baltica</i>	CIP 106307	++	++	Slow
<i>Cellulophaga fucicola</i>	CIP 106308	++	++	Moderate
<i>Cellulophaga pacifica</i>	LMG 21938	++	++	Moderate
<i>Cellulophaga geojensis</i>	CCUG 60801 [†]	++	++	Slow
<i>Cellulophaga tyrosinoxydans</i>	DSM 21164	++	+	Slow
<i>Cellulophaga algicola</i>	DSM 14237 [†]	-	-	
<i>Psychroflexus gondwanensis</i>	DSM 5423	-	-	
<i>Zobellia uliginosa</i>	DSM 2061	-	+	Moderate
<i>Leeuwenhoekella marinoflava</i>	DSM 3653	-	-	
<i>Flavobacterium degerlachei</i>	DSM 15718	-	-	
<i>Maribacter dokdonensis</i>	DSM 17201	++	++	Slow
Terrestrial strains (CY medium)				
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	DSM 2064	++	++	Moderate
<i>Flavobacterium aquatile</i>	DSM 1132	-	-	
<i>Flavobacterium succinicans</i>	DSM 4002	+	++	Slow
<i>Promyobacterium flavum</i>	DSM 3577	-	++	Moderate
<i>Flavobacterium flevensis</i>	DSM 1076	-	++	Slow
<i>Sporocytophaga cauliformis</i>	DSM 3657	+	++	Fast

¹ Iridescence intensity: -, none; ~, microscopically observed; +, low; ++, good; +++, intense.

² Typical gliding edges: -, none; +, moderate; ++, wide.

³ Gliding motility rates were qualified visually: Fast, spreading movements on the agar with visible distance covered after only 20 min; Moderate, spreading movements at a lower extend; Slow, few movements within the colony with short distance covered.

Colony edges of *C. lytica* strains were also observed at higher magnification (Figure 4). *C. lytica* CECT 8139 moved as single cells and within coordinated groups. The mutant of *C. lytica* CECT 8139 displaying only a reduced iridescence at the colony edges still formed tiers but lacked gliding cells. Moreover, when *C. lytica* CIP 103822 and *C. lytica* CECT 8139 were plated in non iridescent conditions (CYT and sNA respectively), gliding cells were not observed. Conversely, iridescent *C. lytica* CECT 8139 exhibited fast gliding motility (see video movies 1 and 2 as supplemental data). Taken together these results suggest a correlation between iridescence and gliding motility.



Figure 3. Edges patterns of *Bacteroidetes* colonies. Marine bacteria (A, B) and terrestrial bacteria (C) were grown 24 h on CYT and CY media, respectively. In (A), pictures of the entire colonies of *C. lytica* CECT 8139 and its mutant (impaired in gliding motility) are shown for comparison at the macroscopic level. The mutant was not iridescent on SYP, CYT, LN and sNA culture media (data not shown). All iridescent colonies exhibited typical spreading and jagged edges. Iridescent strains were: *C. lytica* CECT 8139 and DSM 2040 (and to a lesser extent DSM 7489), *C. baltica* CIP 106307, *C. fucicola* CIP 106308, *C. pacifica* LMG 21938, *C. geojensis* CCUG 60801, *C. tyrosinoxydans* DSM 21164, *M. dokdonensis* DSM 1720, *F. johnsoniae* DSM 2064, *F. succinicans* DSM 4002 and *S. cauliformis* DSM 3657.

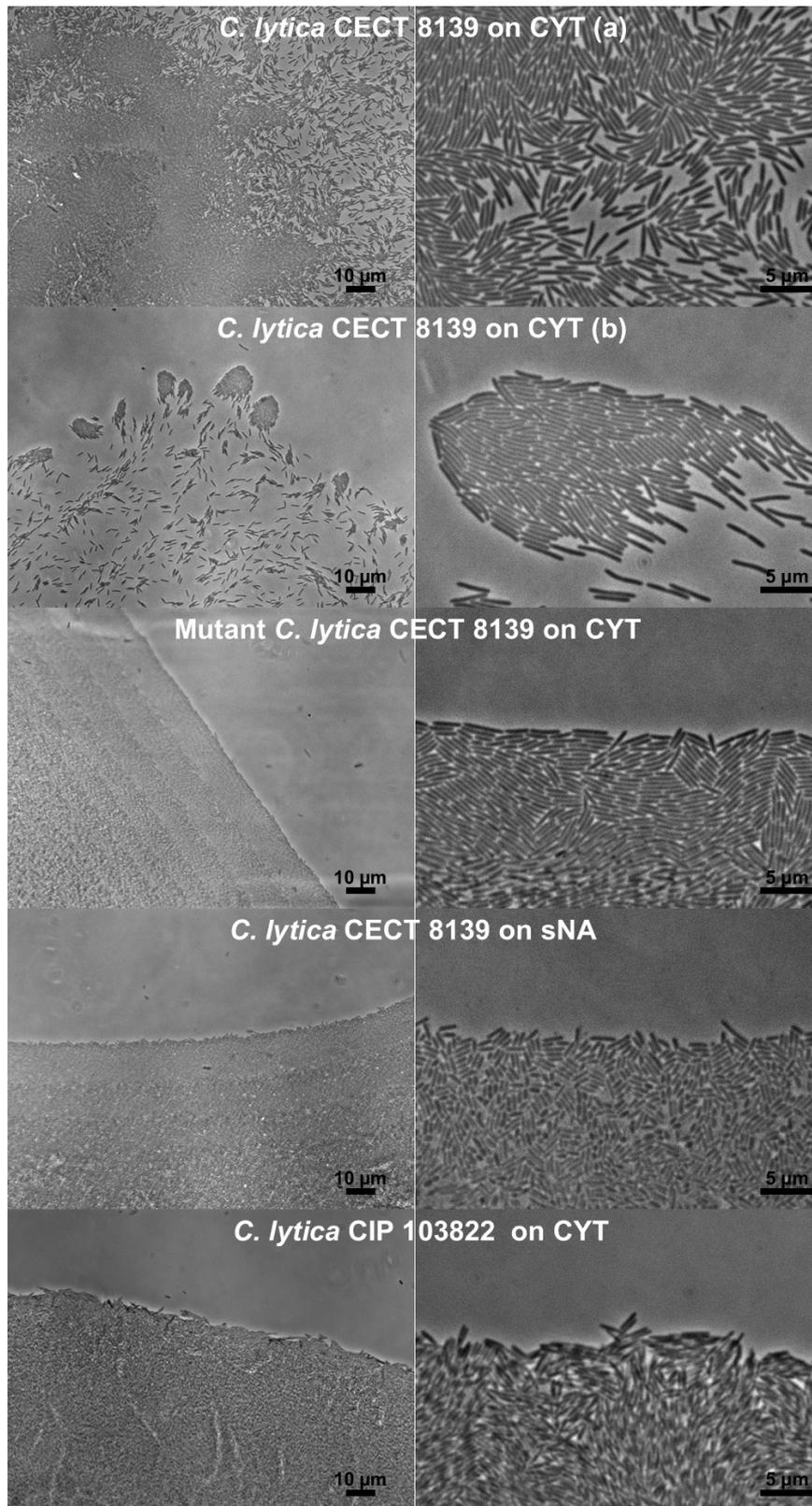
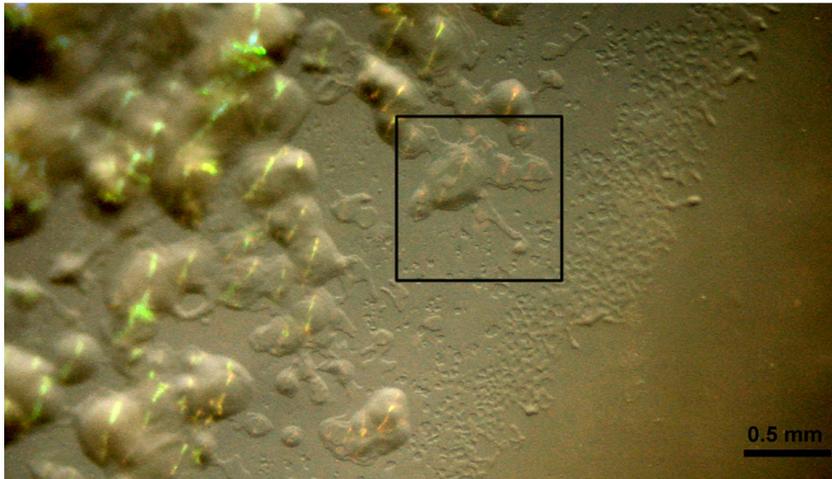


Figure 4. Phase contrast observation of colony edges of different *C. lytica* strains at high magnifications. Iridescent *C. lytica* CECT 8139 growing on CYT was observed at different colony positions: an edge (a) and an extreme edge (b). Low or non-iridescent conditions were CECT 8139 gliding defective mutant on CYT, *C. lytica* CECT 8139 grown on sNA and CIP 103822 strains grown on CYT. Magnification was x400 (left column) and x1000 (right column).

Dynamic formation of an iridescent glitter

We designed an experimental device to monitor the appearance of iridescence over time in a gliding colony. Intense iridescent colonies of *C. lytica* DSM 2040 were used to observe the kinetic formation of glitters (Figure 5). Colonies appeared to move rapidly and the formation of a glitter centre could be followed (black arrows). After only 20 minutes the first non-iridescent layer was visualized and 10 minutes later, likely due to layer superposition, a glitter effect could be observed. The iridescence was conserved even with rapid micro-colony movement, suggesting the existence of a complex ordered structure continuously being formed, for example, if the cells follow the exact same path in the glitter area. These effects were more easily observed on the video sequence (see movie 3 in supplemental data).

A



B

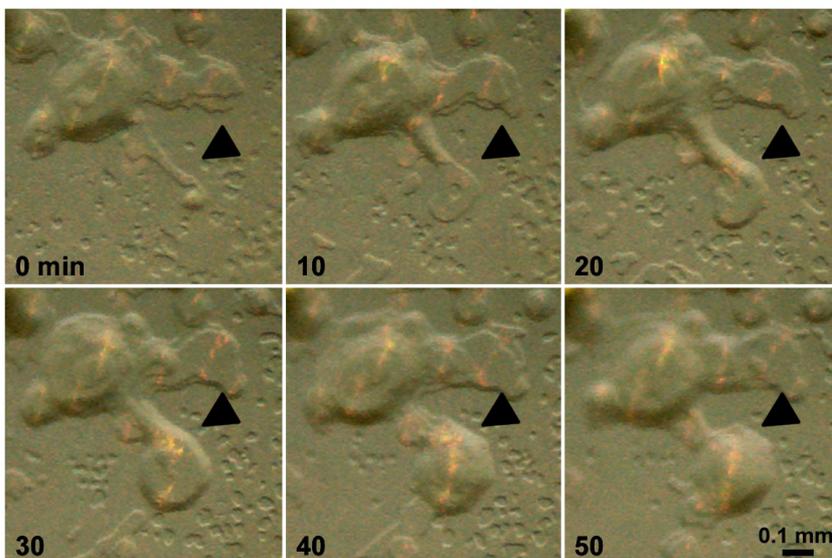


Figure 5. Dynamic formation of iridescence. A glitter centre (black arrow) was observed on the edges of a *C. lytica* DSM 2040 colony after 24 h incubation on CYT medium. Colony was photographed every 5 min for 60 min. Scales bars (A) 0.5 mm and (B) 0.1 mm.

Discussion

Iridescence in prokaryotes is a concept that has only recently been elucidated [21]. The intense glitter-like iridescence observed under direct illumination was typical of some *C. lytica* colonies. Understanding the bases of such iridescence and its cellular function requires its identification in bacteria and its correlation with the environment and specificities of the iridescent strains. Therefore, we set out to document iridescence in the *Bacteroidetes* phylum. We found that the previous descriptive terms such as “shiny”, “glistening”, “metallic tinge” or “greenish iridescent” were clearly correlated with iridescence effects for marine bacteria, but this correlation was not clear for terrestrial strains. Marine bacteria and in particular *Cellulophaga spp.* were found to exhibit the most intense iridescence effects. However, the iridescent trait was scattered within the *Bacteroidetes* and no phylogenetic link was found between the iridescent species.

As recently shown by [27], culture conditions were confirmed to influence strongly the observation of the iridescence. Nutrient-rich media were found to inhibit both gliding motility and iridescence. Specific physiological states might thus be required for the production of metabolites involved in the onset of iridescence. The repression of iridescence under certain conditions may explain, in part, the lack of previously reported descriptions and illustrations.

As several strains did not produce the previously reported effects it was essential to illustrate colonies' iridescence properties precisely. This was achieved using a specific epi-illumination experimental arrangement. Descriptive terms must be chosen carefully and the observation conditions must be precisely defined, in particular because a diverse set of iridescence profiles have been highlighted in this study. The green and red iridescence defined as “glitter-like” iridescence was observed in several marine *Bacteroidetes* and *F. johnsoniae* but with different intensity levels. Evidence of distinct color variations was also collected. For these reasons, the common glitter-like iridescence class could be divided in different sub-classes referring to the color.

In spite of these differences in intensities and/or reflected colors, strong similarities were found between the intensity-color maps of their iridescence. Similar periodic structures, with

minor variations of dimensions and periodicity, are therefore inferred to be responsible for the iridescent appearances observed.

It is still unknown whether bacterial iridescence occurs in natural habitats. However, iridescence was conserved under conditions that mimic the marine habitat [27]. Moreover, *Bacteroidetes* are widely distributed in nature, and *Cellulophaga spp.* are found in rocky shore ecosystems where stressful conditions of salinity, temperature variation, desiccation and light exposure select adapted organisms. The iridescence of bacterial colonies or biofilms might therefore have eco-biological roles by strongly reflecting specific wavelengths. UV and IR wavelengths were particularly well reflected by colonies exhibiting glitter-like iridescence. These typical reflections may have photoprotective or thermoregulatory roles. Non-communicative functions of iridescence have been reported in higher organisms [2], [6], [14]. For example, the reed frog *Hyperolius viridiflaccus* adapts its skin color appearance and reflectance with the arid environmental conditions of African savannas [37]. The measured spectral maxima in reflectance are in the IR wavelengths from 800 nm to 1100 nm with additional reflectance of UV. Periodic structures are also responsible for reducing mechanical friction in some burrowing animals [38]. A similar mechanical role might also be envisaged for bacterial iridescence.

A strong correlation was found between gliding motility and iridescence in this study. Gliding motility appeared as a necessary -but not sufficient- condition for the formation of iridescent colonies. In gliding motility, the cell movements proceed without pili or flagella, but correspond to “a smooth translocation of cells over a surface by an active process that requires the expenditure of energy” [36]. The cellular mechanisms are not perfectly known in the *Bacteroidetes* [39]. At the colony level, one of the characteristics is spreading edges. In this study, all iridescent colonies possessed typical edges of gliding bacteria, and the motility was particularly rapid for some strains. Moreover, dynamic analyses of glitter-centre formation indicated that the iridescent structures themselves could move. A fast gliding motility was thus compatible with the maintenance of a certain periodicity of disposition within the cell population. Such process likely requires fine-tuning and a high degree of cell-to-cell communication. This is a major question that remains unanswered. Among the strains tested, only three have their genome completely sequenced, namely *F. johnsoniae* DSM2064 (UW101), *C. algicola* DSM 14237 and *C. lytica* DSM 7489 [28], [40]. *F. johnsoniae* might

constitute a good candidate to characterize the genetic bases of iridescence. Accordingly, *F. johnsoniae* has already been used as a model organism for studies of *Cytophaga-Flavobacterium* gliding motility, and a wide variety of genetic tools have been developed for its manipulation [41], [42]. Moreover, genome comparisons between iridescent and non-iridescent *Bacteroidetes* strains might help us to identify key genes controlling both gliding motility and dynamic formation of iridescent glitter centers. This approach is currently being used in our laboratory for several strains of *C. lytica*.

References

1. Fox DL (1976) Animal biochromes and structural colors: physical, chemical, distributional & physiological features of colored bodies in the animal world, 2nd ed. University of California Press: Berkeley. 433 p.
2. Land M (1972) The physics and biology of animal reflectors. *Prog Biophys Mol Biol* 24: 75–106.
3. Vukusic P, Sambles JR, Lawrence CR, Wootton RJ (2001) Structural color: now you see it-now you don't. *Nature* 410: 36.
4. Vukusic P, Sambles JR (2003) Photonic structures in biology. *Nature* 424: 6950, 852-855.
5. Ghiradella H (1991) Light and color on the wing: structural colors in butterflies and moths. *Appl Optics* 30: 3492–3500.
6. Seago AE, Brady P, Vigneron J-P, Schultz TD (2009) Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural color mechanisms in beetles (Coleoptera). *J R Soc Interface* 6: S165–S184.
7. Greenewalt CH, Brandt W, Friel DD (1960) The iridescent colors of hummingbird feathers. *Proc Am Philos Soc* 104: 249–253.
8. Prum RO, Torres R (2003) Structural coloration of avian skin: convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. *J Exp Biol* 206: 2409–2429.
9. Doucet SM, Shawkey MD, Hill GE, Montgomerie R (2006) Iridescent plumage in satin bowerbirds: structure, mechanisms and nanostructural predictors of individual variation in color. *J Exp Biol* 209: 380–390.
10. Lythgoe JN, Shand J (1989) The structural basis for iridescent color changes in dermal and corneal iridophores in fish. *J Exp Biol* 141: 313–325.
11. Williams RC, Smith KM (1958) The polyhedral form of the *Tipula* iridescent virus. *Biochim Biophys Acta* 28: 464–469.
12. Welch V, Vigneron J-P, Lousse V, Parker A (2006) Optical properties of the iridescent organ of the comb-jellyfish *Beroë cucumis* (Ctenophora). *Phys Rev E* 73: 0419161–0419167.

13. Noyes J, Sumper M, Vukusic P (2008) Light manipulation in a marine diatom. *J Mater Res* 23: 3229–3232.
14. Doucet SM, Meadows MG (2009) Iridescence: a functional perspective. *J R Soc Interface* 6: S115–S132.
15. Engboek HC (1950) The phenomenon of iridescence in bacterial cultures, with particular reference to Pfeiffer's bacillus. *Acta Pathol Microbiol* 27: 388–393.
16. Guillot M (1941) Relation entre certaines propriétés optiques des bactéries et leur forme géométrique vraie. Diffraction de la lumière par les cultures et symétrie de la bactérie. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1100 – 1103.
17. Nogrady G, Guérault A (1964) Conditions favorisant l'iridescence bactérienne et l'observation du phénomène. *Rev Can Biol* 23: 367–373.
18. Pijper A (1918) Diffraction phenomena in cultures of microöganisms. *Med J S Afr* 14: 211–218.
19. Pijper A (1923) Diffraction in biological structures. I. The structure of colonies of the coli-typhoid group. *S Afr Med Rec* 17: 243–248.
20. Ponder E (1934) Diffraction patterns produced by bacteria. *J Exp Biol* 11:54 –57.
21. Kientz B, Vukusic P, Luke S, Rosenfeld E (2012) Iridescence of a marine bacterium and classification of prokaryotic structural colors. *Appl Environ Microbiol* 78: 2092–2099.
22. Johansen JE, Nielsen P, Sjøholm C (1999) Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Micr* 49: 1231–1240.
23. Skerratt JH, Bowman JP, Hallegraeff G, James S, Nichols PD (2002) Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Mar Ecol Prog Ser* 244: 1–15.
24. Bowman JP (2011) Genus IX. *Cellulophaga* Johansen, Nielsen and Sjøholm 1999, 1238^{VP}. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology, The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*, 2nd ed., vol 4. Springer Press: New York Dordrecht Heidelberg London, pp. 176–180.
25. Bernardet J-F, Nakagawa Y (2006) An introduction to the family *Flavobacteriaceae*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes*, 3rd ed., vol. 7. Springer, New York Press: NY, pp. 455–480.
26. Reichenbach H (1989) Genus I. *Cytophaga* Winogradsky 1929, 577^{AL} emend. In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG, editors. *Bergey's manual of systematic Bacteriology*, vol. 3. Williams & Wilkins Press: Baltimore, pp. 2015–2050.
27. Kientz B, Marié P, Rosenfeld E (2012) Effect of abiotic factors on the unique glitter-like iridescence of *Cellulophaga lytica*. *FEMS Microbiol Lett* 333 (2) : 101-8.
28. Pati A, Abt B, Teshima H, Nolan M, Lapidus A, et al. (2011) Complete genome sequence of *Cellulophaga lytica* type strain (LIM-21T). *Stand Genomic Sci* 4: 221–232.

29. Lewin RA (1969) A Classification of Flexibacteria. *Microbiology* 58: 189-206.
30. Lewin RA, Lounsbery DM (1969) Isolation, cultivation and characterization of Flexibacteria. *J Gen Microbiol* 58: 145–170.
31. Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W (1996) High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Mar Biol* 126: 1–7.
32. van der Meulen HJ, Harder W, Veldkamp H (1974) Isolation and characterization of *Cytophaga flevensis* sp. n., a new agarolytic flexibacterium. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol* 40: 329–346.
33. Weeks OB (1955) *Flavobacterium aquatile* (Frankland and Frankland) Bergey et al., type species of the genus *Flavobacterium*. *J Bacteriol* 69: 649–658.
34. Reichenbach H, Dworkin M (1981) The Order *Cytophagales* (with addenda on the genera *Herpetosiphon*, *Saprospira*, and *Flexithrix*). In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG, editors. *The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*, 1st ed., vol. 1. Springer-Verlag Press: Berlin, pp. 356–379.
35. Vukusic P, Stavenga DG (2009) Physical methods for investigating structural colours in biological systems. *J R Soc Interface* 6: S133-S148.
36. McBride MJ (2001) Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol* 55: 49–75.
37. Kobelt F, Linsenmair KE (1992) Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia: Anura: Hyperoliidae) to its arid environment. VI. The iridophores in the skin as radiation reflectors. *J Comp Physiol B* 162: 314–26.
38. Meadows MG, Butler MW, Morehouse NI, Taylor LA, Toomey MB, et al. (2009) Iridescence: views from many angles. *J R Soc Interface* 6(Suppl. 2): S107–S113.
39. McBride MJ (2004) *Cytophaga-Flavobacterium* gliding motility. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7: 63–71.
40. Abt B, Lu M, Misra M, Han C, Nolan M, et al. (2011) Complete genome sequence of *Cellulophaga algicola* type strain (IC166). *Stand Genomic Sci* 4: 72–80.
41. Braun TF, Khubbar MK, Saffarini DA, McBride MJ (2005) *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility genes identified by mariner mutagenesis. *J Bacteriol* 18: 6943–6952.
42. Rhodes RG, Pucker HG, McBride MJ (2011) Development and use of a gene deletion strategy for *Flavobacterium johnsoniae* to identify the redundant gliding motility genes *remF*, *remG*, *remH*, and *remI*. *J Bacteriol* 193: 2418–28.
43. Vozniakovskaya YM, Rybakova ZP (1969) Some new data on ecology and properties of bacteria belonging to *Promyxobacterium* genus. *Mikrobiologiya* 38: 135–143.
44. Stanier RY (1947) Studies on Nonfruiting Myxobacteria: I. *Cytophaga johnsonae*, n.sp., a Chitin-decomposing Myxobacterium. *J Bacteriol* 53: 297–315.
45. Nedashkovskaya OI (2004) *Cellulophaga pacifica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 609–613.

46. Dobson SJ, James SR, Franzmann PD, McMeekin TA (1991) A numerical taxonomic study of some pigmented bacteria isolated from Organic Lake, an Antarctic hypersaline lake. *Arch Microbiol* 156: 56–61.
47. Yoon JH, Kang SJ, Lee SY, Lee CH, Oh TK (2005) *Maribacter dokdonensis* sp. nov., isolated from sea water off a Korean island, Dokdo. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2051–2055.
48. Bernardet JF, Bowman JP (2011) Genus I. *Flavobacterium* Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Huntton 1923, 97^{AL} emend. Bernardet, Sergers, Vancanneyt, Berthe, Kersters and Vandamme 1996, 139, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology, The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*, 2nd ed., vol. 4. Springer Press: New York Dordrecht Heidelberg London. pp. 112–176.
49. Bowman JP (2000) Description of *Cellulophaga algicola* sp. nov., isolated from the surfaces of Antarctic algae, and reclassification of *Cytophaga uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Cellulophaga uliginosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1861–1868.
50. Kahng HY, Chung BS, Lee DH, Jung JS, Park JH, Jeon CO (2009) *Cellulophaga tyrosinoxydans* sp. nov., a tyrosinase-producing bacterium isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 654–657.
51. Park S, Oh KH, Lee SY, Oh TK, Yoon JH (2012) *Cellulophaga geojensis* sp. nov., a member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from marine sand. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 1354-1358.
52. Van Trappen S, Vandecandelaere I, Mergaert J, Swings J (2004) *Flavobacterium degerlachei* sp. nov., *Flavobacterium frigoris* sp. nov. and *Flavobacterium micromati* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 85-92.

II. Données supplémentaires de l'article

Le CD contenant les fichiers vidéo et le plan de celui-ci sont disponibles à la fin du manuscrit en Annexe 4, page 273.

Vidéo « Chapitre 3. a » (Movie S1). Motilité « gliding » des bords de colonie de *C. lytica* CECT 8139 (sur du CYT) observée au microscope inversé. Le mouvement de réversion des cellules est bien visible. Le déplacement des cellules est enregistré durant 3 min. La partie centrale de la colonie possède les cellules les moins motiles.

Vidéo « Chapitre 3. b » (Movie S2). Motilité « gliding » des bords extrêmes de colonie de *C. lytica* CECT 8139 (sur du CYT) observée au microscope inversé. Le déplacement des cellules est enregistré durant 3 min. Des groupes de plusieurs cellules envahissent rapidement la gélose.

Vidéo « Chapitre 3. c » (Movie S3). Formation dynamique d'une paillette en bordure de colonie de *C. lytica* DSM 2040 (sur CYT). Le phénomène est observé durant 88 min avec une image par minutes. Sur les bords, la motilité « gliding » est bien visible. Plusieurs couches de cellules semblent nécessaires à la formation du centre iridescent rouge (paillette).

III. Principaux résultats et discussion

Les expérimentations effectuées dans cette étude visaient à clarifier l'iridescence « glitter-like » au sein du phylum *Bacteroidetes*. Le phénomène est exprimé par 13 des 22 souches comparées, la majorité étant marine. Parmi ces souches, certaines ont déjà été mentionnées iridescentes mais avec très peu de précisions. Toutefois, pour quelques souches décrites comme possédant des effets optiques, nous ne retrouvons pas d'iridescence. C'est le cas notamment des colonies de *F. aquatile* mentionnées « glistening » (Reichenbach, 1989). A l'inverse, nous observons une iridescence pour des souches non décrites, telle *C. geojensis*. Ceci confirme que les descriptions du phénomène sont insuffisantes dans la littérature. La méthodologie qui a été utilisée dans ce chapitre permet de clarifier l'iridescence de plusieurs espèces bactériennes et démontre la présence de ce phénomène pour d'autres espèces que *C. lytica*.

La comparaison des phénomènes a été effectuée sur différents milieux de culture. Certains ne permettent pas l'observation de l'iridescence des colonies comme le sNA et le TSA, respectivement pour les souches marines et terrestres. Avec le milieu CYT, le phénomène se distingue de façon plus aisée par rapport aux milieux MA ou LN. Par exemple, *C. lytica* DSM 2039 n'est pas iridescente sur MA. Nous pouvons donc affirmer que le choix du milieu de culture est primordial pour l'observation de l'iridescence « glitter-like ». Les milieux CYT et CY respectivement pour les souches marines et terrestres sont les plus adaptés pour visualiser le phénomène. L'utilisation de milieux non favorables à l'iridescence pourrait en partie expliquer l'omission des phénomènes dans certaines études. Ces milieux riches ne permettent pas d'obtenir des colonies iridescentes. Des études antérieures ont montré que ces milieux sont peu adaptés à la culture de souches environnementales (Martin & MacLeod, 1984 ; Button et al, 1993). En effet, certains composés comme la peptone ont même une certaine toxicité (Buck, 1974 ; Jensen et al, 1996). Dans le Chapitre 2, nous avons identifié un besoin en eau de mer pour l'iridescence de *C. lytica* CECT 8139. Néanmoins, dans cette étude des souches terrestres iridescentes sur le milieu CY, dépourvu en sels marins, sont observées. Selon l'origine de l'espèce, les facteurs abiotiques qui influent sur le phénomène ne sont donc pas similaires.

L'un des objectifs de cette étude est d'évaluer les origines des souches exprimant l'iridescence « glitter-like ». Les colonies de bactéries marines sont les plus intenses. Excepté *M. dokdonensis*, toutes les espèces marines iridescentes appartiennent au genre *Cellulophaga*. L'espèce *C. algicola* est la seule dans ce genre à ne pas exprimer ce phénomène. L'iridescence est observée sur trois des six souches terrestres, *F. johnsoniae*, *S. cauliformis* et *F. succinicans*, avec cependant une faible intensité. Cette étude montre que *C. lytica* n'est pas la seule espèce exprimant l'iridescence « glitter-like », mais également que le phénomène n'est pas restreint à un genre bactérien ou à une famille. L'iridescence atteint son effet le plus intense chez les bactéries marines, bien que ce ne soit pas un phénomène essentiellement marin. Les rôles de l'iridescence « glitter-like » sont donc supposés plus adaptés à ce biotope.

Parmi les souches iridescentes « glitter-like », certaines n'expriment pas les mêmes couleurs que *C. lytica* (vert dominant et rouge/violet sur les bords). Différents profils d'iridescences sont identifiés, comme par exemple des colonies majoritairement rouges ou jaunes iridescentes ; les intensités varient également. Des contrôles correspondant aux conditions non iridescentes ont été inclus (*C. lytica* CIP 103822 sur CYT et *C. lytica* CECT 8139 sur sNA). Dans ces conditions, seule la pigmentation est distinguée par l'émission d'une même couleur de faible intensité pour une longueur d'onde jaune/orange. Nous avons souhaité caractériser les différents profils d'iridescence (couleurs et intensité) par des données de microspectrophotométrie. Pour des couleurs et des intensités d'iridescence différentes, une même carte spectrale est retrouvée. Les quatre pics majoritaires, correspondant aux longueurs d'ondes diffractées, se positionnent de façon similaire même avec une iridescence de couleur différente. Les différences de coloration proviennent d'un déplacement des pics dans le spectre, plus haut (vers des longueurs d'ondes rouges) ou plus bas (vers des longueurs d'onde plus bleues/violettes). Par exemple, pour les iridescences rouges, le pic principal a une longueur d'onde de 620 nm, au lieu de 530 nm pour les colonies vertes iridescentes. Nous supposons alors que les structures responsables de l'iridescence doivent être équivalentes car une même carte spectrale est globalement obtenue. Les variations de couleurs pourraient s'expliquer par un changement de dimensions des structures.

Dans le Chapitre 2, nous avons déterminé un lien entre les couleurs d'iridescence et la densité cellulaire. Cette affirmation est en partie vérifiée par l'observation de colonies rouges de *C. baltica* qui arborent, après plusieurs jours d'incubation, des colonies vertes iridescentes. Ce changement de couleur pourrait être dû à des colonies moins denses. Nous supposons que

la densité cellulaire influence les dimensions des structures iridescentes dans la colonie. Ces données pourraient être complétées par l'analyse microspectrophotométrique de diverses souches.

A partir des observations macroscopiques et microscopiques, un lien fort entre l'iridescence et la motilité « gliding » des souches est confirmé. En effet, les souches iridescentes présentent toutes des bords de colonies typiques du déplacement par « gliding », à la seule exception, du mutant *C. lytica* CECT 8139 faiblement iridescent sur les bords de colonies et non motile. Par ailleurs, les colonies non iridescentes de souches marines ne sont pas motiles. Toutefois certaines bactéries terrestres non iridescentes présentent une motilité « gliding ». La vitesse de déplacement ne semble pas influencer l'iridescence. Nous pouvons conclure que le « gliding » est requis pour l'iridescence des colonies mais que sa seule présence n'est pas suffisante à l'expression du phénomène. La motilité pourrait jouer un rôle important dans la mise en place des structures iridescentes. Cependant, d'autres facteurs que la motilité devraient entrer en jeu.

De façon intéressante, nous avons réussi à suivre en temps réel la formation d'une paillette sur la colonie de *C. lytica* DSM 2040. Une succession de couches est distinguée. Les premiers effets, de l'iridescence rouge, ne sont visibles qu'à partir d'une certaine épaisseur. Le phénomène est étonnamment dynamique. Malgré une motilité rapide des cellules dans les colonies, les paillettes sont conservées. Les structures semblent rester équivalentes malgré un mouvement cellulaire perpétuel.

L'étude microscopique de la motilité cellulaire donne des informations plus précises sur l'allure des bords de colonie. En condition iridescente, *C. lytica* CECT 8139 sur CYT, plusieurs couches de cellules sont observées et les cellules se déplacent très rapidement. Dans les conditions non iridescentes, *C. lytica* CIP 103822 sur CYT et *C. lytica* CECT 8139 sur sNA, les bords linéaires sont bien visibles et les cellules ne suivent aucune orientation. La souche mutante faiblement iridescente et non motile est particulièrement intéressante. Elle présente un bord de colonie linéaire, typique des souches non-iridescentes, cependant des multicouches de cellules se distinguent, ainsi que des petits groupes de 4 ou 5 cellules. Une organisation en multicouche semblent donc impliquée dans la structuration responsable de l'iridescence.

IV. Perspectives de l'étude

Dans ce chapitre, plusieurs colorations d'iridescence ont été observées au sein des *Bacteroidetes*. Afin de préciser l'iridescence propre à chaque souche, nous suggérons la création de sous-catégories d'iridescence « glitter-like ». Ces sous-classes correspondraient aux iridescences : « green/red glitter-like », « green glitter-like » et « red glitter-like » pour une culture sur milieu CYT ou CY (Figure 42). Elles permettraient de clarifier considérablement les descriptions de l'iridescence bactérienne. De plus, l'intensité du phénomène serait incluse dans cette classification. Afin de préciser cette classification, il serait toutefois intéressant d'étendre l'étude à d'autres souches.

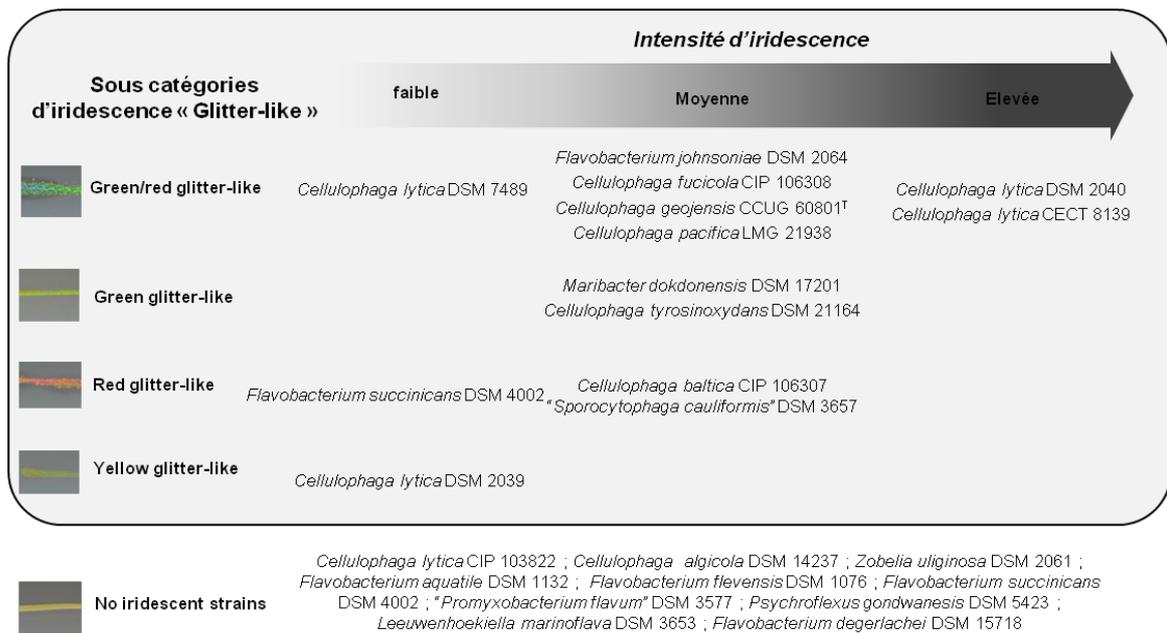


Figure 42. Classification de sous-catégories d'iridescence « glitter-like » retrouvées chez les membres du phylum *Bacteroidetes*.

Nous avons pu démontrer que le phénomène est conservé à travers différents genres bactériens qu'ils soient marins ou terrestres. En général, les bactéries conservent des caractères qui leur donnent un avantage sélectif. Les souches issues du milieu marin et plus particulièrement les *Cellulophaga spp.* présentent les plus fortes intensités d'iridescence. Nous supposons que les fonctions de l'iridescence seraient donc plus adaptées à une croissance dans l'environnement marin. Le chapitre suivant s'emploie à compléter ces données par l'isolement, dans une même région, de souches iridescentes sur des échantillons divers provenant de différents biotopes.

Un lien entre l'iridescence et la motilité « gliding » est identifié dans cette étude. La mise en place des structures iridescentes pourrait être influencée par cette motilité. Les structures responsables d'iridescence ont la particularité d'être périodiques. Dans l'iridescence « glitter-like », cette périodicité est conservée malgré la motilité rapide des cellules. Nous supposons alors que des mécanismes de communication cellulaire spécifiques devraient être impliqués dans la mise en place de ces structures. Les expérimentations possibles pourraient être par exemple de déterminer la présence de certains composés dans des conditions d'iridescence et de motilité et inversement non iridescente et sans motilité.

Grâce au mutant de *C. lytica* CECT 8139 nous avons observé une structuration minimale pour l'iridescence : une construction en multicouches et le groupement de cellules. Ceci est le premier indice d'une structuration au sein de la colonie qui devrait induire un effet optique. L'élucidation des structures iridescentes est entreprise dans le Chapitre 5.

Chapitre 4.

ISOLEMENT ET DISTRIBUTION DE BACTERIES MARINES IRIDESCENTES



I. Démarche scientifique

Dans les Chapitres 1 et 3, les comparaisons des phénomènes au sein de différentes souches de *C. lytica* ont démontré divers écotypes d'iridescence. Après une inspection de la littérature nous avons remarqué que les écotypes non iridescents ou peu intenses de *C. lytica* - DSM 2039, CIP 103822 et DSM 7489- sont issus de biotope sédimentaires (Lewin & Lounsbery, 1969 ; Johansen et al, 1999). La souche iridescente *C. lytica* DSM 2040 provient d'eau de mer (Lewin & Lounsbery, 1969). Une autre souche décrite comme étant iridescente, *C. lytica* ACEM 21, a également été isolée d'eau de mer lors d'un bloom de microalgues (Skeratt et al, 2002). La souche étudiée *C. lytica* CECT 8139 était associée à une anémone. Les souches iridescentes pourraient donc avoir des origines particulières. De plus, les deux chapitres précédents démontrent que l'iridescence « glitter-like » est exprimée par différentes espèces bactériennes, l'intensité la plus importante étant observée pour des souches d'origine marine. D'après la littérature, *C. lytica* est présente dans divers environnements marins. Cependant la majorité des études des comptages d'ADN totaux ont été réalisés sans cultiver les souches (Schäfer et al, 2001 ; Fandino et al, 2005 ; Longford et al, 2007). Par simple lecture de la littérature, il est donc impossible de connaître la présence de bactéries iridescentes dans un même biotope.

Dans cette étude, nous avons essayé de ré-isoler des colonies iridescentes de *C. lytica* afin de préciser leur présence dans le milieu marin. De plus, leur distribution a été évaluée dans l'objectif de déterminer si une concordance existe entre le phénomène et des niches écologiques spécifiques. Dans le but d'étayer ces informations nous avons souhaité analyser divers échantillons. Nous avons donc procédé à une série de collectes sur la côte de Charente Maritime, dans différents biotopes (estran rocheux, plage de sable et de rochers et vasière) et avec divers types d'échantillons (macroalgues, macro-organismes, eau, sédiments et déchets).

Lors de ces analyses, l'isolement de souches présentes *in situ* a été privilégié afin d'évaluer leur abondance relative. En effet, lors d'échantillonnages classiques pour l'isolement de souches environnementales, les communautés bactériennes peuvent être modifiées durant le temps de transport (Schäfer et al, 2001). Un protocole d'ensemencement direct a été élaboré. Les échantillons collectés sont rapidement inoculés sur le milieu de culture. Le milieu CYT a été utilisé car, comme décrit dans les études précédentes, il est

adapté à l'observation des colonies iridescentes. L'analyse comprenait tout d'abord la recherche de colonies iridescentes sur les boîtes d'origine par une observation en épi-illumination. Les colonies ainsi isolées et purifiées étaient identifiées génétiquement. Lors de la première étape de ces travaux, nous avons pu isoler et identifier différentes espèces marines iridescentes. Une comparaison phylogénétique a donc été réalisée. Les origines des souches iridescentes isolées ont ensuite été comparées afin d'établir un lien entre le phénomène et des niches écologiques spécifiques.

Les résultats de cette étude sont inclus dans un article soumis le 11 Septembre 2012 au journal *Systematic and Applied Microbiology*.

Article 4.

Isolation and distribution of iridescent *Cellulophaga lytica* and further iridescent marine bacteria in the
Charente Maritime coast

Soumit le 11 Septembre 2012 dans le journal Systematic and Applied
Microbiology

Isolation and distribution of iridescent *Cellulophaga lytica* and further iridescent marine bacteria in the Charente Maritime coast

Kientz Betty, H el ene Agogu e, C eline Lavergne, Pauline Mari e, Eric Rosenfeld
UMR 7266 CNRS-ULR, LIENSs laboratory, University of La Rochelle, France.

Correspondence: Betty Kientz & Eric Rosenfeld, UMR 7266 CNRS-ULR, LIENSS, University of la Rochelle, B atiment Marie Curie, Avenue Michel Cr epeau, 17042 La Rochelle, Cedex 1, France. Tel.: +33 5 46 45 82 28; fax: +33 5 46 45 82 65.

E-mails: betty.kientz@gmail.com, eric.rosenfeld@univ-lr.fr

Running title: Distribution of iridescent marine bacteria

Keywords: Iridescence, iridescent bacteria, marine bacteria, *Cellulophaga lytica*, Bacteroidetes, *Tenacibaculum*, *Aquimarina*, *Flexibacter*, cultivable bacteria, epibiont, seaweed, coastal shore, rocky shore

Abstract

An intense colored marine bacterium, identified as *Cellulophaga lytica*, has been previously isolated from an actinia surface on the Charente Maritime rocky shore (Atlantic Coast, France). Iridescence of the colonies under direct light was recently described and proved physically. Iridescence intensities were found to strongly differ within *C. lytica* strains from culture collections. Importantly, the occurrence and distribution of iridescent bacteria in the marine environment were still unknown. In this study, we searched for marine iridescent bacterial strains in different biotopes of the Charente Maritime coast. Various marine samples (water, sediments, macroalgae, other macroorganisms and detritus) were collected in seven biotopes using a direct plate inoculation method. Thirty-four iridescent *C. lytica* strains were isolated. Interestingly, ten iridescent *Bacteroidetes* species (sixty three strains) affiliated to *Tenacibaculum*, *Aquimarina* and *Flexibacter* genera were additionally isolated. Iridescence colors were different through genera and species but also within a same species. Iridescent marine bacteria were widely distributed. However, a majority was isolated from rocky shore and in particular on red seaweed surfaces and mollusks. Our data suggest that isolates with iridescent properties are well conserved in stressful environments such as coastal shore. This origin may provide insight into the ecological and biological functions of iridescence.

Introduction

Different color processes are present in the natural environment. Pigmentation, a biochemical coloration, can be generated by molecular absorption of specific wavelengths. The color exhibited is uniform. A very different coloration process corresponds to structural colorations also referred as iridescence. An intense coloration with angle-dependent color changes is then produced due to micron- and sub-micron-sized periodic structures interfering with light [12, 49]. This appearance has been well studied in higher organisms particularly in insects [14, 42, 50], birds [16, 10, 39] and fishes [25, 29]. Iridescence is also encountered in microorganisms such as viruses [52], and in marine organisms such as ctenophores [51], macroalgae [8, 13] and diatoms [34].

Bacterial iridescence has been a vague and poorly documented concept. However, a marine bacterium -*Cellulophaga lytica* CECT 8139- has been recently described to exhibit, on solid media, a unique intense iridescence in reflection [23]. *C. lytica*'s colonies have colored centers of varying brightness distributed across the biofilm giving a glitter-like character. Iridescent green is the dominant color, but red and blue-violet are also observed at the colonies' peripheral edges. Iridescence of *C. lytica*'s colonies was proved with physical methods and the phenomenon was named glitter-like iridescence. Since this type of iridescence occurred under direct natural light exposure it was described as a more natural coloration effect compared to the other bacterial iridescences.

C. lytica is adapted to a wide range of marine biotopes in free-living, biofilm and associated forms [3, 4, 5, 27, 40]. Diverse intensities of iridescence were found within the *C. lytica* strains [23]. Non-iridescent *C. lytica* strains - DSM 2039, CIP 103822 and, to a lesser extent, DSM 7489 - were all isolated from muddy sediment of Costa Rica beaches [21, 27]. In contrast, iridescent strains *C. lytica* DSM 2040 and ACEM 21 were isolated from seawater in an aquarium outflow and an estuary, respectively [27, 43]. The iridescent *C. lytica* CECT 8139 was isolated from a red anemone *Actinia equine* surface at Oléron island rocky shore on the Charente maritime coast in France [23]. Therefore, different ecotypes exist and unlike the benthic origin, the associated and seawater origins seemed favorable for the iridescent trait. However, an extended study on origins and biotopes favoring the iridescence trait has not yet been performed. In addition, even if bacterial iridescence has not yet been directly observed in

the marine environment, investigating the specific distribution of iridescent strains could be of major importance to determine the possible roles of marine bacterial iridescence.

In this work, we studied the occurrence and distribution of iridescent bacterial strains in the Charente maritime coast in France, with special attention paid to the *C. lytica* species. A specific observation device was employed to detect iridescent colonies. Isolated strains were taxonomically identified by sequence analysis of the 16S rRNA gene.

Materials and methods

Sample collection and bacterial isolation

The sampling was performed between October and December 2011. The seven sites were located on the Charente maritime coast in France (Fig. 1). Diverse biotopes as rocky shore, mudflat and rocky-sandy shores were included (Table 1). A total of 139 samples were collected for bacterial isolation: seawater (11), sediments (20), red macroalgae (Rhodophyta) (16), green macroalgae (Chlorophyta) (11), brown macroalgae (Phaeophyta) (20), decomposed macroalgae (7), marine plants (4), sponges (5), cnidarians (8), worms (3), crustaceans (7), mollusks (19), echinoderms (6) and detritus (2).

A “fresh” inoculation protocol was defined in order to isolate environmental strains and to avoid population changes during transport. For seawater samples, a side of the agar plate was immersed directly in the water and the Petri dish was rapidly closed. For solid samples, a fragment was rinsed in artificial sterile seawater (ASW) Instant Ocean® (30 g L⁻¹ in pure water) in order to remove loosely attached epibionts and then scraped onto the agar plate [41]. For sediment samples, about 1 ml was directly added onto the agar. Three days of incubation at 20°C were needed to observe iridescent colonies. Picked colonies were then subcultured, purified and stored at -80°C in Cryovials® (Dutscher).

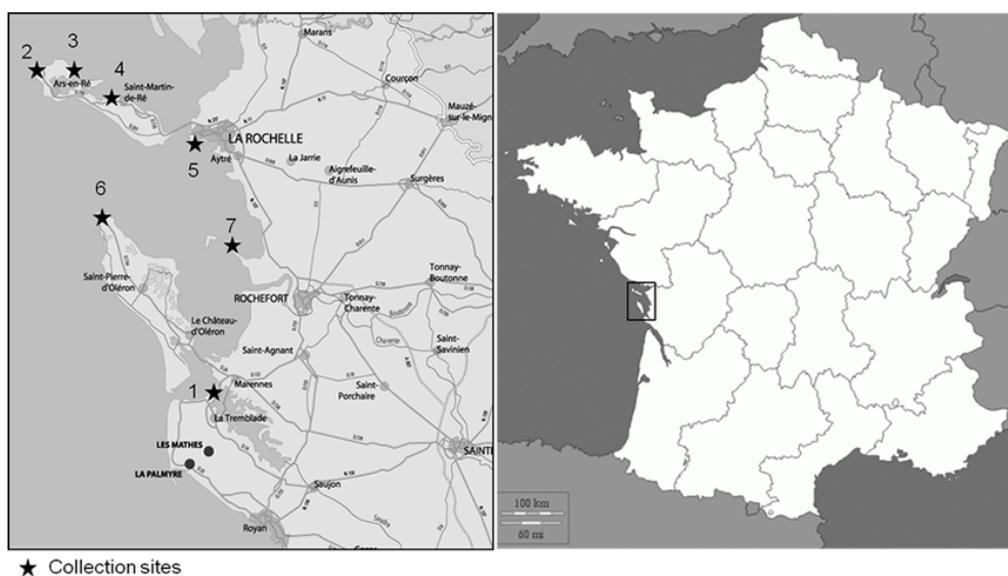


Fig. 1. Maps of the Charente Maritime coast in France and of the different collection sites (see details in the Table 1).

Table 1. Collection sites with specified biotopes.

Site	Town	Sampling date	Biotope	Number of samples *	
1	Mus du loup beach	Ronce les bains, La Tremblade	29.09.11	Sand and rocks	6
2	Phare des baleines	St Clément des Baleines, Ré Island	24.10.11	Rocks	51
3	Eelgrass park	Loix, Ré Island	3.11.11	Silt with eelgrass	10
4	Arnérault Beach	La Flotte, Ré Island	3.11.11	Sand and rocks	7
5	Belvédère	Chef de Baie, La Rochelle	3.11.11	Sand and rocks	9
6	Chassiron lighthouse	Chassiron, Oléron Island	15.11.11	Rocks	31
7	Pointe de la fumée	Fouras	29.11.11	Silt and sand with Oyster	25

* Total number of samples : 139

Culture conditions of iridescent marine bacteria

The solid medium *Cytophaga* (CYT) was used to isolate iridescent marine bacteria [21]. CYT medium contained 1 g tryptone, 0.5 g yeast extract, 0.5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 15 g agar in 1 L of artificial seawater (ASW) Instant Ocean© (30 g L^{-1} in pure water). Incubation temperature was fixed at 20°C.

Iridescence observation

Plates from the collection were observed using a direct illumination set up (see below) to elicit iridescent colonies. Additionally, iridescence of the pure strains was observed using a streaking procedure. One colony from a 24 h-old plate was subcultured in triplicate plates

drawing thin 5 cm-linear streaks. Cultures were photographed after 24 h and 72 h of growth in a dark room using an experimental arrangement of oblique epi-illumination at a fixed illumination angle of 60 °C [23]. The light source was a lamp (Kaiser RB 218N HF copy lighting unit) of 18 watts, 5400 Kelvin, the operating voltage correspond to AC 220-240 V, 50 Hz with an operating frequency of 40 kHz. The camera was a Nikon D1500 18-55VR on Av program with f22, the lens was a macro, large size (12.1 Mega pixels) used in superfin mode.

Molecular characterization of the strains

Identification of each iridescent isolate was determined by 16S rRNA gene sequencing. The DNA suspension for the PCR consisted of colonies picked on agar plates and resuspended in 500 µl of sterile water. Before the PCR, 3 heat (incubation at 60°C during 2 min) and cold (incubation in liquid nitrogen during 2 min) shocks were applied on the bacterial suspension in order to lyse the cells and liberate the DNA. Primers used for 16S RNA full length gene sequencing were 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), and 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') [26, 31]. Reaction mixtures of 50 µl contained 20 µl of PCR master mix (DyNAzyme II, Finnzymes), 100 pmol of each primer, 2 µl of washed cells and MilliQ water to the 50 µl volume. PCR reaction was carried out in a Labcycler SensoQuest. The thermal PCR profile was as follows: lysis of cells at 94°C for 10 min, initial denaturation at 94°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 60°C for 1 min, and elongation at 72°C for 1 min. The final elongation step was 9 min at 72°C. The 16S rDNA products were analysed by electrophoresis in 1% agarose gels. The 16S rDNA products were then sequenced with an automatic DNA analysis system (Genoscreen, Lille, France and GATC, Konstanz, Germany). Sequences were compared with sequences available in the GenBank database by using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) service to determine their approximate phylogenetic affiliations [1]. Sequences of representative strains were deposited in the GenBank database under accession numbers JX454520 to JX454530.

Phylogeny

Sequences have been analyzed using the ARB software package (November 2011 version) [28] and the corresponding SILVA 16S RNA-based LTP released 106 SSU database [53]. After importing, all sequences were automatically aligned according to the SILVA SSU [11]

reference alignment thanks to the online tool SINA. Manual refinement of the alignment was carried out taking into account the secondary structure information of the rRNA in ARB. Tree reconstruction was using the Neighbour Joining (ARB), Maximum Parsimony (PHYMLIP DNA-Parsimony v 3.6a3 [11]) and Maximum Likelihood (PHYML v2.4.5 [17]) methods. Tree topology was further tested by the application bacterial variables positional filters and by the application of 30%, 40% and 50% positional conservatory filters. The final tree was calculated with 44 sequences based on 1373 valid columns (40 % filtering) with PHYML (model: GTRGAMMA). Partial sequences have been added to the tree using the ARB parsimony tool.

Results

Collection and isolation of iridescent marine bacteria

For isolation of iridescent marine bacteria, the CYT medium was preferred to rich media such as marine agar to avoid too rapid growth. Using our collection and isolation procedures, we could easily observe several iridescent marine strains from diverse origins in the Charente maritime coast. Diverse bacterial colonies grew on CYT plates but iridescent colonies were only visible after several days of incubation. Interestingly, various visual effects were observed under direct illumination (Fig. 2, black arrows). Mostly large green or red iridescent colonies were present. Small red pigmented colonies with red iridescence were also observed. On several plates a red and a green iridescent colony were growing closely (Fig. 2, white arrows).

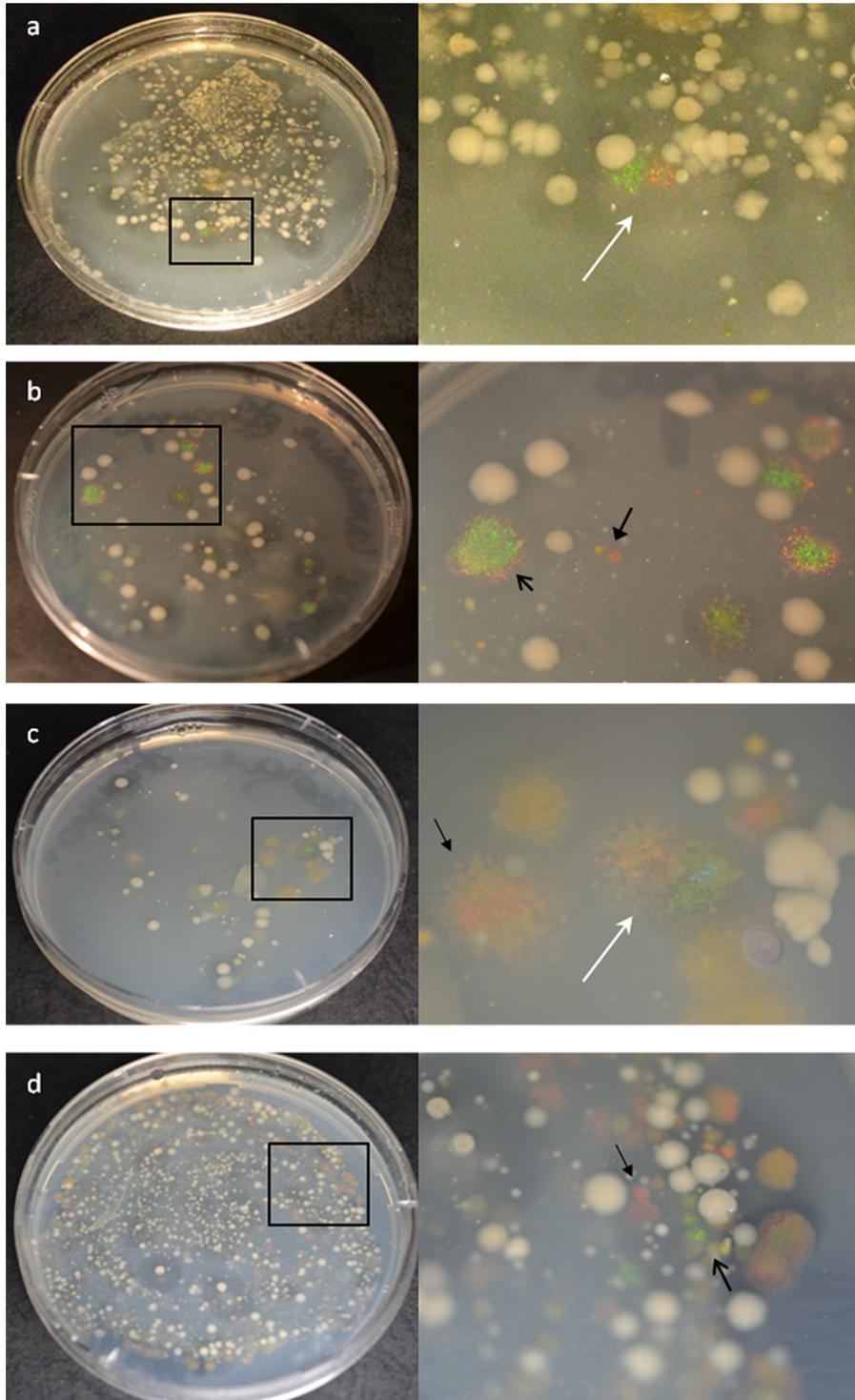


Fig. 2. Observation under direct illumination of CYT isolation plates incubated for three days at 20°C. Origins of collected samples were (a) *Palmaria palmata* rhodophyta at Whales lighthouse (b) holdfast of an unattached *Saccorhiza polyschides* phaeophyta at Chassiron lighthouse, (c) plastic detritus at Smoke peak and (d) limpet at Smoke peak. Black arrows indicate iridescent colonies. White arrows show the proximity of a red and a green iridescent colony.

Iridescence and distribution of *C. lytica*

C. lytica's iridescence is characterized by a green bright effect with red/violet edges. This type of iridescence was observed on several plates of diverse origins (Fig. 2) and colonies resembling *C. lytica* were isolated and then identified by molecular analysis. The 34 strains identified as *C. lytica* were grouped in OTU 1 (Table 2). Different iridescent intensities and color variations were visible. A few colonies exhibited yellow or blue colors (Fig. 3). Most of the strains were positive for agarolysis and gliding motility. Particularly, fast gliding motility was observed for the colonies intensively iridescent. The Rocky shore biotope was found to have a high content of iridescent *C. lytica* (Fig. 4). This species was isolated from a wide range of samples but mostly from macroalgae, and in particular from Rhodophyta and Phaeophyta, and from mollusks. Most intense iridescent *C. lytica* ecotypes were isolated from the surface of Rhodophyta and mollusks (Fig. 3).

Table 2. Affiliation of isolated iridescent strain.

OTU	Representative strain	Accession number	Number (%) of isolates	Closest relative species	% sequence similarity	Accession number of the closest relative
OTU 1	Strain 14	JX454529	34 (35.1%)	<i>Cellulophaga lytica</i>	99 %	AB032512
OTU 2	Strain 46	JX454530	5 (5.2%)	<i>Aquimarina latercula</i>	98 %	AB681002
OTU 3	Strain 35	JX454522	18 (18.6 %)	<i>Flexibacter aurantiacus</i> subsp. <i>copepodarum</i>	99 %	AB078044
OTU 4	Strain 116	JX454523	6 (6.2 %)	<i>Flexibacter aurantiacus</i> subsp. <i>copepodarum</i>	98 %	AB078044
OTU 5	Strain 66	JX454528	2 (2.1%)	<i>Tenacibaculum ovolyticum</i>	97 %	AB681005
OTU 6	Strain 70	JX454527	2 (2.1%)	<i>Tenacibaculum soleae</i>	99 %	AM989479
OTU 7	Strain 103	JX454524	1 (1.0 %)	<i>Tenacibaculum discolor</i>	97 %	JQ231117
OTU 8	Strain 68	JX454521	19 (19.6 %)	<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	99 %	NR042631
OTU 9	Strain 4	JX454520	1 (1.0 %)	<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	96 %	NR042631
OTU 10	Strain 82	JX454526	1 (1.0 %)	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	98 %	NR044202
OTU 11	Strain 105	JX454525	8 (8.2 %)	<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	99 %	NR044202

OTU : Operational Taxonomic Unit.

"Closest relative species" in the table below means the closest species published (or accepted) in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) or validated in the Approved Lists of Bacterial Names.

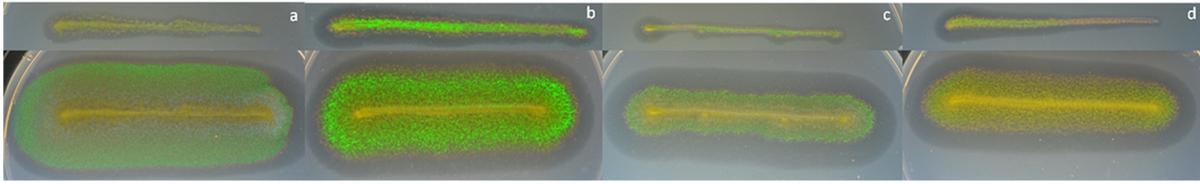


Fig. 3. Glitter-like iridescence appearance under direct illumination of different *C. lytica* affiliated isolates (OTU 1) after one day (up line) and four days (bottom line) of incubation at 20°C on CYT medium. Strains were isolated from (a) dry sand at Ronces les bains, (b) rhodophyta *Palmaria palmata* at Whales lighthouse, (c) phaeophyta *Fucus vesiculosus* at Ronces les bains, (d) chlorophyta *Ectocarpus siliculosus* at Chassiron lighthouse. Gliding motility can be identified as the spreading zone from the colony center. Agarolysis corresponds to the dark halo visible on colony edges.

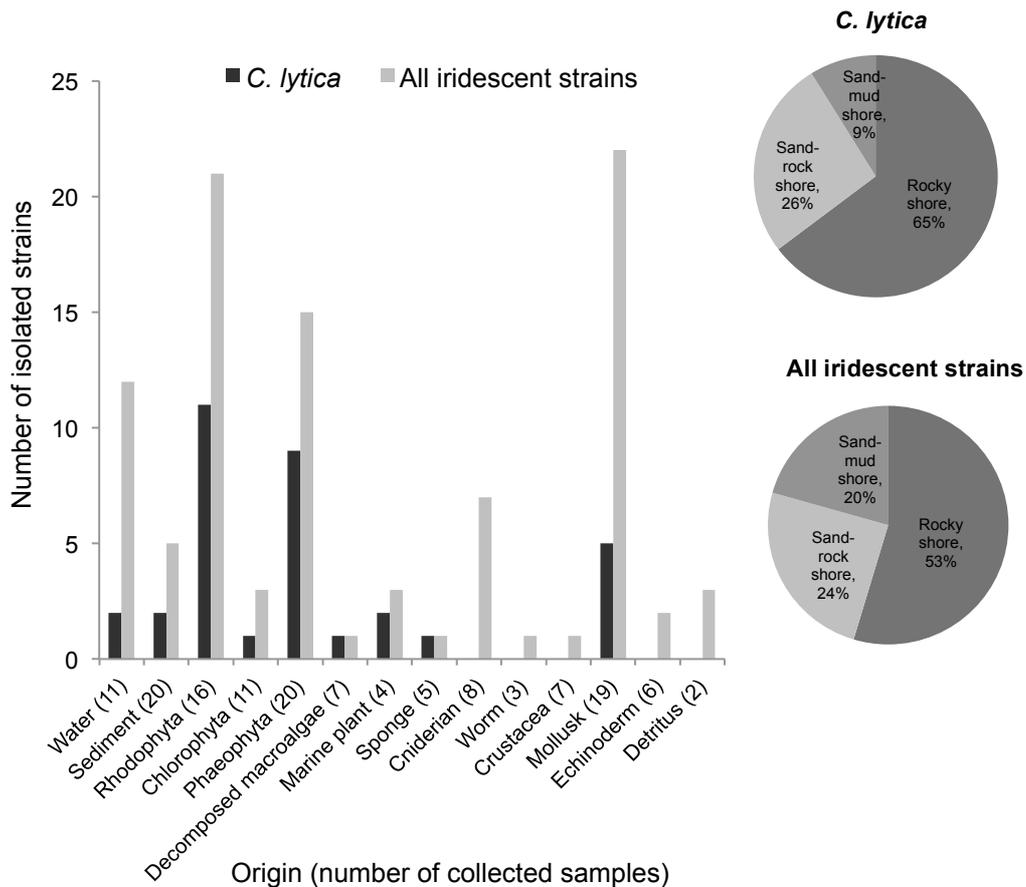


Fig. 4. Distribution of all isolated iridescent strains within the diverse biotopes and samples.

Genotypic diversity of other iridescent bacteria

While searching for *C. lytica* iridescent strains, we observed other colonies with a bright effect but with different types of iridescence (Fig. 2). A total of 97 strains (including *C. lytica* strains) were isolated and identified by sequencing of the of 16S rRNA gene (Table 2). Similarity values for the 16S rRNA gene sequences with previously reported species in databases are presented in Table 2. Overall, 11 different OTUs were found, 8 of them are affiliated to a known species. For 3 OTUs (5, 7 and 9), the isolated strains showed sequence similarities lower than 97% to previously reported species, suggesting novelty at the genus level. All isolates belonged to the phylum of *Bacteroidetes* and formed two clusters (Fig. 5). The *Tenacibaculum* isolates labeled OTU 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11 clustered with the genus *Tenacibaculum* exhibiting between 96 and 99% 16S rRNA sequence similarity (Table 2). In the other cluster, isolates belonging to the OTU 1 had 99% similarities with *Cellulophaga lytica* and isolates belonging to the OTU 2 had 98% similarities with *Aquimarina latercula* (Fig. 5). Phylogenetic analyses have confirmed the different taxonomic groups and that OTU 5, 7 and 9 could represent novel species.

Strains identified as *C. lytica* (OTU 1) were the most representative species with 35.1% (Table 2). Next, 19.6% of isolated strains were identified as *Tenacibaculum gallaicum* (OTU 8); 18.6% were identified as *Flexibacter aurantiacus subsp. copepodarum* (OTU 3); 8.2% were identified as *Tenacibaculum aiptasiae* (OTU 11); 6.2 % were affiliated to *Flexibacter aurantiacus subsp. copepodarum* (OTU 4); 5.2 % were affiliated to *Aquimarina latercula* (OTU 2). Strains affiliated to *Tenacibaculum ovolyticum* (OTU 5), *Tenacibaculum soleae* (OTU 6), *Tenacibaculum discolor* (OTU 7), *Tenacibaculum gallaicum* (OTU 9) and *Tenacibaculum aiptasiae* (OTU 10) have less than 2.1 % representatives.

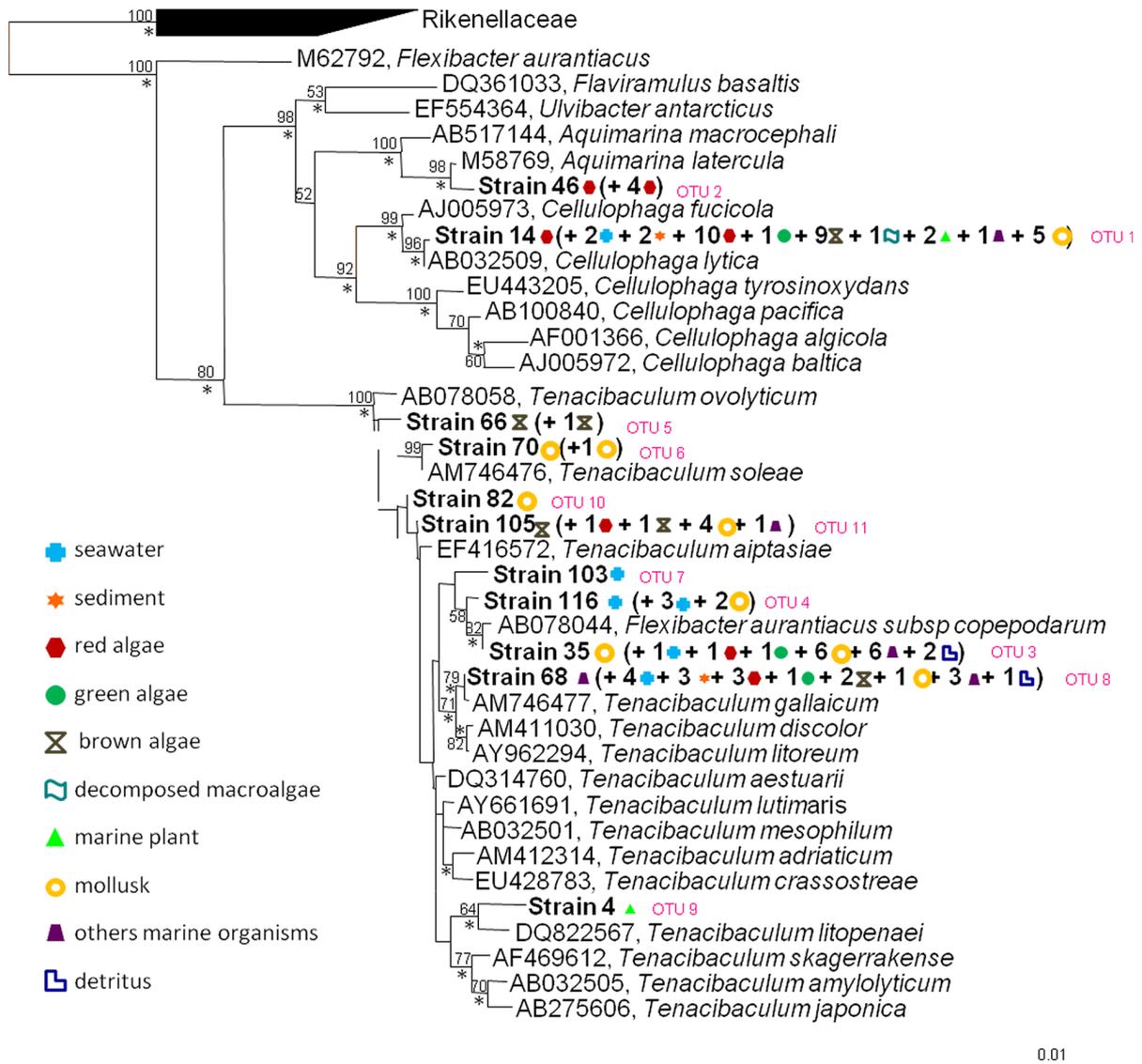


Fig. 5. Phylogenetic tree constructed 16S rDNA genes of isolates and related species of CFB group. The tree was built with the maximum likelihood method. Bar indicated 1% dissimilarity sequence. Selected sequences from the *Rikenellaceae* family of CFB bacteria were used to root the tree. Bootstrap percentages are obtained using 1000 replicates, and values >50% indicated at the nodes. * indicated branches that were also found using the neighbor-joining and the maximum parcimony methods

Phenotypic diversity of the others iridescent strains

Different iridescent colonies were visible on the original plates (Fig. 2). Identified strains showed diversity in iridescence coloration and intensity when cultivated by the streaking method. Green or red iridescence was often observed. The iridescence appearance could be different even in the same species (Fig. 6). *Tenacibaculum* strains expressed bright angle-dependent green iridescence, except *T. ovolyticum* (OTU 5), *T. discolor* (OTU 7) and a few strains of *T. gallaicum* (OTU 8 and 9), which expressed a red iridescence. The red iridescence of *T. ovolyticum* (OTU 5) could be observed on colony edges only after three days. Strains affiliated to *Flexibacter aurantiacus subsp. copepodarum* (OTU 3 and 4) expressed a particular iridescence resembling to holograms with multicolor effects observed by eyes but difficult to photograph (Fig. 6 c,d). Strains affiliated to *Aquimarina latercula* (OTU 2) were red-pigmented with red iridescence. Most isolated strains of the collection were motile by gliding, especially the bright iridescent ecotypes.

Source of isolation of iridescent bacteria

Iridescent bacteria were isolated from all types of biotope and samples except from the mudflat environment in which no iridescent strain was isolated. As for *C. lytica*, the rocky shore ecosystem contained most iridescent bacteria (Fig. 4). Efficient sources for the isolation of iridescent bacteria were mollusks, Rhodophyta, Phaeophyta, seawater and cnidarians. Rhodophyta species possessing at their surface iridescent bacteria were for example *Palmaria palmata*, *Chondrus crispus* or *Corallina officinalis*. Mollusk samples and in particular gastropods could contain a wide diversity of iridescent species within the same sample. For example, six different species (OTU 1, 3, 4, 6, 10, 11) within three genera were isolated from the same decomposed oyster shell. Origins associated with the isolated species are informed in the phylogenetic tree (Fig. 5). All isolates identified as *Aquimarina latercula* (OTU 2) were from the surface of red macroalgae. The strains affiliated to *T. ovolyticum* (OTU 5) were isolated from the same brown macroalgae *Fucus vesiculosus*. The 2 isolates affiliated to *T. soleae* (OTU 6) were from the surface of different gastropods (winkle).

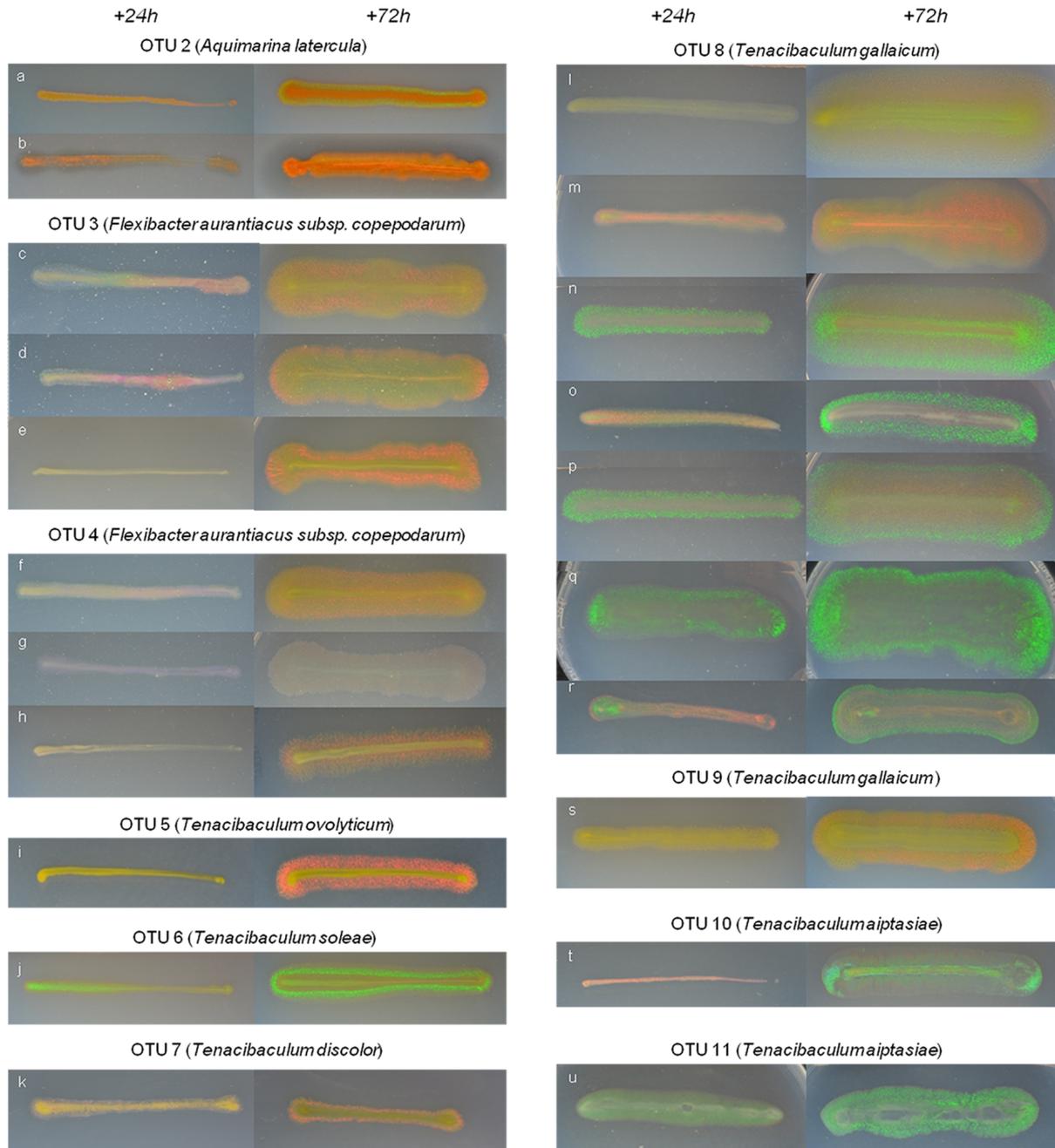


Fig. 6. Iridescence of the isolated marine bacteria after 1 day (left) and 3 days (right) of culture at 20°C on CYT medium. Both OTU 2 (a,b) were isolated from *Chondrus crispus* red macroalgae. OTU 3 were isolated from (c) an unknown red macroalgae, (d) an unknown hydroid and (e) a seastar *Asterina gibosa*. OTU 4 were from (f) a decomposed oyster, (g) seawater sample and (h) a limpet. OTU 5, 6 and 7 were respectively isolated from *Fucus vesiculosus* (i), a wrinkle (j), and from seawater (k). OTU 8 were isolated from (l) an unidentified red macroalgae, (m) an unattached laminaria, (n) sand, (o) *Corallina officinalis* red macroalgae, (p) worms sand formation, (q) seawater and (r) crab. OTU 9, 10 and 11 were respectively isolated from a *Zostera marina* (s), a decomposed oyster (t) and an unattached *Saccharina sp.* brown macroalgae.

Discussion

Bacterial iridescence has been ambiguously described or ignored in the literature. We have recently isolated a marine bacterium intensively iridescent, *C. lytica* CECT 8139, in a rocky shore of the Charente-Maritime [23]. This discovery raised the question whether iridescent marine bacteria are widely distributed in coastal biotopes.

In this study, iridescent strains identified as *C. lytica* were isolated for a second time in the Charente Maritime coast. Strains of *C. lytica* were the most represented iridescent isolates in the collection but diverse bacterial strains were also isolated. Iridescent colonies were affiliated to 10 different species belonging to 4 different genera. All isolated strains belong to the *Bacteroidetes* phylum. Three groups of isolates (OTU 5, 7 and 9) had 16S rRNA sequence similarity equal or lower to 97%. Therefore, we found putative genera that were never detected before through both cultivation and culture independent studies and that may have interest for future research. However, resolution of 16S rRNA sequence analysis is insufficient to distinguish closely related organisms [7, 44]. More fine phylogenetic analyses on the DNA gyrase B subunit gene or the ITS region and the determination of the DNA-DNA hybridization values, should confirm the novelty [44, 47].

This study permitted to illustrate and describe precisely colonies' coloration effects on agar plates. Different iridescence effects were observed among *C. lytica* isolates. This data confirms that *C. lytica* strains can be differentiated phenotypically regarding iridescence. Different iridescence appearances were also evidenced in the other *Bacteroidetes* isolated. For a few species, vague or ambiguous descriptions of the phenomenon were found in the literature but the occurrence of a true iridescent trait remained unclear. The red pigmentation was used to differentiate the *Aquimarina* sp. but any information described iridescence [33]. To our knowledge, the only description of iridescence was given for *Tenacibaculum discolor* isolated from a sole surface: “On marine agar 2216 (Difco), colonies also appear bright yellow from the front, but appear bright green when viewed at an angle of 30–45°C” [37]. Mentions of optical effects were available for other *Tenacibaculum* strains: greenish glistening for *T. litoreum* [6] and *T. aestuarii* [22] and glistening for *T. lutimaris* [54]. No description was given for the other species [19, 32, 37, 38, 50]. The iridescence phenomenon in marine bacteria, and more generally in prokaryotes, was generally omitted and it remains

therefore still poorly known from a taxonomic point of view. Our data suggest that iridescence is potentially widespread and represents an interesting criterion for new microorganisms.

Gliding motility was observed for most iridescent strains isolated. Moreover, fast gliding (fast spreading edges) was typical of intensely iridescent colonies. A strong link between gliding motility and iridescence may therefore exist in several members of the *Bacteroidetes* phylum. Gliding motility may be involved in the establishment, in time and space, of the necessary periodic structures responsible for the iridescent appearance. Such structures are still uncharacterized but they are under investigation by electron microscopy in our laboratory. Since mostly green and red iridescences were observed in the isolated strains, similar periodic structures, with minor variations of dimensions and periodicity, are likely inferred to be responsible for the iridescent appearances observed.

Flavobacteriales bacteria are common in the marine environment [3]. We found that iridescent strains were particularly abundant on rocky shore (53%). This biotope comprises a higher biodiversity of organisms than muddy environment, which could explain the presence of numerous ecotypes showing different phenotypes and genotypes. The presence of iridescent bacteria in rocky shore ecosystem that combined stressful conditions from solar exposure, desiccation, and great fluctuations in salinity, may give preliminary indications on the possible biological roles of the iridescence (thermoregulation, UV protection, light filtering and desiccation prevention [9, 30, 42]). Moreover, we recently showed that iridescence of *C. lytica* CECT 8139 was conserved under environmental stress conditions such as low temperature and high salinity [24]. Interestingly, the isolated species were in majority in association with the marine flora (macroalgae) and fauna (mollusks, cnidarians). For several macroorganisms, recruitment of an epibiontal community with protection activities has been proved [2, 15, 18, 35]. Iridescence may therefore provide selective advantages for the bacterial population itself and/or the hosts. Interestingly, several strains and especially strains of *C. lytica* were isolated from the surfaces of red macroalgae. For the isolates identified as *A. latercula*, origin was only the surface of Rhodophytae.. This species was red pigmented with red glitter-like iridescence. These observations might be of a major importance since a few red macroalgae have been previously described to exhibit iridescence. Indeed, *Chondrus crispus* and *Irideae* spp. possess iridescent multilayered fronds [8, 13].

Moreover, iridescence of *Irideae* has been supposed to prevent dessication [13]. As a conclusion, iridescent marine *Bacteroidetes* might play important roles in rocky shore ecosystems as epibionts. This hypothesis has to be examined in the future.

References

- [1] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- [2] Armstrong, E., Yan, L., Boyd, K.G., Wright, P.C., Burgess, J.G. (2001) The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia* 461, 37–40.
- [3] Bernardet, J.-F., Nakagawa, Y. (2006) An introduction to the family *Flavobacteriaceae*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Third edition, Volume 7, Springer, New York, pp. 455–480.
- [4] Bowman, J.P. (2006) The marine clade of the family *Flavobacteriaceae*: the genera *Aequorivita*, *Arenibacter*, *Cellulophaga*, *Croceibacter*, *Formosa*, *Gelidibacter*, *Gillisia*, *Maribacter*, *Mesonina*, *Muricauda*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychroserpens*, *Robiginitalea*, *Salegentibacter*, *Tenacibaculum*, *Ulvibacter*, *Vitellibacter* and *Zobellia*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Third edition, Volume 7, Springer, New York, pp. 677–694.
- [5] Bowman, J.P. (2011) Genus IX. *Cellulophaga* Johansen, Nielsen and Sjøholm 1999, 1238^{VP}. In: Krieg, N.R., Staley, J.T., Brown, D.R., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W., Whitman, W.B. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. Second edition, Volume 4, Springer, New York Dordrecht Heidelberg London, pp. 176–180.
- [6] Choi, D.H., Kim, Y.-G., Hwang, C.Y., Yi, H., Chun, J., Cho, B.C. (2006) *Tenacibaculum litoreum* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 56, 635–40.
- [7] Clayton, R.A., Sutton, G., Hinkle, P.S., Bult, C., Fields, C. (1995) Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(3), 595–9.
- [8] Craigie, J.S., Correa, J.A., Gordon, M.E. (1992) Cuticules from *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 28(6), 777–786.
- [9] Doucet, S.M., Meadows, M.G. (2009) Iridescence: a functional perspective. *J. R. Soc. Interface* 6(Suppl. 2), S115–S132.
- [10] Doucet, S.M., Shawkey, M.D., Hill, G.E., Montgomerie, R. (2006) Iridescent plumage in satin bowerbirds: structure, mechanisms and nanostructural predictors of individual variation in color. *J. Exp. Biol.* 209, 380–390.

- [11] Felsenstein, J. (2004) *Inferring Phylogenies*, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- [12] Fox, D.L. (1976) *Animal biochromes and structural colors: physical, chemical, distributional & physiological features of colored bodies in the animal world*. Second edition. University of California Press, Berkeley, CA.
- [13] Gerwick, W.H., Lang, N.J. (1977) Structural, chemical and ecological studies on iridescence in *Iridaea* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 13, 121–127.
- [14] Ghiradella, H. (1991) Light and color on the wing: structural colors in butterflies and moths. *Appl. Optics* 30, 3492–3500.
- [15] Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., Imhoff, J.F. (2010) Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 409, 267–300.
- [16] Greenewalt, C.H., Brandt, W., Friel, D.D. (1960) The iridescent colors of hummingbird feathers. *Proc. Am. Philos. Soc.* 104: 249–253.
- [17] Guindon, S., Gascuel, O. (2003) A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704
- [18] Harder, T. (2009) Marine epibiosis: concepts, ecological consequences and host defence. In: Flemming, H.C., Murthy, P.S., Venkatesan, R., Cooksey, K. (Eds.), *Marine and industrial bio-fouling*. Springer, Berlin, pp. 219–231.
- [19] Hansen, G.H., Bergh, O., Michaelsen, J., Knappskog, D. (1992) *Flexibacter ovolyticus* sp. nov., a pathogen of eggs and larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42(3), 451–8.
- [20] Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Fenical, W. (1996) High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Mar. Biol.* 126, 1–7.
- [21] Johansen, J.E., Nielsen, P., Sjøholm, C. (1999) Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 49, 1231–1240.
- [22] Jung, S.Y., Oh, T.K., Yoon, J.H. (2006) *Tenacibaculum aestuarii* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 56, 1577–1581.
- [23] Kientz, B., Vukusic, P., Luke, S., Rosenfeld, E. (2012a) Iridescence of a marine bacterium and classification of prokaryotic structural colors. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2092–2099
- [24] Kientz, B., Marié, P., Rosenfeld, E. (2012b) Effect of abiotic factors on the unique glitter-like iridescence of *Cellulophaga lytica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 333 (2), 101–8.
- [25] Land, M. (1972) The physics and biology of animal reflectors. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24, 75–106.
- [26] Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115–175.

- [27] Lewin, R.A., Lounsbury, D.M. (1969) Isolation, cultivation and characterization of Flexibacteria. *J. Gen. Microbiol.* 58, 145–170.
- [28] Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R. *et al.* (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 32, 1363–1371
- [29] Lythgoe, J.N., Shand, J. (1989) The structural basis for iridescent color changes in dermal and corneal iridophores in fish. *J. Exp. Biol.* 141, 313–325.
- [30] Meadows, M.G., Butler, M.W., Morehouse, N.I., Taylor, L.A., Toomey, M.B., McGraw, K.J., Rutowski, R.L. (2009) Iridescence: views from many angles. *J. R. Soc. Interface.* 6(Suppl. 2), S107–S113.
- [31] Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- [32] Nakagawa, Y., Sakane, T., Suzuki, M., Hatano, K. (2002) Phylogenetic structure of the genera *Flexibacter*, *Flexithrix*, and *Microscilla* deduced from 16S rRNA sequence analysis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48(3), 155–165.
- [33] Nedashkovskaya, O.I., Vancanneyt, M., Christiaens, L., Kalinovskaya, N.I., Mikhailov, V.V., Swings, J. (2006) *Aquimarina intermedia* sp. nov., reclassification of *Stanierella latercula* (Lewin 1969) as *Aquimarina latercula* comb. nov. and *Gaetbulimicrobium brevivitae* (Yoon *et al.* 2006) as *Aquimarina brevivitae* comb. nov. and emended description of the genus *Aquimarina*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 56(Pt 9), 2037–41.
- [34] Noyes, J., Sumper, M., Vukusic, P. (2008) Light manipulation in a marine diatom. *J. Mater. Res.* 23, 3229–3232.
- [35] Patel, P., Callow, M.E., Joint, I., Callow, J.A. (2003) Specificity in the settlement-modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*. *Environ. Microbiol.* 5 (5), 338–349.
- [36] Pati, A., Abt, B., Teshima, H. *et al.* (2011) Complete genome sequence of *Cellulophaga lytica* type strain (LIM-21^T). *Stand. Genomic Sci.* 4, 221–232.
- [37] Piñeiro-Vidal, M., Riaza, A., Santos, Y. (2008a) *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 58(Pt 1), 21–25.
- [38] Piñeiro-Vidal, M., Carballas, C.G., Gómez-Barreiro, O., Riaza, A., Santos, Y. (2008b) *Tenacibaculum soleae* sp. nov., isolated from diseased sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 58(Pt 4), 881–885.
- [39] Prum, R.O., Torres, R. (2003) Structural coloration of avian skin: convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. *J. Exp. Biol.* 206, 2409–2429.
- [40] Reichenbach, H. (1992) The Order Cytophagales. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Eds.), *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, Second edition. Springer-Verlag, New York, pp. 3631–3675.

- [41] Schulz, B., Guske, S., Dammann, U., Boyle, C. (1998) Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* 25, 213–227.
- [42] Seago, A.E., Brady, P., Vigneron, J.-P., Schultz, T.D. (2009) Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural color mechanisms in beetles (Coleoptera). *J. R. Soc. Interface* 6(Suppl 2), S165–S184.
- [43] Skerratt, J.H., Bowman, J.P., Hallegraeff, G., James, S., Nichols, P.D. (2002) Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 244, 1–15.
- [44] Stackebrandt, E. (2006) Molecular identification, systematics, and population structures of prokaryotes. Erko stackebrandt edition, Springer-Verlag Berlin.
- [45] Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(4), 846–849.
- [46] Stafslie, S., Daniels, J., Mayo, B., Christianson, D., Chisholm, B., Ekin, A., Webster, D., Swain, G. (2007) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings IV. A high-throughput bacterial biofilm retention and retraction assay for screening fouling-release performance of coatings. *Biofouling* 23, 45–54.
- [47] Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., Yamamoto, S. (2001) Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(Pt 5), 1639–1652.
- [48] Vukusic, P., Wootton, R.J., Sambles, J.R. (2004) Remarkable iridescence in the hindwings of the damselfly *Neurobasis chinensis chinensis* (Linnaeus) (Zygoptera: Calopterygidae). *Proc. R. Soc. Lond. B Biol.* 271, 595–601.
- [49] Vukusic, P., Sambles, J.R., Lawrence, C.R., Wootton, R.J. (2001) Structural color: now you see it-now you don't. *Nature* 410, 36.
- [50] Wang, J.-T., Chou, Y.-J., Chou, J.-H., Chen, C.A., Chen, W.-M. (2008) *Tenacibaculum aiptasiae* sp. nov., isolated from a sea anemone *Aiptasia pulchella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(Pt 4), 761-766.
- [51] Welch, V., Vigneron, J.-P., Lousse, V., Parker, A. (2006) Optical properties of the iridescent organ of the comb-jellyfish *Beroë cucumis* (Ctenophora). *Phys. Rev. E* 73, 0419161–0419167.
- [52] Williams, R.C., Smith, K.M. (1958) The polyhedral form of the Tipula iridescent virus. *Biochim. Biophys. Acta* 28, 464–469.
- [53] Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., Ludwig, W., Glöckner, F.O., Rosselló-Móra, R. (2008) The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 241–250
- [54] Yoon, J.-H., Kang, S.-J., Oh, T.-K. (2005) *Tenacibaculum lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat in the Yellow Sea, Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(Pt 2), 793-798.

II. Principaux résultats et discussion

L'objectif premier de l'étude consiste au ré-isolément de *C. lytica* iridescentes dans le milieu marin. Dans un nombre important de boîtes mères, nous avons observé des colonies vertes avec des bords rouges typiques de *C. lytica*, mais également des colonies rouges, vertes ou violettes iridescentes. Dans cette étude, nous avons donc non seulement ré-isolé des *C. lytica* iridescentes mais également identifié d'autres souches marines présentant une iridescence. Ce phénomène est très présent car exprimé par différentes espèces. Ces souches sont par ailleurs faciles à isoler et issues de divers biotopes et échantillons. Malgré cela, le phénomène a souvent été omis dans de nombreuses descriptions antérieures. Cette étude démontre que l'observation de l'iridescence par un dispositif spécifique et l'utilisation d'un milieu de culture adapté sont déterminantes. La méthode d'ensemencement *in situ* s'est révélée efficace pour l'isolement de colonies iridescentes. Celles-ci sont visibles après trois jours de culture à 20°C sur du CYT. Les populations bactériennes ne sont pas identiques dans les échantillons d'eau de mer et dans les organismes vivants. Cette méthode se montre donc appropriée à l'isolement d'épibiontes.

Nous avons isolé un total de 97 souches iridescentes (Annexe 3, page 268). La comparaison des séquences indique leurs affiliations à 4 genres bactériens : *Cellulophaga*, *Tenacibaculum*, *Aquimarina* toutes issues du phylum *Bacteroidetes*. La systématique de ces souches est détaillée dans l'annexe 2 (page 267). Les bactéries avaient des affiliations proches de 8 espèces :

- *Cellulophaga lytica*
- *Aquimarina latercula*
- *Tenacibaculum ovolyticum*
- *Tenacibaculum discolor*
- *Tenacibaculum soleae*
- *Tenacibaculum aiptasiae*
- *Tenacibaculum gallaicum*
- « *Flexibacter aurantiacus* subsp. *copepodarum* »

Pour ces trois dernières, deux pourcentages différents d'homologie de séquence sont trouvés, ainsi 11 groupes sont créés, nommés OTU (Operational Taxonomic Unit). Certaines

souches ont des pourcentages faibles d'homologie avec les séquences connues (97% et 96%) suggérant l'isolement de nouvelles espèces. Parmi les souches identifiées, il est important de préciser que certaines pourraient changer de nom d'espèce après une analyse plus précise de leur matériel génétique. Il convient donc de les désigner seulement par leur nom de genre et leur code. En effet, nous avons étudié les séquences de l'ARNr 16S qui, dans certains cas, ne permettent pas d'identifier précisément l'espèce car les séquences sont très proches. Ceci est notamment vrai pour les espèces du genre *Tenacibaculum* possédant des homologies de l'ARNr 16S de 99%. Afin de préciser l'identification des souches, l'étude pourrait être complétée par le séquençage de l'ARNr 23S ou l'ITS mais surtout par l'hybridation ADN-ADN. Les membres de l'espèce « *Flexibacter aurantiacus subsp. copepodarum* » appartiendraient au genre *Tenacibaculum* (Bernardet et al, 1996).

Des iridescences vertes, rouges et certaines multicolores ont été observées. Les couleurs et intensités d'iridescence varient selon les espèces et également au sein d'une même espèce. *Aquimarina latercula* présente des colonies rouges pigmentées et rouges iridescentes. Les bactéries du genre *Tenacibaculum* expriment selon les souches une iridescence verte ou rouge, dont une forte intensité est restreinte à un angle étroit d'illumination. L'iridescence de « *Flexibacter aurantiacus subsp. copepodarum* » est très particulière, l'effet est semblable à un hologramme car diverses couleurs avec des intensités variables se distinguent. L'aspect pailleté des colonies n'est pas majoritaire et il serait judicieux de donner des appellations différentes à ces iridescences.

Les espèces les plus représentées dans cette étude correspondent à *C. lytica* (35 %), *Tenacibaculum gallaicum* (20 %) et « *Flexibacter aurantiacus subsp. copepodarum* » (19 %). Dans la littérature, seule *Tenacibaculum discolor* possède une description laissant soupçonner un effet optique : « On marine agar 2216 (Difco), colonies also appear bright yellow from the front, but appear bright green when viewed at an angle of 30 - 45°C » (Piñeiro-Vidal et al, 2008). Toutefois, le terme « iridescent » n'est pas employé. Aucune description n'est retrouvée pour les autres espèces. Néanmoins, des *Tenacibaculum spp.* non isolées dans cette étude sont mentionnées « glistening » et sont soupçonnées d'être iridescentes : *Tenacibaculum litoreum* (Choi et al, 2006), *Tenacibaculum aestuarii* (Jung et al, 2006) et *Tenacibaculum lutimaris* (Yoon et al, 2005). Dans ces travaux, les iridescences bactériennes sont encore une fois clarifiées, détaillées et photographiées de façon inédite. Il semble

indispensable d'illustrer les colonies lorsque l'on décrit une iridescence, ce qui n'est pas le cas à l'heure actuelle dans la littérature.

Une majorité des souches présentent une motilité par « gliding » et certaines sont agarolytiques. Les colonies les plus intenses sont très motiles. Pour certaines souches telle *T. ovolyticum*, l'iridescence est seulement visible en périphérie de colonie, après 72h d'incubation, correspondant à la zone de « gliding ». Le lien entre l'iridescence et la motilité est une fois de plus confirmé dans ce chapitre.

L'un des objectifs était d'identifier des niches écologiques spécifiques aux souches iridescentes. Leur distribution indique quelles sont particulièrement présentes sur les estrans rocheux, probablement en raison d'une biodiversité élevée dans ce biotope. A l'inverse, les milieux contenant de la vase sont très pauvres en souches iridescentes. Des origines similaires sont observées : macroalgues brunes et surtout rouges, mollusques, cnidaires et eau de mer. Les *Flavobacteriales* sont décrites comme très présentes dans le milieu marin et notamment dans les associations avec des macroalgues rouges et brunes (Kirchman, 2002 ; Beleneva & Zhukova, 2006 ; Longford et al, 2007). Dans le cas des échantillons d'eau, on peut imaginer des associations avec le plancton. En effet, les *Flavobacteriales* ont souvent été retrouvées associées notamment au phytoplancton (Bolinches et al, 1988 ; Glöckner et al, 1999 ; Cottrell & Kirchman, 1999 ; Schäfer et al, 2002 ; Kolmonen et al, 2004 ; Nicolas et al, 2004 ; Fandino et al, 2005 ; Grossart et al, 2005 ; Murray & Grzymiski, 2007). Nous supposons alors que les rôles de l'iridescence pourraient concorder avec un mode de vie associé.

L'association avec les macroalgues rouges est particulièrement intéressante car des Rhodophytes ont été décrites comme étant elles-mêmes iridescentes (Dangeard, 1941). Les frondes des algues *Iridea spp.* et *Chondrus crispus* expriment ce phénomène grâce à des structures en multicouches (Gerwick & Lang, 1977 ; Pedersén et al, 1980 ; Craigie & Gordon, 1992). D'autres types de structures iridescentes ont été précédemment mentionnés chez des macroalgues. L'iridescence serait créée par des inclusions granuleuses ou « amas » dans les cellules (Dangeard, 1941 ; Pellegrini & Pelligrini, 1982). De façon intéressante, les souches d'*Aquimarina latercula*, exclusivement isolées de macroalgues rouges, ont des colonies rouges pigmentées et rouges iridescentes. Nous avons dans l'idée que les éléments iridescents pourraient être des bactéries iridescentes endobiontes ; ce qui par conséquent prouverait l'iridescence *in situ* de bactéries. Ces associations sont appelées endophytoses lorsque l'hôte

est végétal et ont été rapportées chez des plantes (Sturz et al, 2000 ; Strobel & Daisy, 2003) et des macroalgues (Colombo, 1978 ; Hollants et al, 2011a ; 2011b ; 2012). Des travaux de thèse sur les bactéries endophytes de l'algue verte *Bryopsis sp.* ont attesté la présence de bactéries dans le cytoplasme de cellules algales, près des chloroplastes (Hollants et al, 2011b). L'analyse phylogénétique a montré que parmi celles-ci des *Flavobacteriaceae* étaient les seuls endosymbiontes obligatoires de cette algue. De façon surprenante, des images de *Bryopsis sp.* recherchées sur internet (site [Algeabase](#)) illustrent des frondes iridescentes bleues. Ces coïncidences troublantes pourraient s'accorder sur une iridescence possible de *Flavobacteriaceae* endobiontes. Dans notre étude, les macroalgues vertes n'ont pas permis l'isolement de nombreuses souches iridescentes. Ceci peut être expliqué par le protocole d'ensemencement non adapté à l'isolement d'endobiontes et également par le fait que les Chlorophytes collectées sur la côte de Charente Maritime étaient différentes. En effet, aucune *Bryopsis sp.* n'a été récoltée. *C. fucicola*, qui est iridescente, a été isolée d'une algue verte *Ulva australis* (Johansen et al, 1999 ; Rao et al, 2007). La communauté endophyte de *Bryopsis sp.* a été décrite comme stable, l'algue assurant potentiellement le maintien et l'attraction de souches particulière (Hollants, 2012). Une fonction de tolérance à la chaleur a même été avancée pour l'association avec les *Flavobacteriaceae* car celle-ci est restreinte à des climats chauds. Cette fonction pourrait potentiellement être liée à l'iridescence bactérienne car la thermorégulation fait partie des rôles non communicatifs de l'iridescence décrits chez des organismes supérieurs (Doucet & Meadows, 2009). Il est de plus admis que certaines macroalgues maintiennent et attirent une flore bactérienne spécifique pour certaines activités (Davis et al, 1989 ; Kobayashi & Ishibashi, 1993 ; Chelossi et al, 2004 ; Peynesyan et al, 2010). Ce recrutement de bactéries épiphytes ou endophytes est bien connu (Goecke et al, 2010 ; Armstrong et al, 2001 ; Harder, 2009). Certaines *Cellulophaga spp.* pourraient potentiellement être recrutées car elles possèdent une activité d'aide à l'adhésion de zoospores d'Entéromorphe et de larves du polychète *Hydroides elegans*, respectivement pour *C. baltica* et *C. lytica* (Huang et al, 2003 ; Patel et al, 2003).

III. Perspectives de l'étude

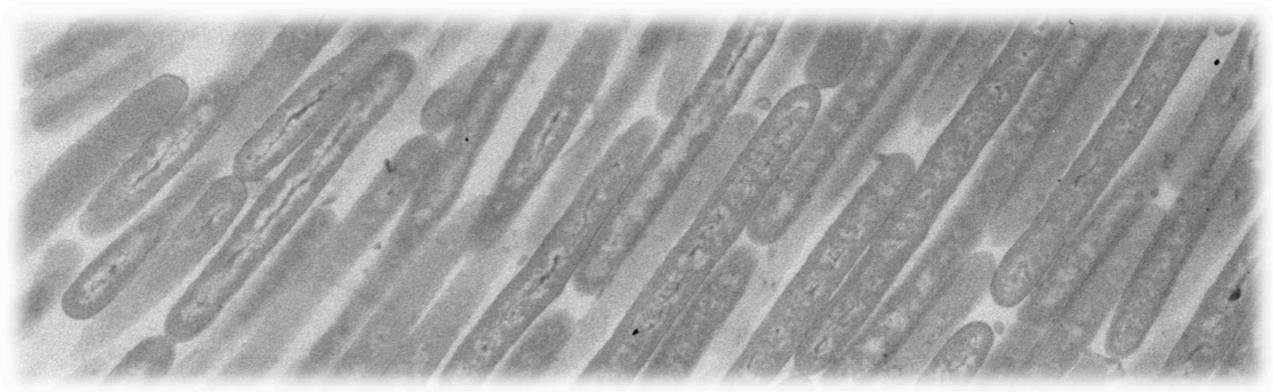
Parmi les souches étudiées dans le chapitre précédent (Chapitre 3) telle *M. dokdonensis* ou d'autre *Cellulophaga sp.*, aucune n'a été ré-isolée dans cette étude. Nous avons néanmoins pu isoler plusieurs fois une même espèce dans différents sites de collecte de la côte Charentaise Maritime. Nous supposons que certaines souches sont spécifiques à une région et peut être à un climat, comme il est décrit dans une étude (Witman et al, 2004). Nous avons vérifié cette hypothèse lors d'un prélèvement unique dans une autre région de France. Une dizaine d'échantillonsensemencés *in situ* à la plage de la Madragues, dans la ville de St Cyr sur mer (Var) ont permis l'isolement de 7 souches iridescentes. De couleurs rouges, elles appartiennent au genre *Tenacibaculum* mais certaines possèdent des homologies de séquence différentes des souches issues de la côte Atlantique. Afin de préciser ces différences taxonomiques, une étude complémentaire dans des régions différentes pourrait être menée. Dans l'objectif de préciser les bases génétiques de l'iridescence, il serait également intéressant de comparer les génomes des espèces iridescentes.

Nous supposons que les souches iridescentes sont capables de vivre en endosymbiose et sont donc iridescente *in situ*. Des symbioses bactéries-organismes supérieurs ont déjà été décrites comme responsables de coloration, c'est le cas par exemple dans certains processus de bioluminescence (Haddock et al, 2010). De la même manière, il serait possible que des organismes supérieurs expriment une iridescence grâce à une association avec des bactéries iridescentes. Dans cette démarche, il serait intéressant d'isoler des endobiontes en adaptant le protocole d'ensemencement par une étape de broyage des tissus de macroorganismes afin d'en extraire les bactéries. Des analyses permettant de déterminer l'iridescence *in situ* seraient également déterminantes pour confirmer nos hypothèses. Des techniques et protocoles spécifiques sont à définir à l'avenir pour répondre à ces interrogations et ne pourront donc pas être abordés dans cette thèse. Dans ces expériences, une analyse des souches associées à des macroorganismes par microscopie à fluorescence (FISH) pourrait être envisagée.

Les colorations sont différentes selon les souches mais restent majoritairement vertes et rouges. Nous soupçonnons alors un type de structures commun. Le chapitre suivant s'emploie à élucider les structures responsables de l'iridescence de *C. lytica* CECT 8139.

Chapitre 5.

CARACTERISATION DES
STRUCTURES RESPONSABLES DE
L'IRIDESCENCE DE *C. lytica*



I. Démarche scientifique

L'iridescence « glitter-like » est caractérisée par des centres brillants petits, intenses et colorés, semblables à des paillettes. Cette apparence diffère des autres iridescences bactériennes mais également des couleurs structurales rencontrées chez les organismes supérieurs. Par exemple, les structures iridescentes des ailes du papillon *Morpho* induisent une iridescence bleue uniforme sur la surface. Par comparaison, l'effet pailleté des colonies de *C. lytica* CECT 8139 est particulier. Les structures impliquées dans l'iridescence « glitter-like » devraient donc être spécifiques. Aucune structure responsable de l'iridescence de procaryote n'a été identifiée. L'objectif principal de ce chapitre correspond donc à l'élucidation des structures iridescentes des colonies de *C. lytica* CECT 8139.

Les variations de couleur et de luminance d'une paillette sont difficiles à quantifier à l'œil nu. Dans la première étude de ce chapitre nous avons souhaité préciser les changements de colorations à l'aide d'outils statistiques et mathématiques d'analyse d'images. Les images employées correspondaient à celles prises avec le microscope Keyence équipé de l'anneau de diffusion. Dans ces analyses décrites dans le Chapitre 1, l'apparition et la disparition des paillettes ont été observées en fonction de l'angle d'illumination. Ces variations sont fondamentales pour la caractérisation des couleurs structurales. Nous avons étudié dans cette nouvelle analyse, le changement de couleurs angle-dépendant, mais également, le recouvrement des paillettes dans la colonie. En effet, ces données permettront d'évaluer si les structures iridescentes sont réparties de façon homogène dans la colonie afin d'attester la présence statistique de ces structures lors des coupes de colonies réalisées pour les analyses suivantes en MET.

Lors d'une deuxième analyse d'image, nous avons souhaité déterminer les tailles des centres iridescents (paillettes) afin d'identifier les dimensions associées aux structures. Le programme utilisé estime la surface d'une « paillette » (centre brillant) qui correspond à une couleur plus forte en luminance. Ces analyses ont été réalisées sur les images en microscopie Keyence à plusieurs agrandissements.

Nous avons ensuite élucidé les structures responsables de l'iridescence de *C. lytica* CECT 8139. Des essais de microscopie confocale ont tout d'abord été réalisés afin d'étudier la structuration spatiale interne des colonies. Cependant, la motilité rapide des cellules de *C.*

lytica CECT 8139 nous a empêché d'exploiter les possibilités de cette technique. Nous avons donc choisi d'utiliser la microscopie électronique à transmission (MET) pour explorer la périodicité au sein du biofilm. Cette technique permet d'observer les structures internes des colonies en réalisant des coupes de celles-ci. Les limites de la MET sont les étapes de préparation des échantillons potentiellement très invasives et déshydratantes. Des bains de solvants sont nécessaires et déstructurent les colonies qui possèdent une consistance muqueuse, fragile et hydratée. Dans notre étude, il était primordial de conserver le biofilm à l'état initial. Dans cet objectif, une méthode a été mise au point, cette dernière consiste à former une bulle d'agar protectrice autour de l'échantillon. Plusieurs conditions d'iridescence ont été analysées : *C. lytica* CECT 8139 sur le milieu CYT, MA et LN. Une culture non-iridescente sur milieu sNA servait de condition contrôle. A celle-ci s'ajoutait la condition contrôle des colonies non-iridescentes de *C. lytica* CIP 103822 sur CYT. La taille des cellules a également été estimée par des colorations de Gram.

Une analyse statistique des images de MET a ensuite été réalisée afin d'extraire les structures périodiques. Dans le but de confirmer les propriétés optiques de la structure extraite, une modélisation a été effectuée avec le logiciel Comsol. Le spectre de diffraction théorique qui en résulte a été comparé avec celui obtenu de façon analytique en microspectrophotométrie (Chapitre 1). Ces analyses sont en cours de finalisation, seuls des résultats préliminaires de modélisation sont intégrés dans ce chapitre. L'article est en cours d'écriture et devrait être soumis prochainement.

Article 5.

Iridescent structures of a marine bacterium

Cellulophaga lytica

En écriture

Iridescent structures of a marine bacterium

Cellulophaga lytica

Betty Kientz¹, Stephen Luke^{3*}, Peter Vukusic^{3*}, Renaud Péteri^{2*}, Tristan Renault^{4*}, Cyrille Beaudry², David Simon² and Eric Rosenfeld¹

¹UMR 7266 CNRS-ULR Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés, Université de La Rochelle, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France

²Laboratoire Mathématiques, Image et Applications EA 3165, Université de La Rochelle, France.

³School of Physics, University of Exeter, Exeter EX4 4QL, United Kingdom

⁴Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer, Laboratoire de Génétique et de Pathologie, La Tremblade, France.

*Contributed equally to this work

Abstract

We recently isolated a marine bacterium, *Cellulophaga lytica* CECT 8139, intensely iridescent. The remarkable “glitter-like” iridescence of *C. lytica*'s colonies, observed under epi-illumination or natural light exposure, was found to strongly differ from the other bacterial iridescences previously reported in the literature. Moreover, the micron- and submicron structures responsible for the optical phenomenon remained unknown. In this study, using modeling of optical microscopy images, we first analyzed the overall changes of coloration and dimensions of the iridescent centers within *C. lytica*'s colonies. “Glitter-like” iridescence was found to cover a large part of the colonies. A specific transmission electron microscopy approach was designed to elucidate iridescent structures. A remarkable and unique organization of the cell population was evidenced within the iridescent *C. lytica*'s colonies. Morphological and mathematical analysis tools were used to extract the periodicity of the aligned cell structuration, and physical modeling was used to predict the optical properties. A significant degree of correspondence was found between the experimental and theoretical data. Therefore, we identified for the first time in the living world iridescent structures that are formed at a population level. Specific cell-to-cell communication processes also involved in gliding motility could be responsible of *C. lytica*'s structuration.

Keywords: Bacterial iridescence; glitter-like iridescence; marine bacterium; *Cellulophaga lytica*; Colonies; biofilm; iridescent structures

Introduction

Various processes in nature imply coloration. Iridescence, a structural color, is due to the interaction of light with micron- and submicron-sized physical structures spatially arranged with very periodic geometry (Vukusic & Sambles, 2003). These structures can interact with incident light to create preferential scattering of specific spectral colors which can generate the most intense and often functionally targeted optical effects. A strong angle-dependent character is defined for iridescence (Fox, 1976; Vukusic & Sambles, 2003; Vukusic, 2004; Doucet & Meadows, 2009). Various animals exhibiting structural colors have been the subject of keen interest to both the biology and physics fields. Iridescence has also been reported in macroalgae (Gerwick & Land 1977, Craigie et al, 1992), diatoms (Noyes et al, 2008; Gordon et al, 2009) and in one virus system (Williams, 1996).

In contrast, prokaryotic iridescence has been ambiguously described or ignored in the literature. Recently, an intensely iridescent bacterium, *Cellulophaga lytica* CECT 8139, has been isolated from an anemone surface in the Charente Maritime coast (Kientz et al, 2012a). *C. lytica*'s colonies exhibited bright green coloration when observed under direct illumination. Red and violet colors were also visible at the colony edges. In the same study, four categories of iridescence were defined in prokaryotes: rainbow-diffuse and rainbow-edges iridescences observed under trans-illumination, and metallic and glitter-like iridescences observed under direct illumination. In the literature, several attempts were made to explain the iridescence observed under trans-illumination ascribed to either orderly arranged cells (Pijper, 1918; 1923; 1925; Engboek, 1950) or randomly arranged cells (Ponder, 1934; Guillot, 1941; 1942.). The last attempt mentioned multilayer of cells (Nogrady & Guérault, 1964) but none could be confirmed notably due to the lack of microscopy tools. Metallic iridescence of some *Pseudomonas aeruginosa* strains was found to be correlated to the accumulation of 2-heptyl-4-quinolone molecules (Wensinck et al, 1967; D'Argino et al, 2007). Again, the mechanism was not unveiled.

Due to its singularity, the glitter-like iridescence class was especially created for a few strains of *C. lytica* (Kientz et al, 2012a). Since this type of iridescence was intense and occurred under direct natural light exposure it was described as a more natural coloration effect compared to the other bacterial iridescences. Physical-optical analyses (microspectrophotometry) permitted to confirm the structural coloration and to show the color maps of scattered wavelengths at a macroscopic level. However, the nature of the structures

responsible for the remarkable iridescence of *C. lytica*'s colonies remained completely unknown.

To solve this question, we first characterized the angle-dependent color changes and dimensions of the iridescent centers (glitters) using modeling and statistical analysis of optical microscopy images. Moreover, we used adapted Transmitted Electronic Microscopy (TEM) protocols to elucidate the internal structures within the biofilm bacterial populations in both iridescent and non-iridescent colonies. Mathematical morphology and physico-optical modeling of the TEM images allowed us to explore the first model of explanation for a bacterial iridescence.

Material and methods

Bacterial strains and culture conditions

Culture conditions comprised ready-to-use Marine agar (MA) medium from Dutscher (Laboratorios Conda, S.A. Pronadisa[®]) and salted Nutrient agar (sNA) (Dutscher) with a supplement of NaCl 25 g L⁻¹. Prepared media were made with artificial seawater (ASW) Instant Ocean[®] (30 g L⁻¹). Cytophaga agar (CYT) contained 1 g tryptone, 0.5 g yeast extract, 0.5 g CaCl₂·2 H₂O, 0.5 g MgSO₄·7 H₂O, and 15 g agar in 1 L of ASW (Lewin & Lounsbery, 1969; Johansen et al, 1999). This medium was adapted with casein replaced by tryptone because *C. lytica* does not degrade casein. Low nutrient medium (LN) contained 15 g of agar in 1 L of ASW (Jensen et al, 1996). Temperature of incubation was fixed at 25°C.

C. lytica CECT 8139 isolated from an anemone surface in the French Charente Maritime coast (France) (Kientz et al, 2012a) was mainly employed in this study. Colonies of this strain exhibit glitter-like iridescence on several marine media (MA, CYT, LN) but are non-iridescent on the salted medium sNA. Green iridescence with red and violet iridescent colony edges corresponds to the profile observed on CYT and MA. A specific green iridescent profile is visible on LN (Kientz et al, 2012b). *C. lytica* CIP 103822 was additionally used as a negative control because its colonies are non-iridescent on all media (Kientz et al, submitted for publication).

Observations by optical digital microscopy

Direct observations of colored colonies were performed under epi-illumination by using a numeric Keyence microscope (VHX-1000E). A VHX-1100 camera with a VH-Z20R/Z20W objective lens could be adjusted at x50, x100 x200 magnifications (Kientz et al, 2012a). To avoid specular reflections, the VH-S30 supporting mount of the camera was oriented at a 60° angle from the plate. The DEPTH UP/3D tool corresponding to the depth-from-defocus (DFD) process was employed at high magnification to focus on all optical fields and to improve image quality. In order to observe transitory colorations, the Keyence device was equipped with a VH-K20 lens ring. The support of the camera was oriented at a 90° angle. By moving the ring from right to left, three positions of illumination were used, namely, high, intermediate, and low light incidence angles.

Physical measurement of *C. lytica*'s iridescence (microspectrophotometry).

Illumination was directed onto the sample through an Ocean Optics UV-Vis-NIR optical fiber that was connected to an Ocean Optics HPX-2000 light source that spans approximately 300 nm to 850 nm. The reflected light was collected using a similar optical fiber that was itself connected to an Ocean Optics USB4000-UV-VIS spectrometer (Kientz et al, 2012a). The angle of illumination and of detection could be separately set and controlled to a resolution of 0.5°. For a series of chosen fixed illumination angles, the collection fiber was stepped in 2° angle steps in an arc over the sample, and reflection spectra were recorded at each angular position.

Preparation and analysis of TEM samples

An adapted protocol was elaborated in order to preserve the internal structures of the colonies growing at the surface of agar plates during the invasive steps of TEM sample preparation. The principle was to enclose the colony into soft agar and to use this agar bubble for further treatments. A piece of a 24 h-growth colony was covered with soft salted agar (consisting of 6 g L⁻¹ of agar and 30 g L⁻¹ NaCl) pre-cooled at 40°C. A “bubble” of agar was formed around the colony. Iridescence could still be observed through the soft agar and after gelling. For each condition, three agar-enclosed colonies were treated for TEM fixation, dehydration and contrast. All chemicals were purchased from Sigma.

The protocol used was adapted from already existing ones (Renault et al, 1994). The first step of TEM preparation was an overnight fixation bath in glutaraldehyde 3 % (in cacodylate buffer) at 4°C. After two rinse cycles of 10 minutes in cacodylate buffer (10 mL cacodylate 0.4 M, 4 mL NaCl 10% and 6 mL pure water; pH 7,4; 1100 mOsm), fixation and contrast were performed in osmium tetroxide 1% solution (1 mL Osmium tetroxyde 4%, 1 mL cacodylate 0.4 M, 1 mL NaCl 10% and 1 mL pure water) during 1 h at 4°C. Samples were again rinsed twice with cacodylate buffer during 10 minutes. For dehydration, a *graded* series of *alcohol steps was used* (10 min 30%, 10 min 50%, 10 min 70%, 2 x 15 min 95%, 3 x 20 min 100%,) and finally, samples were immersed twice in propylene oxide for 15 min. Impregnation in the resin comprised a bath of propylene oxide and resin (vol/vol) for 1 h and one bath in pure resin for 1 h. The resin was made with 18.48 g Epon, 9.3 g DDSA (Dodecyl succinic anhydre), 9.3 g MNA (Methylnorbornene-2,3-dicarboxylic anhydre), 0.45 g DMP3O (2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol). The agar-enclosed colony was then cut in smaller pieces disposed at the bottom of a 500 µL Eppendorf tube full of resin and left for reticulation at 60°C for 48 h with an orientation that permitted colony cross-section. Resin blocks were then removed from the plastic tube and cut to form a rectangular plane surface before cutting with an Ultratome (LEICA EM UC6). Semithin sections (1µm) were stained with toluidine blue and screened for areas with cells. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate before mounting on copper grids and examined using a JEOL JEM-1011 transmission electron microscope at 60 kV.

Statistical analysis of glitter-like iridescence variation

All image-processing programs used in this study have been developed for our own purpose using the Matlab environment. Transitory colorations were calculated using three microscopic images realized corresponding to the same colony section for three illumination conditions: high, intermediate, and low light incidence angles. Iridescent elements in a digital image can be characterized by both highly saturated and bright pixels. In order to extract and analyzing those elements, it is relevant to perform a color space transformation, from the usual RGB (Red Green Blue) representation of digital images to a more perceptual space which is the HSV space (Hue Saturation Value). After transforming the image from RGB space to HSV space, only pixels having high values in both Saturation and Value channels are considered. They indeed represent iridescent areas in the image. Statistics on those iridescent pixels are performed by computing circular histograms on the Hue channel.

For each image, total percentages of glitter-like iridescent areas are computed, as well as the relative percentage of each color. These values are calculated for each three illumination angle. The influence of the illumination angle on the glitter-like coloration has also been studied. Depending on the angle, regions of the colony can change in color, luminance or both. Those behaviors are analyzed separately and are represented by variation maps. Our program estimates in particular, the areas or the percentage of those iridescent structures that are varying in color and/or luminance between 2 illumination angles. In order to visualize the most representative colors in the images, the K-means classification algorithm is used. A simplified version of the image with 3 colors is then obtained, usually the background color and glitter-like iridescent structures.

Statistical analysis of glitters dimension

The area corresponding to iridescent zones of the colony is extracted from classical optical microscopy at different scales. A program has been developed for estimating the size of glitter-like structure from a selected area in the image. Based on the property of high saturation of potentially iridescent pixels, the area of iridescent structures is estimated in μm^2 . An average area of glitter-like iridescent structures is then computed, as well as a histogram of their size distribution. Different images at different scales of the same zone enable to confirm the reliability of the computed areas

Mathematical morphology analysis of the TEM images

Statistical analyzes of images are needed to confirm the presence of a network and evaluate its order and related dimensions. In our study, the information collected from the TEM images are the distances between the centers, distances between the edges, the alignment of cells and the network formed. The image processing technics used for extracting this information is based on mathematical morphology (Serra and Soille, 1994). Very succinctly, mathematical morphology is a set of mathematical theory and techniques for the analysis of structures. It is a widely used tool in image processing because it can efficiently extract image components that are useful for representing and describing image regions (such as border, or the notion of convex hull). The two basic operations of mathematical morphology are dilation and erosion, which correspond to the union (or intersection) of the image with translations of a form called structuring element. In our application framework, mathematical morphology allows us to extract the individual cells of an image, including their center, their shape and their average

size (using granulometric analysis). Once the cell network is extracted, statistical studies of the spatial distribution of these cells can be performed.

Image segmentation. The extraction of the cell network is performed in several steps. First, a granulometric analysis provides an estimate of the average cell size in the image, allowing for further processing to determine the size of the structuring element to be used. Morphological filtering is then used to extract the geometry of cells, and a thresholding operation (using Otsu thresholding) is performed to get a binary image (1: cell 0: background). Cells that are not entirely included in the image are removed in order not to biased the statistics, and cell center coordinates are finally extracted, as well as the area of cells, their structure and their size (function *regionprops* in Matlab).

Extraction of the cells network. Information extracted in the previous step allows the analysis of the network formed by the cells contained in the image. A Delaunay triangulation is performed with the centers of each cell in order to better show the observed structure. A Hough transform is also used to extract the main axes alignment.

TEM image modeling by *Comsol multiphysics*

Optical data was taken in the form of scattering patterns for several angles of incidence. A modeling protocol, using the commercial modeling package *Comsol Multiphysics*, was devised to mimic the experimental technique. Due to the cigar shaped nature and 2D periodicity of the structure, a 2D modeling techniques was used. The model comprised a 10 μ m square a bacteria (refractive index = 1.38), in a hexagonal packing geometry, surrounded by a medium with a refractive index of 1.34. The bacteria geometry had a periodicity of 320 nm and a bacteria diameter of 280 nm. The reflection hemisphere of the model (i.e. above the bacteria geometry) comprised a semi-circular space, the boundary of which was split into 1 degree segments. A plane wave was incident upon the bacteria geometry with an incident angle of 30 degrees. The power of the plane wave was set as 1W such that any measurement of scattered power in the reflection hemisphere was equivalent to a reflectance measurement. The power scattered through (and therefore the reflectance at) each of the 1 degree segments on the boundary of the reflection hemisphere was modeled, giving modeling data equivalent to the scattering pattern measured experimentally.

The hexagonal structure identified in the TEM images appears in large domains, rather than as a uniform structure. Within each of these domains the orientation of the hexagonal structure varied. To incorporate this into the model, the hexagonal packed bacteria geometry was rotated from 0 degrees (with horizontal planes of bacteria) through to both - 30 and + 30 degrees (vertical planes of bacteria), in 2.5 degree steps. A weighted average of the scattering patterns produced from each bacteria orientation was taken. The weighting took the form of a Gaussian, with a weighting of 1.0 at 0 degrees bacteria orientation.

Results

Angle-dependent color variations within *C. lytica* colonies

The structural color *C. lytica* CECT8139 's was previously evidenced by its angle-dependent character obtained by physical measurements (microspectrometry) (Kientz et al, 2012a). However, the amount and position of iridescent centers and the extent of angle-dependent color variations onto the colonies were uncharacterized. We therefore analyzed how the iridescence behaves on large zones of the colonies at three illumination angles. Using image-processing programs, the total percentages of glitter-like iridescent areas were computed as well as the relative percentage of each color. On MA-grown colony (Fig.1 as an example), color profiles were significantly modified as a function of illumination angles (from high to low incidence). Green and yellow predominated but other colors, red, orange and a little blue and magenta were observed. The grazing orientation of light (low illumination angle) made the glitters greener. Similar analyses were repeated for other zones of the colonies and for growth on CYT (data not shown). As expected, some differences were found for the color profiles but the angle-dependent color variations were systematically observed.

Importantly, using our program, we could estimate the areas or the percentages of the iridescent structures that are varying in color and/or luminance between 2 and 3 illumination angles. The Table 1 shows the data derived from the Hue channel used in Fig. 1. A large area of iridescence was found onto the colony (Z %, *precise determination in progress*). For the three illumination angles used, the areas varying in colors were relatively large. In the

example shown, areas varying in both colors were relatively low but higher values were found for other conditions (data not shown). Percentage calculations of color variations evidenced a heterogeneous angle-dependent optical behavior (Table 1). Taken together, these data indicate that iridescent reflected colors are diverse and widespread onto the surface of *C. lytica*'s colonies. Into the colonies, minor variations in dimensions and positions of the iridescent structures may create a form of optical heterogeneity.

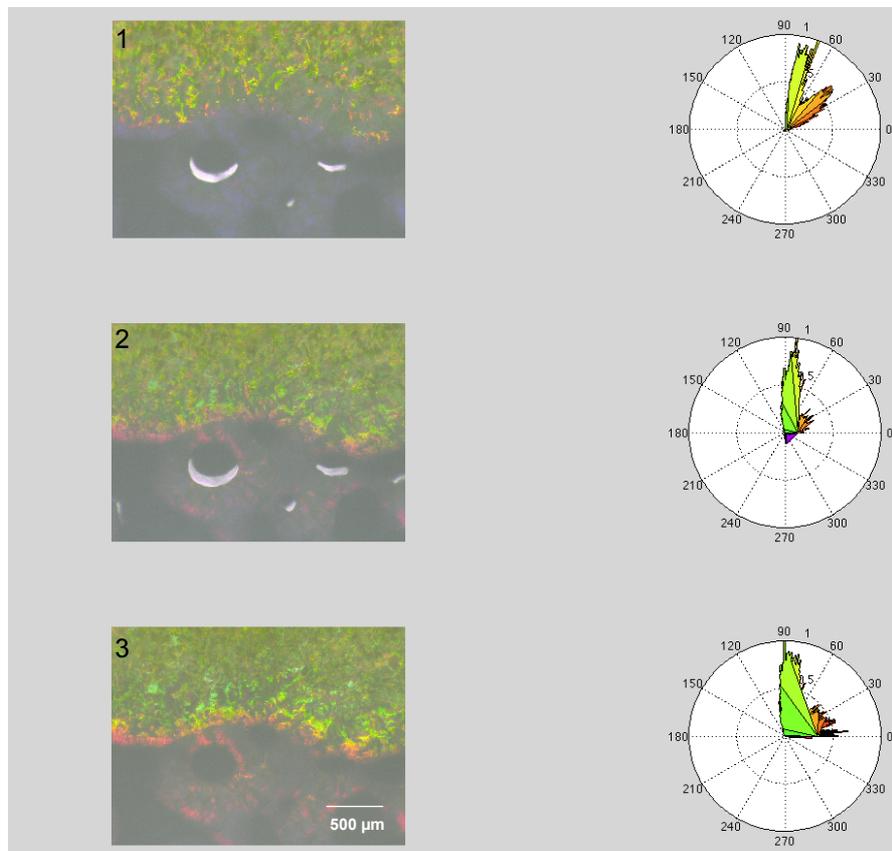


Figure 1. Color variations at the edges of an iridescent *C. lytica* CECT 8139's colony grown on MA. Optical digital microscopy images were taken at high (1), intermediate (2) and low (3) light incidence angles. Statistics on the iridescent pixels were performed by computing circular histograms on the Hue channel. In the circular histograms, each color corresponds to an angle interval: red [0:30°], orange [30:45°], yellow [45:75°], green [75:120°], cyan [~180°], blue and magenta [~240-300°].

Table 1. Statistic analysis of angle-dependent color and luminance variations at the edges of a *C. lytica* CECT 8139 colony (see also Fig. 1).

Area calculations	μm^2
Total image area	V
Colony area	W
Iridescence area	X
Non-colonized area (dark zone with or not specular reflections)	Y
Color variation between images 1 & 2*	172 690
Luminance variation between images 1 & 2	38 498
Color variation between images 2 & 3	123 340
Luminance variation between images 2 & 3	21 571
Color variation between images 1 & 3	33 707
Luminance variation between images 1 & 3	5 258
Variation in both color and luminance between images 1 & 2	1 873
Variation in both color and luminance between images 2 & 3	4 862
Percentage calculations	%
Iridescent colony area	Z
Zones varying in color those also vary in luminance between images 1 & 2	1.1
Zones varying in luminance that also vary in color between images 1 & 2	4.9
Zones varying in color those also vary in luminance between images 2 & 3	3.9
Zones varying in luminance that also vary in color between images 2 & 3	22.5
Zones that have varied in color between images 1 & 2 and that also vary between 2 & 3	19.5
Zones that vary in color between images 2 & 3 and that have also varied between 1 & 2	13.6
Zones that have varied in luminance between images 1 & 2 and that also vary between 2 & 3	27.3
Zones that vary in luminance between images 2 & 3 and that have also varied between 1 & 2	24.3

* Images 1, 2 and 3 are those shown in Fig.1.

The precise determinations of V, W, X, Y and Z values are in progress.

Sizes of glitters

In order to predict the dimensions of the physical structures responsible for iridescence, it was crucial to determine the dimensions of the iridescent elemental units, the “glitters”, observed macro- or microscopically. Based on the property of high saturation of iridescent pixels, a program has been developed for estimating the size (in μm^2) of glitter-like structures. For analysis, we favored the zones of the colonies in which diverse colors were observed. In the example shown (Fig. 2), five glitters (blue, green and red) were analyzed. The program could estimate the size at different scales, but the best magnification was x200. High size heterogeneity was found in the example (Fig. 2) and also in other conditions (data not shown). The smaller iridescent elemental units were about $50 \mu\text{m}^2$ (e.g. a green glitter of $71 \mu\text{m}^2$ is shown in Fig. 2). These data suggest that patches of periodic structures into the colony are of different size. Based on the minimal size of the iridescent elemental unit ($50 \mu\text{m}^2$), the patches may be formed by bacterial cell sub-populations.

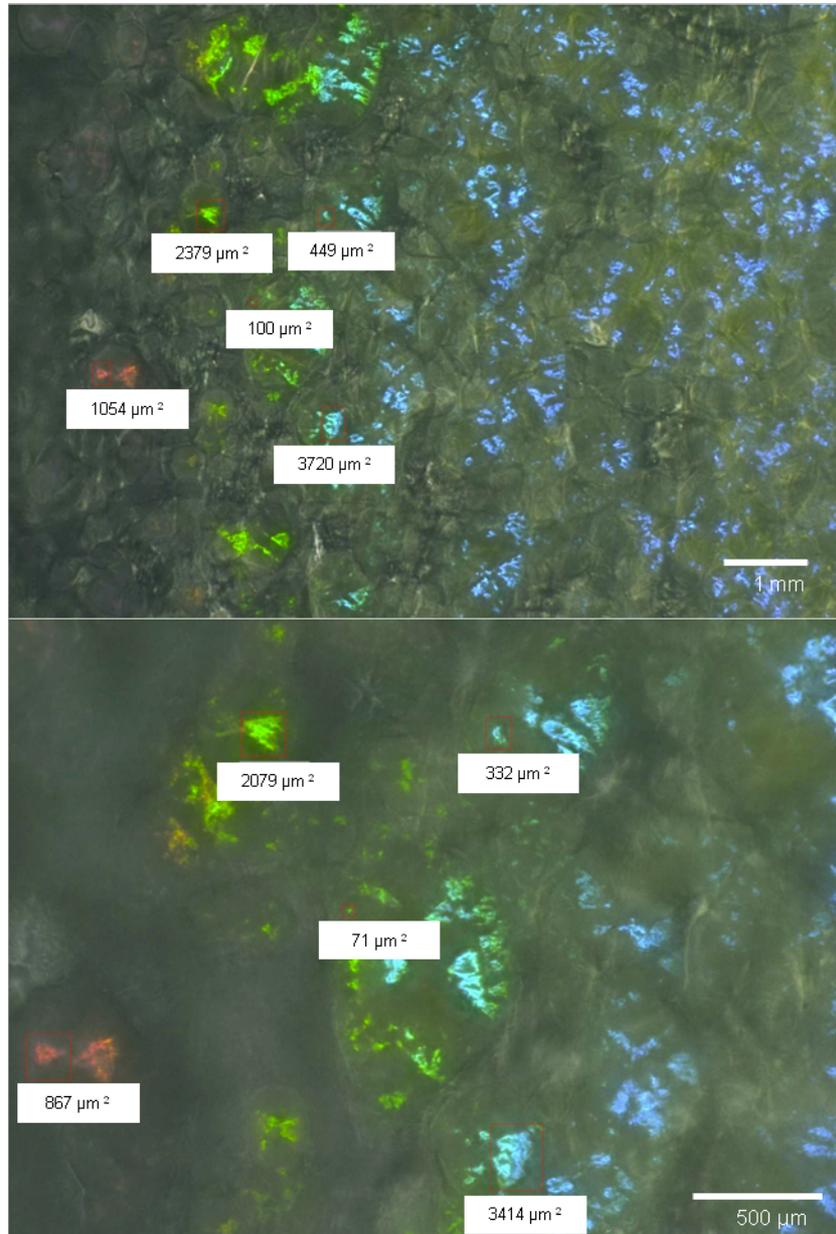


Figure 2. Statistic determination of “glitter” sizes within *C. lytica*’s colony grown on CYT. Optical digital microscopy images were taken at x100 (top) and x200 (bottom) magnifications. In this example, a zone with several glitter colors was analyzed.

Microspectrophotometry and TEM of iridescent and non-iridescent *C. lytica* colonies

Microspectrophotometry was used to quantify physically the iridescence of CYT-grown *C. lytica* CECT 8139 colonies compared to non iridescent sNA-grown *C. lytica* CECT 8139 and CYT-grown *C. lytica* CIP 103822 colonies (Fig. 3AB). The color map of CYT-grown *C. lytica* CECT 8139 colonies shows optical reflection bands that unequivocally represent the iridescence by the change in their color with angle. Under non-iridescent conditions, only a very low optical reflection, corresponding to the yellow pigmentation, was recorded. Based on these quantitative data, the three conditions (positive and negative controls) were used to elucidate the underlying mechanisms responsible for iridescence.

TEM images of colony cross-sections evidenced a remarkable and unique organization of the cell population under iridescent conditions. The cells had the same orientation, appeared equally spaced and aligned on the entire image ($\sim 50 \mu\text{m}^2$). Under non-iridescent conditions, the organization of the cell population seemed low and even absent in CYT-grown *C. lytica* CIP 103822 and sNA-grown *C. lytica* CECT 8139 colonies, respectively. These data suggest that the cell population organization may be the cause of iridescence. Even if small groups of organized cells were visible in CYT-grown *C. lytica* CIP 103822, the number of arranged cells may not be sufficient to create iridescence.

Additional TEM images were obtained from iridescent MA- and LN-grown *C. lytica* CECT 8139 colonies (Fig. 4). In all the conditions, a high degree of organization of the cell population was visible even if sharp changes of orientation could occur. Visualization of the cells in their length axis demonstrated that cells were very close to each other on their entire edges. Groups of arranged cells were also visible into the thin colonies grown on LN medium. The LN condition permitted to probably observe the initiation of cell-organized iridescent structures. A first thin layer is constituted in one orientation, and then one group of organized cells is superposed in another orientation.

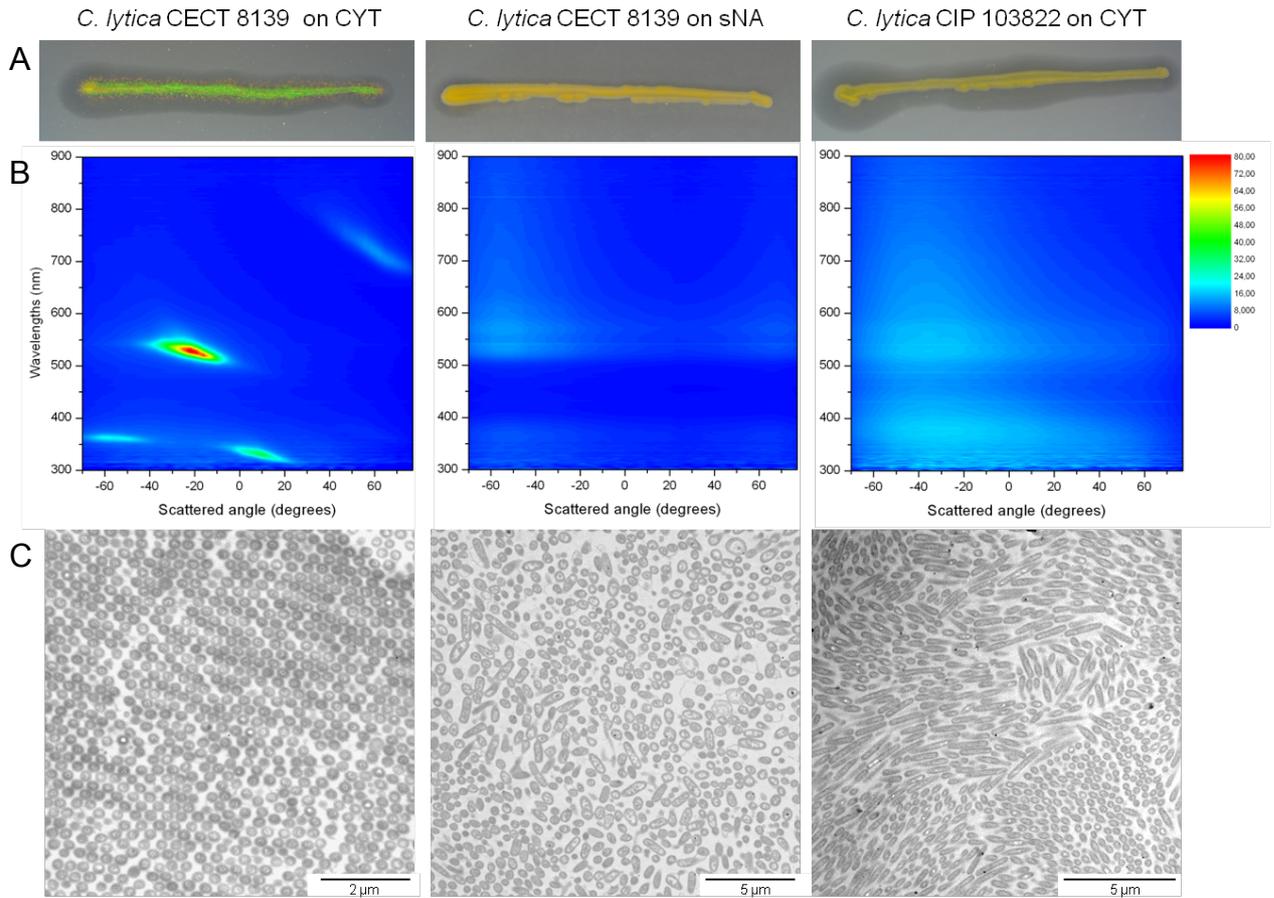


Figure 3. Microspectrophotometry and TEM analyses of iridescent and non-iridescent *C. lytica* colonies. (A) Appearance of the colonies (streaking method on agar plate). (B) Microspectrophotometry: color maps of scattered wavelengths under illumination at an angle of -70° . (C) TEM images of colony sections.

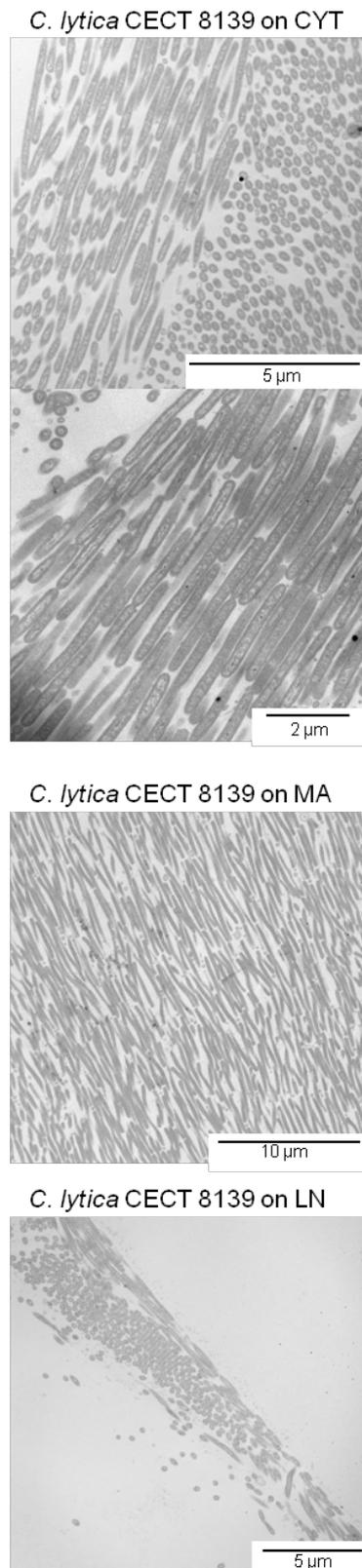


Figure 4. TEM cross-section images of *C. lytica* CECT 8139 colonies under different iridescent conditions (CYT, MA and LN growth media).

Identification and characterization of the iridescent structures

The iridescence phenomenon is generated by micron- and submicron-sized periodic physical structures. A periodicity (quasi-order) was visible in the TEM images. However, statistical analyzes of images were needed to confirm the presence of a network and evaluate its order and related dimensions. The extraction of cells centers and distances between nearest neighbors permitted to produce a Delaunay triangular (Fig. 5). Grating was easily observed by eyes for the iridescent condition because the spatial arrangement of the iridescent samples were visually more regular. Indeed, « local » deformations on the Delaunay graphs of non-iridescent samples were stronger. The histogram allowed the appreciation of cells distances from each others. In the iridescent condition the majority of cells had the same distance from the 6 nearest neighbors. This showed equidistance of the cells with small standard deviations. Heterogeneous cells distances were recorded for non-iridescent control conditions. As previously identified by eyes, CYT-grown *C. lytica* CIP 103822 colonies had more common distances between the cells but this may be insufficient to create iridescence.

Physico-optical properties of modeled TEM images: elucidation of the “glitter-like” iridescence of *C. lytica* CECT 8139.

When comparing our modeling and experimental data it is immediately apparent that the modeling data reproduces the major features seen in the experimental data (Fig. 6). This indicates that our hypothesis, that the observed scattering pattern is due to reflections from planes of bacteria within the hexagonal structure, is correct. The major features seen in the modeled data appear at approximately the expected angles, they are however at slightly longer wavelengths, when compared to the experimental data. We believe this is because the periodicity used in the model is based on analysis of a large region of quasi-ordered structure. The disorder taken into account artificially increases the periodicity, compared to that seen within the domains of ordered structure. It is likely, therefore, that this model was produced using a structure periodicity that is slightly too large. Reducing it by a small amount would likely shift the strong reflectance peaks in the modeled scatter pattern down to similar wavelengths seen in the experimental data. The modeled reflectance peaks are also very narrow when compared to the experimental data. This is potentially due to the fully ordered nature of our model. The highly periodic model results in strong reflectance over very narrow wavelength ranges, resulting in the sharp reflectance peaks seen in the figure.

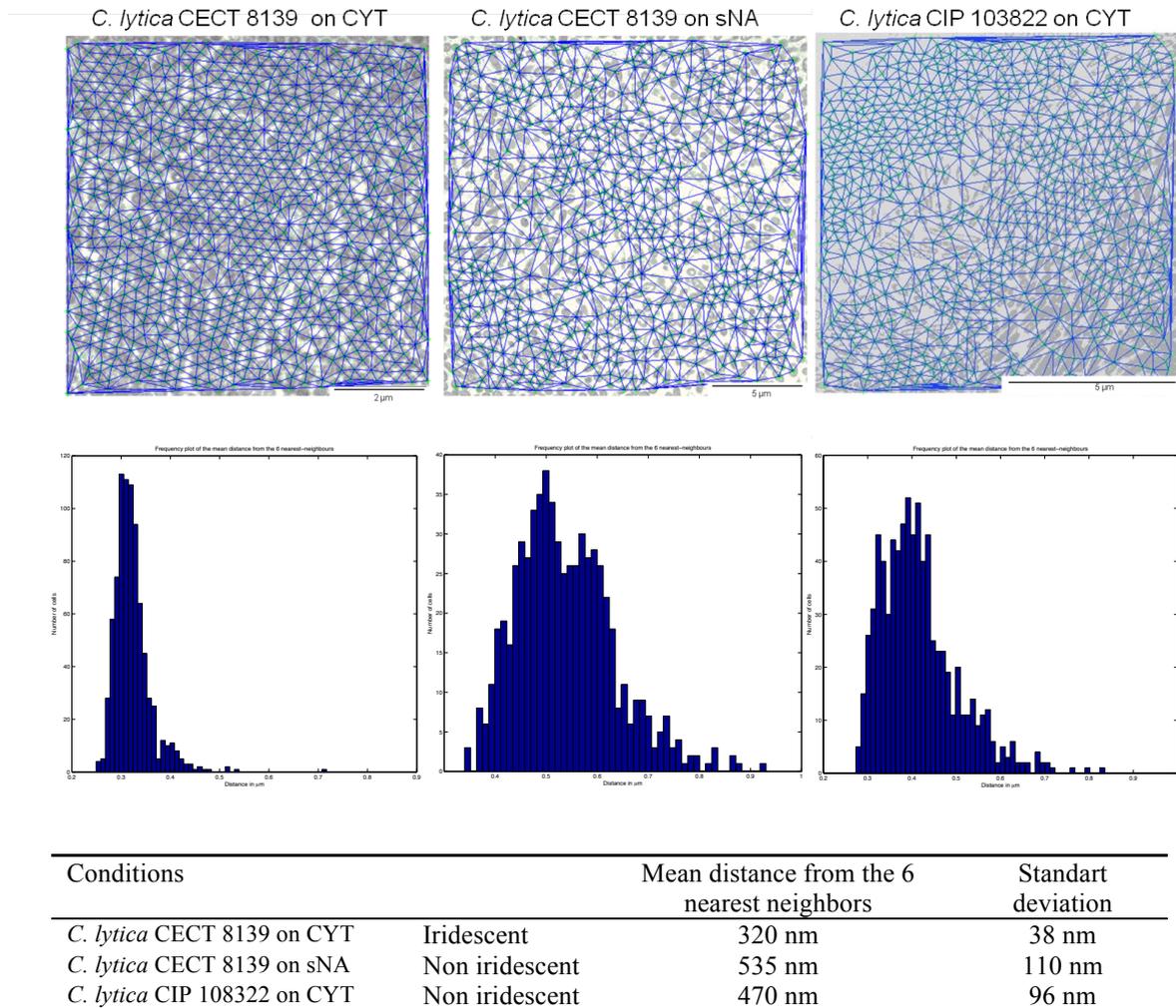


Figure 5. Extraction of periodic structures from TEM images with Delaunay analysis. The images analyzed were those presented in Fig. 3. Graphs represent the distance values from the six nearest neighbors for all the cells in the image. The table (bottom) indicated the associated mean distances from the six nearest neighbors and standard deviations.

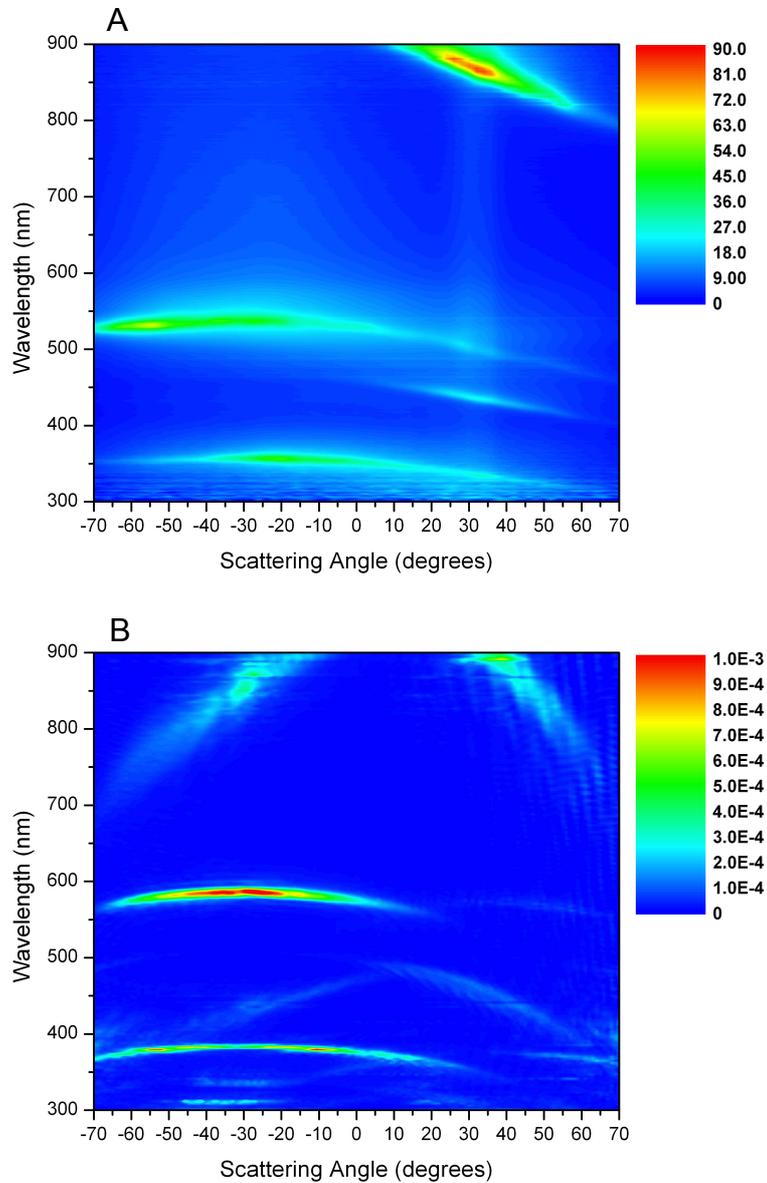


Figure 6. Comparison of experimental (A) and modeling (B) light scattering data of *C. lytica* CECT 8139 colony on CYT. TEM images were used for modeling. The experimental or theoretical angle of illumination was 30°. Intensities differences between modelled and experimental data corresponds to lower thickness of cells layers for the model.

Discussion

In the literature, several authors have hypothesized prokaryotic iridescent structures but none has been proved. Moreover, first explanations were given for trans-illumination iridescence, a phenomenon appearing unnatural. This study aimed to fully characterize the glitter-like iridescence of *C. lytica* CECT 8139 colonies observed under epi-illumination. Specific programs were designed to analyze statistically the angle-dependent color variations onto the colonies. The total iridescent area was high onto the colonies but various glitter sizes were observed. This suggested that periodic structures of different sizes were widespread within the iridescent colonies. Characterization of the optical properties and dimensions of the iridescent zones was a prerequisite before exploring the internal structures.

The adapted TEM method permitted to elucidate the iridescent structures within *C. lytica*'s CECT 8139 colonies. One of the most striking results of this study was the remarkable and unique alignment of the cells into iridescent *C. lytica*'s colonies. To our knowledge, such organization level has not yet been described within a bacterial colony or biofilm. As previously described, *C. lytica*'s CECT 8139 has a rapid gliding motility in iridescent conditions (Kientz et al, submitted for publication). Even motile, organization of the bacterial cells was sufficiently high to conserve a structuration.

In the TEM images, several properties (*e.g.* order of magnitude of the periodic structures, sharp changes in cell direction) correlated well with the computed iridescent properties (*e.g.* glitter sizes, proximity of different colors...). Importantly, a Delaunay morphology analysis of the TEM images allowed us to define the periodicity of the internal structures. The distance between the six nearest neighbors was the most adapted dimension to compare iridescent (organized) and non-iridescent (non-organized) conditions. Cells equally spaced characterized periodicity. This periodicity and the refraction properties of the cells and exoproducts in the interstices were supposed to be responsible for diffraction and light scatterings.

Another striking result of this study was obtained by modeling the physical-optical properties of TEM images. Structural color is formed when a regular spatial variation between two materials of different refractive index is presented to incident light. If the period (physical size) of this variation in refractive index is of the same order as the wavelength of visible light,

it results in often bright and saturated (pure) colors being reflected through the mechanism of optical interference. The same mechanism is irresponsible for the colored reflections in soap bubbles. Each individual bacterium in the *C. lytica* CECT 8139 system described in this work are observed to be aligned in a generally periodic close-packed geometric structure within a small population of its neighbors. The extent of this regular alignment, combined with the refractive indices of the bacterial bacilli and the aqueous medium that surrounds them, creates discernible color reflections. The angle-dependent color reflection of the bacterial population that is observed experimentally, and modeled theoretically, confirms the structure-based origin of the color and the iridescent property that is ascribed to it. A first explanation of bacterial iridescence is therefore proposed in this work. Glitter-like iridescence is due to the periodicity of hexagonal packed circles. In the nature, structural colors can be created by different type of structures (Vukusic, 2003). Multilayer structures are the most common and initiate interferences without diffraction. Interferences with diffractions can be produced by 2D and 3D structures. The glitter-like iridescence of *C. lytica* CECT 8139 colonies produces interferences with diffractions in two dimensions. The structure is unique, however its shares similarities with those produced by two-dimensional-periodic hexagonally packed cylindrical channels of *Pherusa sp.* worm's setae (Trzeciak & Vukusic, 2009).

The same organism typically produces iridescent structures but *C. lytica* CECT 8139 structures are implied at a population level. This characteristic could be compared to the iridescence of virus (Williams, 1996). However, it is not clear whether iridescent structures correspond to the accumulation of the particles or to the helicoidally geometry of virus capsids. For the first time, we evidenced a unique iridescence generated at a population level in a living organism. Moreover, due to the gliding motility of *C. lytica*, the iridescent structures (groups of cells) themselves can move. A high degree of cell-to-cell communication might be required to coordinate, in time and space, motility and periodicity of the structure. The underlying cellular mechanisms remain entirely unknown.

In many higher organisms, structural colors have been strongly linked to biological functions associated with conspecific and interspecific communication purposes. However, these same structures can also serve non-communication functions such as those related to thermoregulation, UV protection, light filtering, water repellency, mechanical friction reduction, or desiccation prevention (Doucet & Meadows 2009). Bacterial iridescence has not

yet been directly observed in the marine environment. However, glitter-like iridescence of *C. lytica*'s colonies was also observed in other *Cellulophaga spp.* and other members of the *Bacteroidetes* phylum (Kientz et al, submitted for publication). What could be the biological functions of such iridescence? This is a major question also entirely unsolved. Periodic structures are responsible for reducing mechanical friction in some burrowing animals (Doucet & Meadows, 2009). A similar role might also be envisaged for bacterial glitter-like iridescence. Indeed, a strong link was found between gliding motility and iridescence. The periodicity and the organization of the cells may favor motility of the population and mass migration. Glitter-like iridescence might also have photoprotective and/or thermoregulation roles: these hypotheses are being currently under investigation in our laboratory.

As a conclusion, besides the fundamental interest in studying the eco-biology of *C. lytica*'s iridescence, there are probably future applications areas in both nanotechnology and biomimetic.

References

- Brink DJ, van der Berg NG & Botha AJ (2002) Iridescent colors on seashells: an optical and structural investigation of *Helcion pruinosus*. *Appl Optics* 41:717–722.
- Craigie JS, Correa JA & Gordon ME (1992) Cuticles from *Chondrus crispus* (Rhodophyta) 1. *J Phycol* 28: 777–786.
- D'Argenio DA, Wu M, Hoffman LR, Kulasekara HD, Déziel E et al (2007) Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol* 64:512–533.
- Doucet SM, Shawkey MD, Hill GE & Montgomerie R (2006) Iridescent plumage in satin bowerbirds: structure, mechanisms and nanostructural predictors of individual variation in colour. *J Exp Biol* 209:380–390.
- Doucet SM & Meadows MG (2009) Iridescence: a functional perspective. *J R Soc Interface* 6(Suppl. 2):S115–S132.
- Engboek HC (1950) The phenomenon of iridescence in bacterial cultures, with particular reference to Pfeiffer's bacillus. *Acta Path Micro* 27:388–393.
- Fox DL (1976) Animal biochromes and structural colours: physical, chemical, distributional & physiological features of coloured bodies in the animal world. 2nd ed. University of California Press, CA.

- Gerwick WH & Lang NJ (1977) Structural, chemical and ecological studies on iridescence in *Iridaea* (Rhodophyta). *J Phycol* 13:121–127.
- Ghiradella H (1991) Light and color on the wing: structural colors in butterflies and moths. *Appl Optics* 30:3492–3500.
- Gordon R, Losic D, Tiffany MA, Nagy SS & Sterrenburg FAS (2009) The glass menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology. *Trends Biotechnol* 27:116–127.
- Greenewalt CH, Brandt W & Friel DD (1960) The iridescent colors of hummingbird feathers. *P Am Philos Soc* 104:249–253.
- Guillot M (1941) Relation entre certaines propriétés optiques des bactéries et leur forme géométrique vraie. Diffraction de la lumière par les cultures et symétrie de la bactérie. *Cr Acad Sci* 1100–1103.
- Guillot M (1942) Critères physiques d'homogénéité d'une culture de microbes vivants. *C R Soc Biol* 720–721.
- Jensen PR, Kauffman CA & Fenical W (1996) High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Mar Biol* 126:1–7.
- Johansen JE, Nielsen P & Sjøholm C (1999) Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Micr* 49:1231–1240.
- Kientz B, Vukusic P, Luke S & Rosenfeld E (2012a) Iridescence of a marine bacterium and classification of prokaryotic structural colors. *Appl Environ Microbiol* 78 (7): 2092-2099.
- Kientz B, Marié P & Rosenfeld E (2012b) Effect of abiotic factors on the unique glitter-like iridescence of *Cellulophaga lytica*. *FEMS Microbiol Lett* 333(2): 101-8.
- Kientz B, Ducret A, Luke S, Vukusic P, Mignot T & Rosenfeld E (submitted) Glitter-like iridescence within the *Bacteroidetes*: optical properties and correlation with gliding motility.
- Lewin RA & Lounsbery DM (1969) Isolation, cultivation and characterization of flexibacteria. *Microbiology* 58(2), 145.
- Liu Y, Shigley J & Hurwit K (1999) Iridescent color of a shell of the mollusk *Pinctada margaritifera* caused by diffraction. *Opt Express* 4:177–182.
- Lythgoe JN & Shand J (1989) The structural basis for iridescent colour changes in dermal and corneal iridophores in fish. *J Exp Biol* 141:313–325.
- Mäthger LM, Denton EJ, Marshall NJ & Hanlon RT (2009) Mechanisms and behavioral functions of structural colouration in cephalopods. *J R Soc* 6:S149–S163.
- Nogrady G & Guérault A (1964) Conditions favorisant l'iridescence bacterienne et l'observation du phénomène. *Rev Can Biol* 23:367–373.
- Noyes J, Sumper M & Vukusic P (2008) Light manipulation in a marine diatom. *J Mater Res* 23:3229–3232.
- Parker AR (1998) The diversity and implications of animal structural colours. *J Exp Biol* 201:2343–2347

- Parker AR, Mckenzie DR & Ah Yong ST (1998) A unique form of light reflector and the evolution of signalling in *Ovalipes* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *P Roy Soc Lond B Bio* 265:861–867.
- Pijper A (1918) Diffraction phenomena in cultures of microorganisms. *Med J S Africa* 14 :211
- Pijper A (1923) Diffraction in biological structures. I. The structure of colonies of the Coli-Typhoid group. *South African M Record* June 9
- Pijper A (1925) Diffraction in biological structures. III. The relative diameters of members of the Coli-Typhoid group. *South African M Record* 23 : 453
- Ponder E (1934) Diffraction patterns produced by bacteria. *J Exp Biol* 11:54–57.
- Prum RO & Torres R (2003) Structural colouration of avian skin: convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. *J Exp Biol* 206:2409–2429.
- Seago AE, Brady P, Vigneron J-P & Schultz TD (2009) Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural colour mechanisms in beetles (Coleoptera). *J R Soc Interface* 6(Suppl. 2):S165–S184.
- Stavenga DG, Leertouwer HL, Marshall NJ & Osorio D (2011) Dramatic colour changes in a bird of paradise caused by uniquely structured breast feather barbules. *Proc R Soc B* 278:2098–104.
- Trzeciak TM & Vukusic P (2009) Photonic crystal fiber in the polychaete worm *Pherusa sp.* *Phys Rev E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys* 80: 061908.
- Vukusic P & Sambles JR (2003) Photonic structures in biology. *Nature* 424:852–855.
- Vukusic P, Sambles JR, Lawrence CR & Wootton RJ (1999) Quantified interference and diffraction in single *Morpho* butterfly scales. *Proc R Soc B* 266:1403–411.
- Vukusic P (2004) Natural photonics. *Phys World* 17:35–39.
- Vukusic P, Wootton RJ & Sambles JR (2004) Remarkable iridescence in the hindwings of the damselfly *Neurobasis chinensis chinensis* (Linnaeus) (Zygoptera: Calopterygidae). *Proc R Soc B* 271:595–601.
- Wensinck F, van Dalen A & Wedema M (1967) Iridescent material and the effect of iron on its production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* 33:73–86.
- Williams T (1996) The iridoviruses. *Adv Virus Res* 46:347–412.

II. Données complémentaires de l'étude

Lors des analyses de MET, nous avons remarqué que la morphologie des cellules différait en conditions d'iridescence (CYT) ou de non-iridescence (sNA). Une coloration Gram des cellules dans ces conditions permet de confirmer les observations de MET. Les cellules sont très allongées et fines sur le milieu CYT, alors qu'elles sont petites et trapues sur milieu sNA (Figure 43). L'allongement des cellules serait donc essentiel à la construction des structures iridescentes de *C. lytica* CECT 8139. Une analyse plus fine des populations de cellules a également été réalisée par cytométrie de flux. Les différences de taille sont confirmées mais les essais n'ont pas été finalisés et ne sont donc pas présentés.

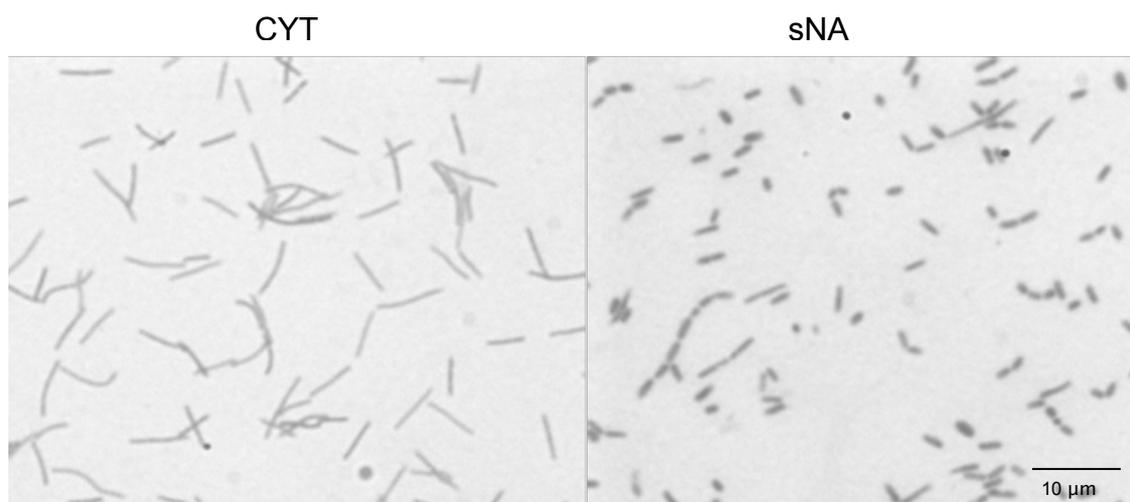


Figure 43. Morphologie cellulaire des cellules de *C. lytica* CECT 8139 sur deux milieux de culture, CYT et sNA par coloration de Gram.

III. Principaux résultats et discussion

L'étude de l'iridescence des colonies de *C. lytica* CECT 8139 a été réalisée sur des images de microscopie numérique obtenues pour trois angles d'illumination différents. L'analyse informatique et statistique des images confirme des changements de colorations selon les angles. Entre les trois orientations (verticale, intermédiaire et horizontale), les centres iridescents varient en couleur. Cette analyse colorimétrique est inédite. Elle permet de conforter de manière statistique la variation de couleurs propres au processus d'iridescence, et spécifiques à l'iridescence « glitter-like » bactérienne. Les zones iridescentes sont homogènes dans la colonie. Les structures iridescentes sont donc réparties sur une surface importante des colonies. Ces données nous ont permis de réaliser les analyses de MET sans craindre de manquer les structures.

L'évaluation de la taille des paillettes montre que la taille minimale 2D d'une paillette est d'environ $50 \mu\text{m}^2$. Cependant, des paillettes beaucoup plus petites ou larges et de différentes couleurs ont été observées. Les structures iridescentes ne sont donc pas équivalentes en taille dans les colonies. Des modifications mineures de structure pourraient également intervenir. Ces informations ont été particulièrement utiles pour l'analyse sur l'élucidation des structures.

Dans les analyses de microscopie électronique à transmission (MET), la méthode d'inclusion dans l'agar a permis de conserver la structuration interne de la colonie. L'observation des coupes met en évidence une organisation unique et remarquable des cellules dans les conditions d'iridescence. Les cellules sont alignées entre elles. Dans la condition contrôle non-iridescente (*C. lytica* CECT 8139 sur sNa) aucune organisation n'est visible. Une légère organisation de petits groupes de cellules est observée pour la colonie de *C. lytica* CIP 103822 non iridescente. Cependant les zones sont plus restreintes et ne permettent pas d'obtenir l'effet optique. Ceci confirme l'aspect spécifique de l'organisation cellulaire en conditions d'iridescence.

Les images MET supplémentaires ont permis d'observer des changements brutaux d'orientation des cellules dans la colonie. La présence de différentes zones de structure correspond à l'effet pailleté de la colonie et peut être expliquée par ce changement d'orientation. La taille des paillettes et celle des zones de structures visibles en MET pourraient être comparées lors d'analyses d'images supplémentaires. Elles nécessiteraient de

faibles agrandissements afin d'observer l'intégralité de la colonie. Ces images supplémentaires révèlent également l'organisation des cellules dans l'axe de la longueur. Elles sont très proches et possèdent la même orientation.

A l'œil nu, il est donc possible d'identifier cette structuration. Cependant il a été nécessaire de déterminer la structure responsable du phénomène par l'extraction mathématique et la modélisation des images MET. L'analyse statistique des images a permis d'extraire un réseau de diffraction. La donnée de distance entre les 6 plus proches voisins est appropriée pour l'élucidation de la structuration. L'équidistance entre les cellules est élevée en conditions d'iridescence. Cette propriété reflète bien la périodicité des structures présentes. Dans les conditions contrôles, ces distances sont diverses ce qui correspond bien à un défaut d'organisation.

Les premières données de modélisation permettent de corrélérer le spectre expérimental obtenu en spectrophotométrie avec un spectre modélisé, pour un angle de détection de 30°. Les pics principaux sont retrouvés mais ne correspondent pas toujours aux valeurs expérimentales. Ces analyses sont en cours de finalisation et doivent être précisées afin de faire correspondre les données du modèle et ainsi identifier les paramètres de la structure iridescente.

Dans la nature, différent type de structures sont responsables de phénomènes d'iridescence. Les multicouches impliquent des interférences sans diffraction alors que les structures à deux ou trois dimensions sont responsables d'interférences avec diffraction. Les analyses physiques et mathématiques ont permis de caractériser la structure responsable de l'iridescence relative à la périodicité en 2D. En effet, les données de modélisation ont été réalisées sur une coupe de la colonie, les cellules sont donc représentées par des cercles. Le réseau issu des colonies de *C. lytica* CECT 8139 correspond à des interférences avec diffraction de groupes hexagonaux de cercles. La structuration en trois dimensions pourrait être analysée, cependant la modélisation démontre que la structure en 2D est suffisante pour obtenir des propriétés optiques d'iridescence. Au vu de ces résultats, les structures iridescentes de *C. lytica* CECT 8139 sont uniques. Toutefois, celles-ci ressemblent aux structures iridescentes présentes dans les soies du vers polychète *Pherusa sp.* (Trzeciak & Vukusic, 2009).

Les analyses en coloration de Gram nous renseignent sur la morphologie des cellules dans différentes conditions. Sur le milieu CYT (iridescente), les cellules de *C. lytica* CECT 8139 sont fines et allongées en forme de longs bacilles. Sur le milieu sNa (non iridescente), elles présentent une allure plus trapue et courte de type coccoïde. Ces différences de morphologie sont également visibles sur les images de MET. Cette morphologie cellulaire allongée pourrait être impliquée dans les propriétés optiques des structures et intervenir dans leur mise en place.

Depuis les premières observations et les différentes hypothèses sur les structures iridescentes bactériennes, seule l'iridescence « glitter-like » de *C. lytica* CECT 8139 a pu être expliquée dans cette thèse. Il est intéressant de se remémorer les hypothèses formulées par quelques auteurs sur l'iridescence en transillumination. Des alignements cellulaires ont été suspectés (Pijper, 1923 ; Engboeck, 1950). Nous retrouvons ces structures dans l'iridescence « glitter-like », un phénomène optique très différent et sous épi-illumination. Nous supposons alors que les réelles structures impliquées dans l'iridescence en transillumination correspondraient à des multicouches, une hypothèse de certains auteurs (Nogrady & Guérault, 1964). De plus, les colorations de l'iridescence « rainbow-diffuse » sont semblables visuellement au phénomène observé sur les bulles de savons elles-même créées par des multicouches. Afin de caractériser les différentes structures impliquées dans les diverses iridescences bactériennes, il serait intéressant d'analyser en MET un panel plus important de colonies bactériennes.

Dans cette étude, nous avons pu pour la première fois élucider des structures iridescentes bactériennes. Chez les organismes supérieurs, un même individu produit les structures iridescentes. De façon unique dans la nature, l'iridescence de *C. lytica* est générée par une population d'individus.

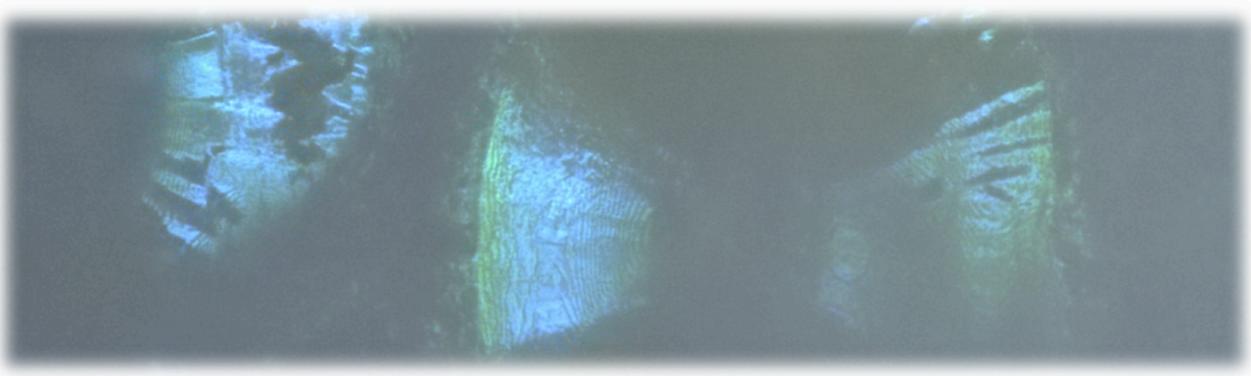
IV. Perspectives de l'étude

Le dynamisme des structures et leur mise en place seraient intéressants à suivre par des techniques de microscopie confocale. Des adaptations et des mises au point spécifiques devront être réalisées afin de marquer les cellules et d'enregistrer en ligne leur déplacement rapide. Pour ces analyses, la construction d'une souche GFP serait idéale. Dans la littérature, un plasmide a déjà été intégré par transconjugaison dans une souche proche de *C. fucicola* (Rao et al, 2005). Il semble donc possible de réaliser un marquage fluorescent sur une souche marine issue du même genre que *C. lytica*. Cependant, il n'est pas certain que la transconjugaison soit efficace chez *C. lytica* CECT 8139. Dans le Chapitre 3, nous avons observé une iridescence de *C. fucicola*. Cette souche pourrait donc servir de premier outil dans le suivi dynamique des structures et l'analyse de leur mise en place. Des analyses en microscopie confocale pourraient être envisagées lors d'un suivi de cellules individuelles marquées au sein de la colonie.

L'élucidation de ces structures est très intéressante au regard des applications possibles. Les recherches ultérieures pourraient s'appliquer dans les domaines d'études fondamentales sur les communications cellulaires, le « gliding » et le coût de l'iridescence.

La structure iridescente de *C. lytica* CECT 8139 s'est montrée originale, en particulier par l'effet pailleté produit. Sa modélisation est intéressante dans l'optique de la reproduire au niveau industriel. Egalement, par son aspect dynamique, il serait possible de réaliser des structures mouvantes qui conserveraient des propriétés optiques. Ces applications pourraient être d'intérêt pour l'industrie des nanotechnologies.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES



De nombreuses découvertes scientifiques sont accidentelles. Ce fut le cas pour la découverte de la souche iridescente de *C. lytica* CECT 8139. Des colonies aux couleurs brillantes intenses, issues d'un isolement en milieu marin, attiraient l'attention et la curiosité par leur beauté et leur singularité. Ce phénomène original était encore peu connu et détaillé. La littérature ne permettait pas de statuer sur l'iridescence de cette souche. Les travaux de cette thèse ont donc consisté à donner les bases fondamentales à la compréhension du phénomène. Nous avons allié différents domaines de compétences (microbiologie, biologie moléculaire, écologie, physique, microscopie, mathématique et analyse d'images) afin de caractériser au mieux l'iridescence de *C. lytica* CECT 8139. Pour la première fois, une couleur structurale émise par des colonies bactériennes a été étudiée en détails. L'intérêt et les perspectives du sujet ont grandi au fur et à mesure des différentes études. L'originalité des approches a nécessité la mise au point d'un grand nombre de méthodes et techniques. Ces méthodes sont maintenant disponibles pour de futures recherches sur la thématique « iridescence bactérienne ». Les résultats majeurs obtenus au cours de ces travaux de thèse sont résumés dans la Figure 44.

A travers les différentes études rapportées dans ce manuscrit, nous avons démontré qu'une observation scrupuleuse des colonies sur boîte est nécessaire. Les descriptions de nouvelles souches ne sont souvent pas assez précises pour l'identification et la compréhension de phénomènes optiques. Il semble primordial de détailler les aspects particuliers des colonies et d'employer plusieurs milieux de culture afin de préciser les phénotypes. Cette étude met notamment à jour les nombreuses confusions et ambiguïtés rencontrées dans la littérature. L'un des faits surprenant fut la perte d'information dans des versions récentes d'ouvrages de références en systématique bactérienne. Une lecture assidue de nombreux articles, provenant de sources et d'époques différentes, est par conséquent essentielle.

Les perspectives de cette étude sont diverses tant sur le plan fondamental que pour des applications biotechnologiques. L'originalité de cette thématique est illustrée par le fait que l'iridescence bactérienne n'est pas encore mentionnée dans les revues générales sur l'iridescence des organismes.

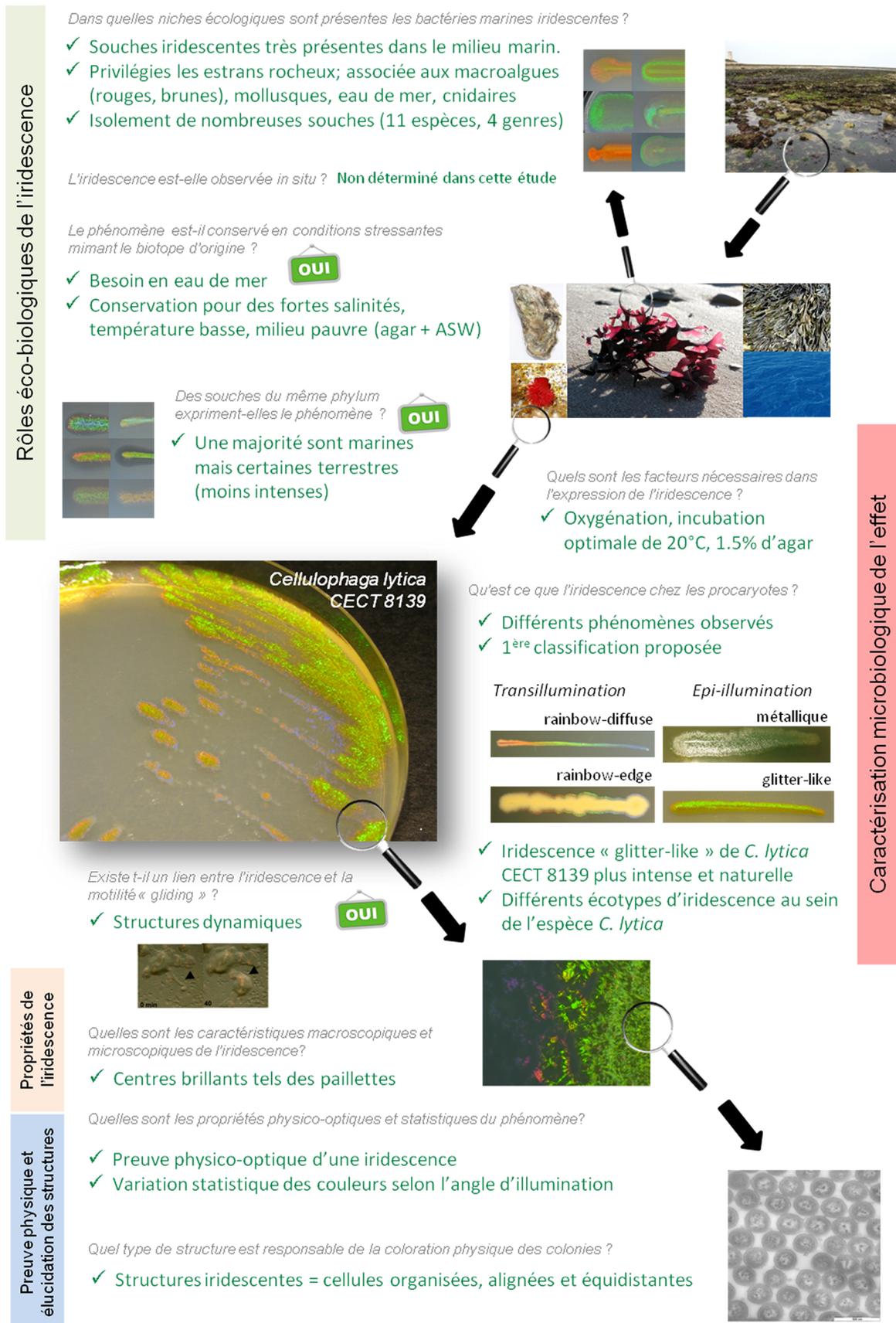


Figure 44. Schéma représentant les principaux résultats de cette thèse.

Dans nos travaux, nous avons pu démontré que les souches iridescentes « glitter-like » présentaient toutes une motilité « gliding ». Il fut surprenant de constater que des structures iridescentes, censées être périodiques, soient produites par des cellules en perpétuel mouvement au sein d'une colonie muqueuse. Cet aspect dynamique est très différent des structures statiques et inertes des autres organismes iridescents comme les papillons. Des mécanismes particuliers de communication doivent sans doute coordonner le déplacement des cellules. Des régulations par contacts pourraient être impliquées.

La machinerie complète de motilité « gliding » des *Bacteroidetes* n'est pas encore connue. Dans les plus récents travaux, il est décrit que le composant le plus externe de la machinerie de mobilité serait la protéine SprB, une adhésine de 669 kDa localisée à la surface cellulaire. Le moteur « gliding » de *F. johnsoniae* intégré à la membrane du cytoplasme est ancré aux peptidoglycanes de la paroi cellulaire. Ce moteur propulse les adhésines de surface et crée le mouvement de déplacement (Nelson et al, 2008). Dans l'étude de Sato et al (2010), un lien entre un système de translocation d'une protéine et la machinerie de motilité « gliding » des *Bacteroidetes* a été mis en évidence. Ce système de sécrétion, PorSS, est unique et directement lié à la motilité. L'adhésine SprB est spécifiquement sécrétée par ce système. Les six gènes de motilité par glissement (*gld*) seraient donc en réalité des composants de ce système de sécrétion. La corrélation entre iridescence et système de sécrétion serait intéressante à évaluer. De plus, les communications cellulaires supposées dans la structuration en réseau de la population bactérienne pourrait correspondre au système de sécrétion impliqué dans la motilité. Le modèle *C. lytica* pourrait s'avérer très intéressant pour affiner les recherches sur les mécanismes de motilité « gliding » des *Bacteroidetes*. Le modèle le plus couramment employé dans ces études est *F. johnsoniae* (Agarwal et al, 1997 ; McBride, 2004 ; Braun et al, 2005 ; Liu et al, 2007). Lors de la comparaison des *Bacteroidetes*, nous avons observé une iridescence moyennement intense de cette souche. Les outils génétiques étant déjà disponibles pour cette bactérie, son utilisation pourrait permettre des études préliminaires de « gliding » et d'iridescence.

Nous avons montré pour la première fois l'existence de structures iridescentes s'établissant au niveau d'une population d'individus. L'organisation des cellules devrait impliquer des processus de communications spécifiques. Le *quorum sensing* qui induit une communication entre les cellules à partir d'une certaine densité de population serait bien adapté à ce type de synergie (Davies et al, 1998 ; Bassler, 2002 ; Waters & Bassler, 2005 ;

Bassler & Losick, 2006). Afin d'identifier des bases génétiques du phénomène d'iridescence, nous avons séquencé le génome complet des différents écotypes iridescents (CECT 8139 et DSM 2040) et non-iridescents (DSM 2039 et CIP103822) de *C. lytica*. Ce travail, non présenté dans le mémoire, a été réalisé par la société Génoscreen dans le cadre d'une prestation de service. Les premières données indiquent que les souches de *C. lytica* possèdent plusieurs gènes *LuxR*, mais sont dénuées du gène *LuxI*, responsable de la synthèse d'homosérine lactones (molécules effectrices du *quorum sensing* des Gram -). La machinerie *quorum sensing* est donc incomplète chez *C. lytica*. De plus, nous avons pu lier l'iridescence « glitter-like » et une motilité « gliding ». Cette dernière n'est pas corrélée avec une communication par *quorum sensing* notamment du à la rapidité des déplacements cellulaires. Des mécanismes impliquant la sécrétion de métabolites « signaux » pourraient être envisagés. En effet, dans les deux mécanismes hypothétiques de la motilité « gliding » des *Cytophaga-Flavobacterium* des macromolécules dont des peptidoglycanes sont évoqués (Lapidus & Berg, 1982 ; McBride, 2004 ; Liu et al, 2007 ; Sun et al, 2011). Par ailleurs, des molécules communes aux bactéries motiles par « gliding » ont été identifiées (Fautz et al, 1979 ; Youderian, 1998). Les mécanismes intimement liés au « gliding » et les métabolites sécrétés à la surface restent à identifier. Afin de préciser les bases génétiques de l'iridescence, des mutants (simples ou multiples) pourraient être construits.

Nous avons prouvé que l'iridescence de *C. lytica* CECT 8139 est due à des structures organisées de cellules. Il s'agit donc d'une iridescence au niveau populationnel. Cette caractéristique est très différente des structures iridescentes d'organismes supérieurs (papillons et insectes) et même de microorganismes (diatomées) où les structures sont conçues par le même individu. L'iridescence de virus dans les cellules de certains invertébrés et insectes pourrait être comparable (Williams, 1996 ; 1998). Leur accumulation ou leur symétrie hélicoïdale seraient les causes de la couleur structurale (Manyakov, 1977 ; Qin et al, 2001 ; Nandhagopal et al, 2002). Cependant, il ne s'agit pas d'un processus actif, dynamique et coordonné. L'iridescence bactérienne de *C. lytica* CECT 8139 est donc singulière.

Dans les revues générales sur l'iridescence biologique, l'une des questions restant en suspens est le coût bioénergétique de la production des structures iridescentes (Meadows et al, 2009). Nous pensons que l'utilisation d'un modèle simple tel une bactérie permettrait de répondre en partie à cette question. De plus, le coût énergétique pourrait être estimé pour chaque cellule.

Pour des raisons techniques et par manque de temps, deux questions majeures n'ont pas pu être approfondies au cours de cette étude. La première de ces questions est de savoir si l'iridescence bactérienne est observée directement dans l'environnement marin. Des prospections pourront être mises en place à l'avenir pour répondre à cette question écologique majeure. De plus, les rôles biologiques et écologiques du phénomène n'ont pas pu être déterminés. Dans son biotope, les rôles sont supposés non-communicatifs (photoprotection, thermorégulation, répulsion d'eau, propriété antisalissure ou résistance mécanique). Toutes ces fonctions seraient un avantage pour la bactérie elle-même, voir pour son hôte dans le cas d'association avec des macroorganismes marins. Le recrutement de bactéries d'intérêt par des macroalgues est par ailleurs déjà décrit (Davis et al, 1989 ; Armstrong et al, 2001 ; Harder, 2009 ; Goecke et al, 2010).

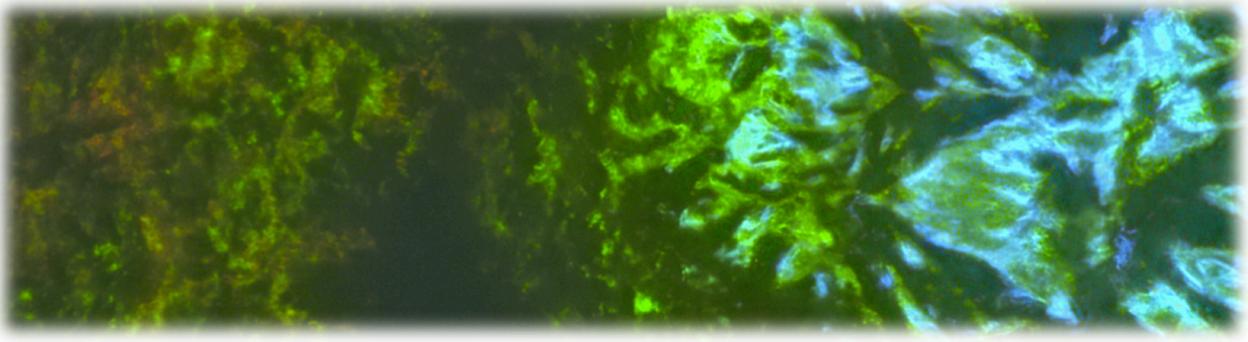
Lors d'une étude préliminaire, nous avons souhaité étudier le rôle de photoprotection car celui-ci est décrit comme fonction de l'iridescence de certaines macroalgues. Ces expérimentations ont été menées au laboratoire ARAGO (observatoire de Banyuls-sur mer) en collaboration avec le Dr Fabien Joux. Ce type d'analyse, correspondant à l'exposition de bactéries à de forts rayonnements, se réalise habituellement sur des suspensions cellulaires (Agogué et al, 2005). L'adaptation du protocole à des colonies sur boîte fut difficile et les résultats préliminaires ne nous ont pas permis de conclure sur un rôle de l'iridescence dans la photoprotection. Une mise au point importante reste à réaliser. Des analyses pour chaque rôle biologique potentiel sont également à entreprendre. Des travaux sont actuellement menés au laboratoire pour étudier un rôle éventuel de thermorégulation. Une caméra thermique IR est également utilisée pour ces essais préliminaires.

L'étude des rôles associés à l'iridescence est très intéressante dans le cas d'applications dans les domaines de la biomimétique et des nanotechnologies. La biomimétique s'inspire de la nature afin de reproduire des propriétés techniques, biologiques et écologiques. La biomimétique de structures iridescentes est récente (Vukusic, 2004 ; Zhang et al, 2006 ; Large et al, 2007 ; Parker & Townley, 2007 ; Lenau & Barfoed, 2008 ; Bhushan, 2009 ; Meadows et al, 2009 ; Parker, 2009 ; Wu et al, 2010 ; Finnemore et al, 2012). Les matériels iridescents sont retrouvés dans des peintures, maquillage et éléments d'anti-contrefaçon (hologrammes). La demande de produits avec des couleurs intenses est importante. Dans certaines études les caractéristiques de coloration intense, mais également les propriétés de photorécepteur ou de matériel hygronomique sont reprises. Par exemple, les structures photoréceptrices de

diatomées optimisent la photosynthèse en diffractant les longueurs d'ondes vers les chloroplastes (Noyes et al, 2008). Ces structures ont été reproduites dans la construction de cellules solaires (De Stephano et al, 2009 ; Gordon et al, 2009 ; Townley, 2011). Le matériel brut a pu être obtenu par culture (Parker & Townley, 2007). Les structures iridescentes « glitter-like » pourraient ajouter une plus-value dans ces études par leur dynamisme et par la facilité de culture de ces bactéries marines. Il est cependant important de noter qu'un biofilm muqueux iridescent montre une certaine fragilité en comparaison avec d'autres structures.

Les bactéries marines ont déjà démontré un fort potentiel biotechnologique dans des champs d'applications divers. Ces travaux montrent bien l'étendue des recherches possibles et l'intérêt tant sur le plan fondamental qu'appliqué de l'iridescence de *C. lytica*. L'iridescence ouvre un nouveau champ d'étude dans la biomimétique et les nanotechnologies.

REFERENCES



- Adachi M, Fukami K, Kondo R & Nishijima T (2002) Identification of marine algicidal *Flavobacterium* sp. 5 N-3 using multiple probes and whole-cell hybridization. *Fisheries Sci* 68: 713–720.
- Agarwal S, Hunnicutt DW & McBride MJ (1997) Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsoniae* (*Cytophaga johnsonae*) gliding motility gene, *gldA*. *Proc Nat Acad Sci* 94: 12139–12144.
- Agogué H, Joux F, Obernosterer I & Lebaron P (2005) Resistance of marine bacterioneuston to solar radiation. *Appl Environ Microbiol* 71(9): 5282–5289.
- Aizenberg J, Sundar VC, Yablon AD, Weaver JC & Chen G (2004) Biological glass fibers: correlation between optical and structural properties. *Proc Nat Acad Sci* 101: 3358–3363.
- Alieva NO, Konzen KA, Field SF, Meleshkevitch EA, Hunt M, et al (2008) Diversity and evolution of coral fluorescent proteins. *PloS one* 3: e2680.
- Armstrong E, Yan L, Boyd K, Wright P & Burgess J (2001) The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia* 461: 37–40.
- Azam F (1998) Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science* 280: 694–696.
- Barthlott W & Neinhuis C (1997) Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 202: 1–8.
- Bassler BL (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109: 421–424.
- Bassler BL & Losick R (2006) Bacterially speaking. *Cell* 125: 237–246.
- Barnhart RK & Steinmetz Sol (1988) The Barnhart dictionary of etymology. Wilson HW Co publisher. Bronx, NY. 1284 pp. ISBN: 9780824207458.
- Bautz A-M (2005) La bioluminescence chez les animaux. *Bulletin de l'Académie Lorraine des Sciences* 44: 1–4.
- Beleneva IA & Zhukova NV (2006) Bacterial communities of brown and red algae from Peter the Great Bay, the Sea of Japan. *Mikrobiologiya* 75: 410–419.
- Berditsch M, Afonin S & Ulrich AS (2007) The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Appl Environ Microbiol* 73: 6620–6628.
- Bernardet J-F & Nakagawa Y (2006) An introduction to the family *Flavobacteriaceae*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd ed, vol 7, p. 455–480. Springer, New York.
- Bernardet JF & Bowman JP (2011) Genus I. *Flavobacterium* Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Huntoon 1923, 97^{AL} emend. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, et al (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*, 2nd ed, vol 4, p. 112–176. Springer, New York Dordrecht Heidelberg London.

- Bernardet JF, Segers P, Vancanneyt M, Berth F, Kersters K & Vandamme P (1996) Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int J Syst Bacteriol* 46: 128–148.
- Berthé RA, Westhoff G, Bleckmann H & Gorb SN (2009) Surface structure and frictional properties of the skin of the Amazon tree boa *Corallus hortulanus* (Squamata, Boidae). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 195: 311–318.
- Berthier S (2010) *Photonique des Morphos*. Paris, Springer France. ISBN 2287094075, 300 pp.
- Berthier S (2003) *Iridescence, les couleurs physiques des insectes*. Paris, Springer-Verlag France. 232 pp. ISBN 2287005072.
- Bhushan B (2009) Biomimetics: lessons from nature-an overview. *Phil Trans R Soc A* 2367: 1445–1486.
- Biró LP, Bálint Z, Kertész K, Vértesy Z, Márk GI, et al (2003) Role of photonic-crystal-type structures in the thermal regulation of a Lycaenid butterfly sister species pair. *Phys Rev E* 67: 021907.
- Bloem J, Veninga M & Shepherd J (1995) Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes, and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Appl Environ Microbiol* 61: 926–936.
- Bolinches J, Lemos ML & Barja JL (1988) Population dynamics of heterotrophic bacterial communities associated with *Fucus vesiculosus* and *Ulva rigida* in an estuary. *Microb Ecol* 15: 345–357.
- Bonser RHC (1995) Melanin and the abrasion resistance of feathers. *Condor* 97: 590–591.
- Bosi SG, Hayes J, Large MC & Poladian L (2008) Color, iridescence, and thermoregulation in Lepidoptera. *Appl Opt* 47(29): 5235–5241.
- Bowman JP (2006) The marine clade of the family *Flavobacteriaceae*: the genera *Aequorivita*, *Arenibacter*, *Cellulophaga*, *Croceibacter*, *Formosa*, *Gelidibacter*, *Gillisia*, *Maribacter*, *Mesonina*, *Muricauda*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychroserpens*, *Robiginitalea*, *Salegentibacter*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd ed, vol 7, p. 677–694. Springer, New York.
- Bowman JP (2011) Genus IX. *Cellulophaga* Johansen, Nielsen and Sjøholm 1999, 1238^{VP} In : Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology, The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*, 2nd ed, vol 4, p. 176–180. Springer, New York Dordrecht Heidelberg London.
- Bowman JP (2000) Description of *Cellulophaga algicola* sp. nov., isolated from the surfaces of Antarctic algae, and reclassification of *Cytophaga uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Cellulophaga uliginosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1861–1868.
- Braun TF, Khubbar MK, Saffarini DA & McBride MJ (2005) *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility genes identified by mariner mutagenesis. *J Bact* 187: 6943–6952.

- Brink DJ, van der Berg NG, & Botha AJ (2002) Iridescent colors on seashells: an optical and structural investigation of *Helcion pruinosus*. *Appl Optics* 41: 717–722.
- Brinkmeyer R, Knittel K, Jurgens J, Weyland H, Amann R & Helmke E (2003) Diversity and Structure of Bacterial Communities in Arctic versus Antarctic Pack Ice. *Appl Environ Microbiol* 69: 6610-6619.
- Brogden KA (1980) Physiological and serological characteristics of 48 *Pasteurella multocida* cultures from rabbits. *J Clin Microbiol* 11: 646–649.
- Bromfield SM (1953) Sulphate reduction in partially sterilized soil exposed to air. *J Gen Microbiol* 8 (3): 378-390.
- Brown MV & Bowman JP (2001) A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiol Ecol* 35: 267–275.
- Buck JD (1974) Effects of medium composition on the recovery of bacteria from seawater. *J Exp Mar Biol Ecol* 15: 25–34.
- Butler MW & Johnson AS (2004) Are melanized feather barbs stronger? *J Exp Biol* 207: 285–293.
- Burchard R & Sorongon M (1998) A gliding bacterium strain inhibits adhesion and motility of another gliding bacterium strain in a marine biofilm. *Appl Environ Microbiol* 64: 4079–4083.
- Button DKF, Schut F, Quang P, Martin R & Robertson BR (1993) Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microbiol* 59: 881–891.
- Buxton R (2005) Blood Agar Plates and Hemolysis: Non-Fermenting Gram-Negative Rods (including *Pseudomonas aeruginosa*). *ASM Conference for Undergraduate Education*.
- Cabioc'h J, Floc'h J-Y, Le Toquin A, Boudouresque C-F, Meinesz A & Verlaque M (2006). Guide des algues des mers d'Europe (Manche, Atlantique et méditerranée). Delachaux et Niestlé, Paris. 272 pp. ISBN 978-2-603-00848-5.
- Carlson CA & Ducklow HW (1995) Dissolved organic carbon in the upper ocean of the central Equatorial Pacific, 1992: daily fine-scale vertical variations. *Deep-sea Res II* 42: 639–656.
- Carter GR (1962) Further Observations on Typing *Pasteurella Multocida* by the Indirect Hemagglutination Test. *Can J Comp Med Vet Sci* 26: 238–240.
- Cattaneo-Vietti R, Bavestrello G, Cerrano C, Sarà A, Benatti U, et al (1996) Optical fibres in an Antarctic sponge. *Nature* 383: 397–398.
- Cavalier-Smith T (2002) The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 7-76.
- Champlin FR, Patterson CE, Austin FW & Ryals PE (1999) Derivation of extracellular polysaccharide-deficient variants from a serotype A strain of *Pasteurella multocida*. *Curr Microbiol* 38: 268-272.
- Chandler CA, Fothergill LD & Dingle JH (1939) The pattern of dissociation in *Hemophilus influenzae*. *J Bacteriol* 37: 415–427.

- Chelossi E, Milanese M, Milano A, Pronzato R, Riccardi G, et al (2004) Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *J Exp Mar Biol Ecol* 309(1): 21–33.
- Choi DH, Kim Y-G, Hwang CY, Yi H, Chun J, Cho BC (2006) *Tenacibaculum litoreum* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *Int J Syst Bacteriol* 56: 635–640.
- Colombo PM (1978) Occurrence of endophytic bacteria in siphonous algae. *Phycologia* 17: 148–151.
- Cornelis P & Matthijs S (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ Microbiol* 4: 787–798.
- Cottrell MT & Kirchman DL (2000) Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl Environ Microbiol* 66: 1692–1697.
- Craigie JS, Correa JA & Gordon ME (1992) Cuticles from *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *J Phycol* 28: 777–786.
- Crowson RA (1981) The biology of the Coleoptera. Academic Press, New York, NY. 802 pp. ISBN: 0121960501.
- Cugini C, Morales DK & Hogan DA (2010) *Candida albicans*-produced farnesol stimulates *Pseudomonas* quinolone signal production in LasR-defective *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microbiology* 156: 3096–3107.
- Dangeard P (1941) Recherches sur les enclaves iridescentes de la cellule des algues. *Le Botaniste* 31: 31–63.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW & Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295–298.
- Davis AR, Targett NM, McConnell OJ, Young CM, et al (1989) Epibiosis of marine algae and benthic invertebrates: natural products chemistry and other mechanisms inhibiting settlement and overgrowth. *Bioorg Mar chem* 3: 85–114.
- DeAngelis PL, Jing W, Drake RR & Achyuthan AM (1998) Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. *J Biol Chem* 273: 8454–8458.
- De Kruif PH (1921) Dissociation of microbic species: I. Coexistence of individuals of different degrees of virulence in cultures of the Bacillus of rabbit septicemia. *J Exp Med* 33: 773–789.
- de Nys R & Steinberg PD (2002) Linking marine biology and biotechnology. *Curr Opin Biotech* 13: 244–248.
- De Stefano L, Rotiroti L, De Stefano M, Lamberti A, Lettieri S, et al (2009) Marine diatoms as optical biosensors. *Biosens Bioelectron* 24 (6): 1580–1584
- Dickinson L (1948) The bacteriophages of *Pseudomonas pyocyanea*: 1. The effect of various substances upon their development. *J Gen Microbiol* 2: 154–161.

- Dickinson L & Codd S (1952) The bacteriophages of *Pseudomonas pyocyanea*: 2. Bacteriophage reproduction in an iridescent strain. *J Gen Microbiol* 6: 1–13.
- Dominguez Rodriguez L, Suárez Fernández G, Fernández Garayzabal JF & Rodriguez Ferri E (1984) New methodology for the isolation of *Listeria* microorganisms from heavily contaminated environments. *Appl Environ Microbiol* 47: 1188–1190.
- Don PA & van den Ende M (1950) A preliminary study of the bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hyg* 48: 196–214.
- Doucet SM & Meadows MG (2009) Iridescence: a functional perspective. *J R Soc Interface* 6(Suppl. 2): S115–S132.
- Doucet SM, Shawkey MD, Hill GE & Montgomerie R (2006) Iridescent plumage in satin bowerbirds: structure, mechanisms and nanostructural predictors of individual variation in colour. *J Exp Biol* 209: 380–390.
- Doucette GJ, McGovern ER, Babinchak JA (1999) Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterisation of killing activity. *J Phycol* 35: 1447–1454.
- Douglas RH & Marshall NJ (1999) A review of vertebrate and invertebrate ocular filters. In: Archer SN, Djamgoz MBA, Loew ER, Partridge JC & Vallerga S (eds). *Adaptive mechanisms in the ecology of vision*. pp. 95–162. Springer, New York.
- Du H, Jiao N, Hu Y & Zeng Y (2006) Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 92–105.
- Ducret A, Maisonneuve E, Notareschi P, Grossi A, Mignot T & Dukan S (2009) A microscope automated fluidic system to study bacterial processes in real time. *PLoS One* 4(9): e7282.
- Dunlap P & Kita-Tsukamoto K (2006) Luminous bacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, & Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria*. pp. 863–892. Springer, New York.
- Duxbury T, Humphrey BA & Marshall KC (1980) Continuous observations of bacterial gliding motility in a dialysis microchamber: the effects of inhibitors. *Arch Microbiol* 124: 169–175.
- D'Argenio DA, Wu M, Hoffman LR, Kulasekara HD, Déziel E, et al (2007) Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol* 64: 512–533.
- Egan S, Thomas T, Holmström C & Kjelleberg S (2000) Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environ Microbiol* 2: 343–347.
- Eilers H, Pernthaler J, Glöckner FO & Amann R (2000) Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl Environ Microbiol* 66: 3044–3051.
- Elmoataz A, Meurie C & Lezoray O (2003) Segmentation d'images couleur par fusion de classification de pixels. *Application en imagerie biomédicale*. https://lezoray.users.greyc.fr/Publis/meurie_AFIG03.pdf

- Engboek HC (1950) The phenomenon of iridescence in bacterial cultures, with particular reference to Pfeiffer's bacillus. *Acta Path Micro* 27: 388–393.
- Fandino LB, Riemann L, Steward GF & Azam F (2005) Population dynamics of *Cytophaga-Flavobacteria* during marine phytoplankton blooms analyzed by real-time quantitative PCR. *Aquatic Microb Ecol* 40: 251–257.
- Fandino LB, Riemann L, Steward GF, Long RA & Azam F (2001) Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analysed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquatic Microb Ecol* 23: 119–130.
- Farrell MA & Turner HG (1932) Bacteria in Anthracite Coal. *J Bacteriol* 23 (2): 155–162.
- Fautz E, Rosenfelder G & Grotjahn L (1979) Iso-branched 2- and 3-hydroxy fatty acid as characteristic lipid constituents of some gliding bacteria. *J Bacteriol* 140: 852–858.
- Felsenstein J (2007) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6a3. *Distributed by the author, Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.*
- Fenchel TM & Jørgensen BB (1977) Detritus food chains of aquatic ecosystems: the role of bacteria. In: Alexander M (ed). *Advances in Microbial Ecology*. I. 58 pp. Plenum Press, New York.
- Finnemore A, Cunha P, Shean T, Vignolini S, Guldin S, et al (2012) Biomimetic layer-by-layer assembly of artificial nacre. *Nat Comm* 3: 966.
- Fournet I, Deslandes E & Floc'h J (1993) Iridescence: a useful criterion to sort gametophytes from sporophytes in the red alga *Chondrus crispus*. *J Appl Phycol* 5(5): 535–537.
- Fox DL (1976) *Animal biochromes and structural colours: physical, chemical, distributional & physiological features of coloured bodies in the animal world*. 2nd ed. University of California Press, CA.
- Fuhrmann SL, El Rharbi-Kucki M & Sumper M (2004) Diatoms as living photonic crystals. *Appl Phys B* 78: 257–260.
- Froesch D & Messenger JB (1978) On leucophores and the chromatic unit of *Octopus vulgaris*. *Aust J Zool* 186: 163–173.
- Gans C & Baic D (1977) Regional specialization of reptilian scale surfaces: relation of texture and biologic role. *Science* 195: 1348–1350.
- Georgia FR & Poe CF (1931) Study of Bacterial Fluorescence in Various Media: I. Inorganic Substances Necessary for Bacterial Fluorescence. *J Bacteriol* 22(5): 349–361.
- Gerwick WH & Lang NJ (1977) Structural, chemical and ecological studies on iridescence in *Iridaea* (Rhodophyta). *J Phycol* 13: 121–127.
- Ghiradella H (1991) Light and color on the wing: structural colors in butterflies and moths. *Appl Optics* 30: 3492–3500.
- Giraud E & Verméglio A (2008) Bacteriophytochromes in anoxygenic photosynthetic bacteria. *Photosynthesis research* 97: 141–153.

- Glöckner FO, Fuchs BM & Amann R (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65: 3721-3726.
- Glover BJ & Whitney HM (2010) Structural colour and iridescence in plants: the poorly studied relations of pigment colour. *Ann Bot* 105: 505–511.
- Goecke F, Labes A, Wiese J & Imhoff JF (2010) Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 409: 267–300.
- Gordon R, Losic D, Tiffany MA, Nagy SS & Sterrenburg FAS (2009) The glass menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology. *Trends Biotechnol* 27: 116–127.
- Gower DJ (2003) Scale microornamentation of uropeltid snakes. *J Morphol* 258: 249–268.
- Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, et al (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Micr* 60: 1280–1288.
- Gray L (2010) Health and medicine adapting to clogged airways makes common pathogen resist powerful antibiotics - even without previous exposure.
<http://uwnews.washington.edu/ni/article.asp?articleID=55541>
- Greenewalt CH, Brandt W & Friel DD (1960) The iridescent colors of hummingbird feathers. *P Am Philos Soc* 104: 249–253.
- Grossart H-P, Levold F, Allgaier M, Simon M & Brinkhoff T (2005) Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ Microbiol* 7: 860–873.
- Guillot M (1941) Relation entre certaines propriétés optiques des bactéries et leur forme géométrique vraie. Diffraction de la lumière par les cultures et symétrie de la bactérie. *Cr Acad Sci* 1100–1103.
- Guillot M (1942) Critères physiques d'homogénéité d'une culture de microbes vivants. *C R Soc Biol* 720–721.
- Guindon S & Gascuel O (2003) A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704.
- Haddock SHD, Moline MA & Case JF (2010) Bioluminescence in the Sea. *Ann Rev Mar Science* 2: 443-493.
- Hadley P (1924) Transmissible Lysis of *Bacillus pyocyaneus*. *J Infect Dis* 34: 260–304.
- Harder T (2009) Marine epibiosis: concepts, ecological consequences and host defence. In: Flemming H, Murthy P, Venkatesan R & Cooksey K (eds). *Marine and industrial biofouling*. pp. 219–231. Springer fouling, Berlin, Heidelberg.
- Hari RK, Patel TR & Martin AM (1994) An overview of pigment production in biological systems: functions, biosynthesis, and applications in food industry. *Food Rev Int* 10(1): 49-70.
- Harshey RM (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Ann Rev Microbiol* 57: 249-273.

- Hastings JW (1983) Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *J Mol Evol* 19 (5): 309–321.
- Hastings JW (1996) Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene* 173: 5–11.
- Hayward PJ, Nelson-Smith T & Shields C (2009) Guide des Bords de mer, Mer du Nord, Manche, Atlantique, Méditerranée. 352 pp. Delachaux et Niestlé, Paris.
- Heddleston KL & Wessman G (1975) Characteristics of *Pasteurella multocida* of human origin. *J Clin Microbiol* 1: 377–383.
- Heilman BD & Miaoulis IN (1994) Insect thin films as solar collectors. *Appl Opt* 33: 6642–6647.
- Hendrie MS, Hodgkiss W & Shewan JM (1970) The identification, taxonomy and classification of luminous bacteria. *J Gen Microbiol* 64: 151–169.
- Henrici AT (1925) On cytomorphosis in bacteria. *Science* 61 (1591): 644–647.
- Hinton HE (1969) Diffraction gratings in burying beetles (*Nicrophorus*). *Entomologist* 102: 185–189.
- Hinton DE & Jarman G (1972) Physiological colour change in the Hercules beetle. *Nature* 238: 160–161.
- Hoffman LR, Kulasekara HD, Emerson J, Houston LS, Burns JL, et al (2009) *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J Cyst Fibros* 8: 66–70.
- Hollants J, Decleyre H, Leliaert F, De Clerck O & Willems A (2011a) Life without a cell membrane: challenging the specificity of bacterial endophytes within *Bryopsis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *BMC Microbiology* 11: 255.
- Hollants J, Leroux O, Leliaert F, Decleyre H, De Clerck O & Willems A (2011b) Who is in there? Exploration of endophytic bacteria within the siphonous green seaweed *Bryopsis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *PLoS one* 6: e26458.
- Hollants J (2012) Endophytic bacteria within the green siphonous seaweed *Bryopsis*: Exploration of a partnership. Thesis 174 pp.
- Huang SY & Hadfield MG (2003) Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *Mar Ecol Prog Ser* 260: 161–172.
- Imai I, Fujimaru D, Nishigaki T, Kurosaki M & Sugita H (2006) Algicidal bacteria isolated from the surface of seaweeds from the coast of Osaka Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *Afr J Mar Sci* 28: 319–323.
- Imai I, Ishida Y & Hata Y (1993) Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga sp.* isolated from the coastal sea of Japan. *Mar Biol* 116: 527–532.
- Imshenetskay AA & Solntseval L (1936). On aerobic cellulose-decomposing bacteria. *Publ Acad Sci USSR Mat-Nat Sci* 6 : 11-15.
- Izumi M, Sweeney AM, Demartini D, Weaver JC, Powers ML, et al (2010) Changes in reflectin protein phosphorylation are associated with dynamic iridescence in squid. *J R Soc Interface* 7 (44): 549–560.

- Jackson AP, Vincent JFV & Turner RM (1988) The mechanical design of nacre. *Proc R Soc B* 234: 415–440.
- Jasmin AM (1945) An improved staining method for demonstrating bacterial capsules, with particular reference to *Pasteurella*. *J Bacteriol* 50: 361–363.
- Jensen PR, Kauffman CA & Fenical W (1996) High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Mar Biol* 126: 1–7.
- Johansen JE, Nielsen P & Sjøholm C (1999) Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Micr* 49: 1231–1240.
- Jung SY, Oh TK & Yoon JH (2006) *Tenacibaculum aestuarii* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment in Korea. *Int J Syst Evol Micr* 56: 1577–1581.
- Kahng HY, Chung BS, Lee DH, Jung JS, Park JH & Jeon CO (2009) *Cellulophaga tyrosinoxydans* sp. nov., a tyrosinase-producing bacterium isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 654–657.
- Kawaguti S (1944) On the physiology of reef corals VI. Study on the pigments. *Palao Trop Biol Stat Stud* 2: 617–674.
- Kelecom A (2002) Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 74: 151–170.
- Kirchman DL (2002) The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 39: 91–100.
- Kirchman DL, Dittel AI, Findlay SEG & Fischer D (2004) Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in the Hudson River, New York. *Aquat Microb Ecol* 35: 243–257.
- Kirchman DL, Yu LY & Cottrell MT (2003) Diversity and abundance of uncultured *Cytophaga*-like bacteria in the Delaware Estuary. *Appl Environ Microbiol* 69: 6587–6596.
- Kobayashi J & Ishibashi M (1993) Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem Rev* 93(5): 1753–1769.
- Kobelt F & Linsenmair KE (1992) Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. VI. The iridophores in the skin as radiation reflectors. *J Comp Physiol B* 162: 314–326.
- Kolmonen E, Sivonen K, Rapala J & Haukka K (2004) Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland. *Aquat Microb Ecol* 36: 201–211.
- Kondo R, Imai I, Fukami K, Minami A & Hiroishi S (1999) Phylogenetic analysis of algicidal bacteria (Family *Flavobacteriaceae*) and selective detection by PCR using a specific primer set. *Fish Sci* 65: 432–435.
- Kong MK & Chan K-Y (1979) A study on the bacterial flora isolated from marine algae. *Bot Mar* 22: 83–97.

- Koon DW & Crawford AB (2000) Insect thin films as sun blocks, not solar collectors. *Appl Opt* 39: 2496–2498.
- Kornprobst J-M (2005) Substances naturelles d'origine marine : chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologie (deux volumes). 1800 pp. Technique & documentation editor.
- Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, et al (2011) Bergey's manual of systematic bacteriology, The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. 2nd ed, Vol 4, 948 pp. Springer, New York Dordrecht Heidelberg London.
- Kucki (2009) Biological Photonic Crystals: Diatoms. Thesis. 166 pp.
- Kuyper MA (1985) The ecology of the golden mole *Amblysomus hottentotus*. *Mammal Rev* 15: 3–11.
- Land M (1972) The physics and biology of animal reflectors. *Prog Biophys Mol Biol* 24: 75–106.
- Lapidus IR & Berg HC (1982) Gliding motility of *Cytophaga* sp. strain U67. *J Bacteriol* 151: 384–398.
- Large MCJ, Wickham S, Hayes J & Poladian L (2007) Insights from nature: Optical biomimetics. *Physica B: Condensed Matter* 394 (2): 229-232.
- Laycock RA (1974) The detrital food chain based on seaweeds. I. Bacteria associated with the surface of *Laminaria* fronds. *Mar Biol* 25: 223–231.
- Lee DW (1991) Ultrastructural basis and function of iridescent blue colour of fruits in *Elaeocarpus*. *Nature* 349: 260–262.
- Lee J (2008) Bioluminescence: the First 3000 Years. *J Sib Fed U Biology* 3: 194-205.
- Lee DW & Lowry JB (1975) Physical basis and ecological significance of iridescence in blue plants. *Nature* 254: 50-51.
- Lee DW, Taylor GT & Irvine AK (2000) Structural fruit coloration in *Delarbea michieana* (Araliaceae). *Int J Plant Sci* 161: 297–300.
- Lenau T & Barfoed M (2008) Colours and Metallic Sheen in Beetle Shells - A Biomimetic Search for Material Structuring Principles Causing Light Interference. *Adv Eng Mater* 10: 299–314.
- Lewin RA (1969) A classification of flexibacteria. *Microbiology* 58(2): 189-206.
- Lewin RA & Lounsbery DM (1969) Isolation, cultivation and characterization of flexibacteria. *Microbiology* 58(2): 145-170.
- Liu F, Dong BQ, Liu XH, Zheng YM & Zi J (2009) Structural color change in longhorn beetles *Tmesisternus isabellae*. *Opt Express* 17: 16183–16191.
- Liu J, McBride MJ & Subramaniam S (2007) Cell surface filaments of the gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* revealed by cryo-electron tomography. *J Bacteriol* 189(20): 7503-7506.

- Liu GY & Nizet V (2009) Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in microbiology* 17: 406–413.
- Liu Y, Shigley J & Hurwit K (1999) Iridescent color of a shell of the mollusk *Pinctada margaritifera* caused by diffraction. *Opt Express* 4: 177–182.
- Longford SR, Tujula NA, Crocetti GR, Holmes AJ, Holmström C, et al (2007) Comparison of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes. *Aquat Microb Ecol* 48: 217–229.
- Losi A & Gärtner W (2008) Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors. *Photochem Photobiol Sci* 7: 1168–1178.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, et al (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32: 1363–1371.
- Luppi A, Rocourt J, Bucci G & Maini P (1986) Isolement de *Listeria* de l'eau du Pô. *Boll Ist Sieroter Milan* 65: 108–111.
- Lythgoe JN (1975) Structure and function of iridescent corneas in teleost fishes. *Proc R Soc B* 188: 437–457.
- Lythgoe JN & Shand J (1989) The structural basis for iridescent colour changes in dermal and corneal iridophores in fish. *J Exp Biol* 141: 313–325.
- Majumdar P, Lee E, Patel N, Ward K, Stafslie SJ, et al (2008) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings IX: an investigation of novel antifouling/fouling-release coatings containing quaternary ammonium salt groups. *Biofouling* 24(3): 185–200.
- Majumdar P, Crowley E, Htet M, Stafslie SJ, Daniels J, et al (2011) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings XV: an investigation of polysiloxane anti-fouling/fouling-release coatings containing tethered quaternary ammonium salt groups. *ACS combinatorial science* 13(3): 298–309.
- Mangenot G (1933) Sur les corps irisants de quelques Rhodophycées. *C R Soc Biol* 122: 659–664.
- Manyakov VF (1977) Fine structure of the iridescent virus type 1 capsid. *J Gen Virol* 36: 73–79.
- Maresca JA, Graham JE & Bryant DA (2008) The biochemical basis for structural diversity in the carotenoids of chlorophototrophic bacteria. *Photosynth Res* 97: 121–140.
- Martin P & MacLeod RA (1984) Observations on the distinction between oligotrophic and eutrophic marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 47: 1017–1022.
- Mäthger LM, Denton EJ, Marshall NJ & Hanlon RT (2009) Mechanisms and behavioral functions of structural coloration in cephalopods. *J R Soc* 6: S149–S163.
- Mäthger LM & Hanlon RT (2007) Malleable skin coloration in cephalopods: selective reflectance, transmission and absorbance of light by chromatophores and iridophores. *Cell Tissue Res* 329: 179–186.
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, et al (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotech* 17: 969–973.

- Matz MV, Marshall NJ & Vorobyev M Are corals colorful ? *Photochem Photobiol* 82: 345–350.
- Mayer AMS, Rodríguez AD, Berlinck RGS, Hamann MT, et al (2009) Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1790(5): 283-308.
- McAndrew A (2004) An introduction to digital image processing with MATLAB. Brooks/Cole, Pacific Grove, Calif. ISBN 9780534400118. 592 pp.
- McBride MJ (2001) Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol* 55: 49–75.
- McBride MJ (2004) *Cytophaga-Flavobacterium* gliding motility. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7: 63–71.
- McCarthy CJ (1987) Sea snake puzzles. In: Van Gelder JJ, Strijbosch H & Bergers PJM (eds). Proc 4th Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica. Nijmegen: Societas Europaea Herpetologica. p 279–284.
- Mauriello EMF, Mignot T, Yang Z & Zusman DR (2010) Gliding motility revisited: how do the myxobacteria move without flagella ? *Microbiol Mol Biol R* 74(2): 229–249.
- Meadows MG, Butler MW, Morehouse NI, Taylor LA, Toomey MB, et al (2009) Iridescence: views from many angles. *J R Soc Interface* 6(Suppl. 2): S107–S113.
- Meighen EA (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev* 55:123–142.
- Meyer JM & Abdallah MA (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens* Biosynthesis, purification and physical-chemical properties. *J Gen Microbiol* 107: 319–328.
- Meyer JM (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch of Microbiol* 174(3): 135–142.
- van der Meulen HJ, Harder W & Veldkamp H (1974) Isolation and characterization of *Cytophaga flevensis* sp. n., a new agarolytic flexibacterium. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol* 40: 329–346.
- Miaoulis IN & Heilman BD (1998) Butterfly thin films serve as solar collectors. *Ann Entomol Soc Am* 91: 122–127.
- Mitsutani A, Takesue K, Kirita M & Ishida Y (1992) Lysis of *Skeletonoma costatum* by *Cytophaga* sp. isolated from the coastal water of the Ariake Sea. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 2158 – 2167.
- Mojica KDA & Cooney MJ (2010) The uronic acids assay: a method for the determination of chemical activity on biofilm EPS. *Biofouling* 26: 301–312.
- Moore B (1909) Observations on Certain Marine Organisms of (a) Variations in Reaction to Light, and (b) a Diurnal Periodicity of Phosphorescence. *Biochem J* 4: 1–29.
- Morin JG (1983) Coastal Bioluminescence: Patterns and Functions. *Bull Mar Sci* 33(4): 787-817.

- Morozumi T & Nicolet J (1986) Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *J Clin Microbiol* 23: 138–142.
- Moss M (2002) Bacterial pigments. *Microbiologist* 10-12. <http://www.sfam.org.uk>
- Mulder J (1939) *Haemophilus influenzae* of the respiratory type as a cause of purulent meningitis. *J Pathol Bacteriol* 48: 175–185.
- Murray AE & Grzymalski JJ (2007) Diversity and genomics of Antarctic marine micro-organisms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B / Philosophical Transactions B* 362: 2259–2271.
- Nagaishi H & Oshima N (1992) Ultrastructure of the motile iridophores of the neon tetra. *Zool Sci* 9: 65–75.
- Nagasaki K, Yamaguchi M & Imai I (2000) Algicidal activity of a killer bacterium against the harmful red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* isolated from Ago Bay Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 66: 666–673.
- Nakagawa Y & Yamasato K (1993) Phylogenetic diversity of the genus *Cytophaga* revealed by 16S rRNA sequencing and menaquinone analysis. *J Gen Microbiol* 139(6): 1155–1161.
- Nandhagopal N, Simpson AA, Gurnon JR, Yan X, Baker TS, et al (2002) The structure and evolution of the major capsid protein of a large, lipid-containing DNA virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 14758–14763.
- Nealson KH (1978) Isolation, identification, and manipulation of luminous bacteria. *Methods Enzymol* 57: 153-156.
- Nelson SS, Bollampalli S & McBride MJ (2008) SprB is a cell surface component of the *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility machinery. *J Bact* 190: 2851–2857.
- Nealson KH & Hastings JW (2006) Quorum sensing on a global scale: massive numbers of bioluminescent bacteria make milky seas. *Appl Environ Microbiol* 72: 2295–2297.
- Nedashkovskaya OI (2004) *Cellulophaga pacifica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 609–613.
- Nett M & König GM (2007) The chemistry of gliding bacteria. *Nat Prod Rep* 24: 1245-1261.
- Nicolas J-L, Corre S & Cochard J-C (2004) Bacterial population association with phytoplankton cultured in a bivalve hatchery. *Microbial ecology* 48: 400–413.
- Nicolle P, Jude A & Le Minor L (1950) Relation entre l'intensité de l'irisation présentée par certaines colonies de *Salmonella* et leur constitution antigénique. *Ann Inst Pasteur* 572–582.
- Nishiguchi MK, Ruby EG & McFall-Ngai MJ (1998) Competitive dominance among strains of luminous bacteria provides an unusual form of evidence for parallel evolution in sepiolid squid-vibrio symbioses. *Appl Environ Microbiol* 64: 3209-3213.
- Nogrady G & Guérault A (1964) Conditions favorisant l'iridescence bactérienne et l'observation du phénomène. *Rev Can Biol* 23: 367–373.
- Noyes J, Sumper M & Vukusic P (2008) Light manipulation in a marine diatom. *J Mater Res* 23: 3229–3232.

- Nutting CC (1899) The utility of phosphorescence in deep-sea animals. pp. 793–799. The University of Chicago Press for The American Society of Naturalists.
- Oh KH, Park S, Kim EY, Lee MH, Oh TK, et al (2010) The Novel Cellulolytic Bacteria *Cellulophaga* sp. M-M6 and M-M24. *J Biotechnol* 150: S1–S576.
- Parker AR (1998) The diversity and implications of animal structural colours. *J Exp Biol* 201: 2343–2347.
- Parker AR (2000) 515 million years of structural colour. *J Opt A: Pure Appl Opt* 2: R15–R28.
- Parker AR (2009) Natural photonics for industrial inspiration. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 367: 1759–1782.
- Parker AR, McKenzie DR & Ahyong ST (1998) A unique form of light reflector and the evolution of signalling in *Ovalipes* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *P Roy Soc Lond B Bio* 265: 861–867.
- Parker AR, McPhedran RC, McKenzie DR, Botten LC & Nicorovici NAP (2001) Aphrodite's iridescence. *Nature* 409: 36–37.
- Park S, Oh KH, Lee SY, Oh TK & Yoon JH (2012) *Cellulophaga geojensis* sp. nov., a member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from marine sand. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 1354–1358.
- Parker AR & Townley HE (2007) Biomimetics of photonic nanostructures. *Nat Nanotechnol* 2:347–353.
- Pate JL & Chang L-YE (1979) Evidence that gliding motility in prokaryotic cells is driven by rotary assemblies in the cell envelopes. *Curr Microbiol* 2: 59–64.
- Patel P, Callow ME, Joint I & Callow JA (2003). Specificity in the settlement - modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*. *Environ Microbiol* 5(5): 338–349.
- Pati A, Abt B, Teshima H, Nolan M, Lapidus A, et al (2011) Complete genome sequence of *Cellulophaga lytica* type strain (LIM-21^T). *Stand Genomic Sci* 4: 221–232.
- Pedersén M, Roomans GM & von Hofsten A (1980) Blue iridescence and bromine in the cuticle of the red alga *Chondrus crispus* Stackh. *Bot Mar* 23: 193–196.
- Pellegrini L & Pellegrini M (1982) Iridescent bodies of *Cystoseira stricta* Sauvageau (Phaeophyta, Fucales): their fine structure, development and nature in vegetative cells. *Phycologia* 21: 34–46.
- Penesyán A, Kjelleberg S & Egan S (2010) Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Mar Drugs* 8: 438–459.
- Peplies J, Kottmann R, Ludwig W & Glöckner FO (2008) A standard operating procedure for phylogenetic inference (SOPPI) using (rRNA) marker genes. *Syst Appl Microbiol* 31(4): 251–257.
- Pijper A (1918) Diffraction phenomena in cultures of microorganisms. *Med J S Africa* 14: 211–218.
- Pijper A (1919a) The diffraction micrometer. *South African M Record* 276–282.

- Pijper A (1919b) Diffraction phenomena in films of blood cells and in surface culture of microorganisms. *S A J Sci* 16: 191-192.
- Pijper A (1923) Diffraction in biological structures. I. The structure of colonies of the Coli-Typhoid group. *South African M Record* 243-248.
- Pijper A (1924) The diagnosis of Addison's (Pernicious) anemia by a new optical method. *Lancet* 2: 367-378.
- Pijper A (1925a) Diffraction in biological structures. II. Physical conditions on the surface of bacteriological agar gels. *South African M Record* 23: 222-226.
- Pijper A (1925b) Diffraction in biological structures. III. The relative diameters of members of the Coli-Typhoid group. *South African M Record* 23: 453-462.
- Pijper A (1925c) Diffraction in biological structures. IV. Blood smears as diffraction gratings (with special reference to Addison's anemia). *South African M Record* 23: 457-471.
- Pijper A (1927) Dimensional differentiation of certain microbes. *J M A S Africa* 1062-1068.
- Pijper A (1947) The diffraction method of measuring red blood cells. *J Lab Clin Med* 32: 857-876.
- Pinhassi J, Azam F, Hemphala J, Long RA, Martinez J, et al (1999) Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquatic Microb Ecol* 17: 13-26.
- Pinhassi J & Hagström Å (2000) Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* 21: 3807-3812.
- Piñeiro-Vidal M, Riaza A & Santos Y (2008a) *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *Int J Syst Evol Micr* 58(Pt 1): 21-25.
- Pittman M (1931) Variation and type specificity in the bacterial species *Hemophilus influenzae*. *J Exp Med* 53: 471-493.
- Pomeroy LR (1974) The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience* 24: 499-504.
- Ponder E (1934) Diffraction patterns produced by bacteria. *J Exp Biol* 11: 54-57.
- Preisz H (1904) Studien über morphologie und biologie des milzbrandbacillus (mit besonderer berücksichtigung der sporenbildung auch bei anderen Bacillen). *Zentr Bakt Parasitenk Orig* 35: 280-293.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig WG, et al (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35(21): 7188-7196.
- Prum RO & Torres R (2003) Structural colouration of avian skin: convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. *J Exp Biol* 206: 2409-2429.
- Prusten M (2008) Photo-real rendering of bioluminescence and iridescence in creatures from the abyss. *Proceedings of SPIE* 7057-70570.

- Pukall R, Kramer I, Rohde M & Stackebrandt E (2001) Microbial diversity of cultivatable bacteria associated with the North Sea bryozoan *Flustra foliacea*. *Syst Appl Microbiol* 24: 623–633.
- Qin Q, Lam T, Sin Y, Shen H, Chang S, et al (2001) Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*. *J Virol Methods* 98: 17–24.
- Rao D, Webb JS & Kjelleberg S (2005) Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl Environ Microbiol* 71: 1729–1736.
- Rao D, Webb JS, Holmström C, Case R, Low A, et al (2007) Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms. *Appl Environ Microbiol* 73: 7844–7852.
- Rassart M, Colomer JF, Tabarrant T & Vigneron JP (2008) Diffractive hydrochromic effect in the cuticle of the Hercules beetle *Dynastes hercules*. *New J Phys* 10 : 033014.
- Rath J, Wo KY, Herndl GJ & DeLong EF (1998). High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. *Aquat Microb Ecol* 14: 261–269.
- Reichelt JL & Baumann P (1973) Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch Mikrobiol* 94: 283–330.
- Reichenbach H (1989) Genus I. *Cytophaga* Winogradsky 1929, 557, emend. In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N & Holt JG (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3. pp. 2015–2050. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Reichenbach H (1992) The Order *Cytophagales*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W & Schleifer K-H (eds). *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, 2nd ed. p. 3631–3675. Springer-Verlag, New York.
- Reichenbach H (2006) The Order *Cytophagales*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH & Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*, 3rd ed, vol 7. p. 549–590. Springer, New York, NY.
- Reichenbach H & Dworkin M (1981) The Order *Cytophagales* (with addenda on the genera *Herpetosiphon*, *Saprospira*, and *Flexithrix*). In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A & Schlegel HG (eds). *The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*, 1st ed, vol. 1. p. 356–379. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Rivas R, García-Fraile P, Peix A, Mateos PF, Martínez-Molina E & Velázquez E (2007) *Alcanivorax balearicus* sp. nov., isolated from Lake Martel. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1331–1335.
- Rogul M & Brendle JJ (1974) A metabolic inquiry into the iridescent lysis of agar lawns of *Pseudomonas aeruginosa* strain 227. *The Journal of infectious diseases* 130: S103–S109.
- Ruby EG & Nealson KH (1976) Symbiotic association of *Photobacterium fischeri* with the marine luminous fish *Mono-centris japonica*: a model of symbiosis based on bacterial studies. *Biol Bull* 151: 574–586.
- Salih A, Larkum A, Cox G, Kühl M & Hoegh-Guldberg O (2000) Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature* 408: 850–853.

- Sarrazin M, Vigneron JP, Welch V & Rassart M (2008) Nanomorphology of the blue iridescent wings of a giant tropical wasp, *Megascolia procer javanensis* (Hymenoptera). *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 78(5 Pt 1): 051902.
- Sato K, Naito M, Yukitake H, Hirakawa H, Shoji M, et al (2010) A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *PNAS* 107: 276–281.
- Sauvageau C (1911) Sur l'iridescence des *Cystoseira*. *C R Soc Biol* 71-85.
- Sawata A & Kume K (1983) Relationships between virulence and morphological or serological properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. *J Clin Microbiol* 18: 49–55.
- Schäfer H, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Servais P, et al (2001) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol* 34: 243–253.
- Schäfer H, Servais P & Muyzer G (2000) Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement. *Arch Microbiol* 173: 138–145.
- Schäfer H, Abbas B, Witte H & Muyzer G (2002) Genetic diversity of “satellite” bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 25–35.
- Schloss PD (2009) A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. *PloS one* 4: e8230.
- Schmalfuss H (1978) Morphology and function of cuticular micro-scales and corresponding structures in terrestrial isopods (Crust., Isop., Oniscoidea) *Zoomorphology* 91: 263–274.
- Schnitzler CE, Keenan RJ, McCord R, Matysik A, Christianson LM & Haddock SHD (2008) Spectral diversity of fluorescent proteins from the anthozoan *Corynactis californica*. *Mar Biotechnol* 10: 328–342.
- Schulz B, Guske S, Dammann U & Boyle C (1998) Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* 25: 213–227.
- Scott WM (1929) Chapter VI. The influenza group of bacteria. Medical Research Council System of Bacteriology, London, H. M. Stationery Office. 1: 326-387.
- Seago AE, Brady P, Vigneron J-P & Schultz TD (2009) Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural colour mechanisms in beetles (Coleoptera). *J R Soc Interface* 6(Suppl. 2): S165–S184.
- Seleen WA & Stark CN (1943) Some characteristics of green-fluorescent pigment-producing bacteria. *J Bacteriol* 46(6): 491-500.
- Serra J & Soille P (1994) *Mathematical Morphology and its Applications to Image Processing*. Springer, Dordrecht. 396 pp. ISBN 0792330935.
- Shawkey MD, Estes AM, Siefferman LM & Hill GE (2003) Nanostructure predicts intraspecific variation in ultraviolet-blue plumage colours. *Proc R Soc B* 270: 1455–1460.

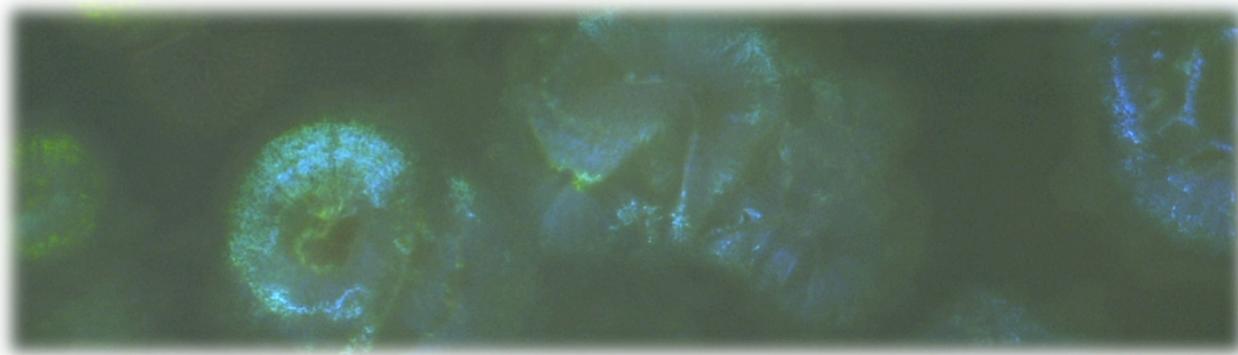
- Siebeck UE, Collin SP, Ghoddusi M & Marshall NJ (2003) Occlusable corneas in toadfishes: light transmission, movement and ultrastructure of pigment during light- and dark-adaptation. *J Exp Biol* 206: 2177–2190.
- Simon M, Glöckner FO & Amann R (1999) Different community structure and temperature optima of heterotrophic picoplankton in various regions of the Southern Ocean. *Aquat Microb Ecol* 18: 275–284.
- Skerratt JH, Bowman JP, Hallegraeff G, James S & Nichols PD (2002) Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Mar Ecol Prog Ser* 244: 1–15.
- Small JC & Julianelle LA (1923) Biologic and Serologic Studies of *Bacillus Mucosus* Group: Comparison of Strains from Granuloma Inguinale with Strains from Respiratory Tract. *J Infect Dis* 32(6): 456–470.
- Smith BL, Schäffer TE, Viani M, Thompson JB, Frederick NA, et al (1999) Molecular mechanistic origin of the toughness of natural adhesives, fibres and composites. *Nature* 399: 761–763.
- Snyder HK, Maia R, D’Alba L, Shultz AJ, Rowe KMC, et al (2012) Iridescent colour production in hairs of blind golden moles (Chrysochloridae). *Biol Lett* 8: 393–396.
- Soliev AB, Hosokawa K & Enomoto K (2011) Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 670349.
- Stafslien SJ, Bahr JA, Feser JM, Weisz JC, Chisholm BJ, et al (2006) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings. I. A multiwell plate screening method for the high-throughput assessment of bacterial biofilm retention on surfaces. *J Comb Chem* 8: 156–162.
- Stafslien S, Daniels J, Mayo B, Christianson D, Chisholm B, et al (2007) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings. IV. A high throughput bacterial biofilm retention and retraction assay for screening fouling- release performance of coatings. *Biofouling* 23: 45–54.
- Stanier RY (1940) Studies on the Cytophagas. *J Bacteriol* 40: 619–636.
- Stavenga DG, Leertouwer HL, Marshall NJ & Osorio D (2011) Dramatic colour changes in a bird of paradise caused by uniquely structured breast feather barbules. *Proc R Soc B* 278: 2098–2104.
- Stewart JR & Brown RM (1969) Cytophaga that kills or lyses algae. *Science* 164: 1523–1524.
- Stewart GR & Daniel RS (1973) Scanning electron microscopy of scales from different body regions of three lizard species. *J Morphol* 139: 377–388.
- Stewart GR & Daniel RS (1975) Microornamentation of lizard scales: some variations and taxonomic correlations. *Herpetologica* 31: 117–130.
- Strobel G & Daisy B (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 491–502.
- Sturz AV, Christie BR & Nowak J (2000) Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production. *Crit Rev Plant Sci* 19: 1–30.

- Sun M, Wartel M, Cascales E, Shaevitz JW & Mignot T (2011) Motor-driven intracellular transport powers bacterial gliding motility. *Proc Natl Acad Sci* 108: 7559–7564.
- Sutherland RL, Mäthger LM, Hanlon RT, Urbas AM & Stone MO (2008) Cephalopod coloration model. I. Squid chromatophores and iridophores. *J Opt Soc Am A* 25: 588–599.
- Tada H, Mann SE, Miaoulis IN, Wong PY (1998) Effects of a butterfly scale microstructure on the iridescent color observed at different angles. *Appl Opt* 37: 1579–1584.
- Tan T, Wong D & Lee P (2004) Iridescence of a shell of mollusk *Haliotis Glabra*. *Opt Express* 12: 4847–4854.
- Thomas KR, Kolle M, Whitney HM, Glover BJ & Steiner U (2010) Function of blue iridescence in tropical understorey plants. *J R Soc Interface* 7(53): 1699–1707.
- Toncheva-Panova T & Ivanova J (2000) Influence of physiological factors on the lysis effect of *Cytophaga* on the red microalga *Rhodella reticulata*. *J Appl Microbiol* 88: 358–363.
- Townley H (2011) Diatom Frustules: Physical, Optical, and Biotechnological Applications. In: Seckbach J & Kociolek P (eds). *The Diatom World*. Springer, Netherlands. p. 273–289. ISBN 978-94-007-1327-7.
- Trzeciak TM & Vukusic P (2009) Photonic crystal fiber in the polychaete worm *Pherusa sp.* *Phys Rev E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys* 80: 061908.
- Valeur B (2005) Lumière et luminescence : ces phénomènes lumineux qui nous entourent. p. 22–23, 64–75, 122–127. Belin edition. ISBN 2-7011-36032.
- Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, Hoste B, De Vos P, et al (1996) *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol* 46: 849–858.
- Vershinin A (1999) Biological functions of carotenoids diversity and evolution. *BioFactors (Oxford, England)* 10: 99–104.
- Vigneron J-P & Simonis P (2010) Chapter 5 – Structural Colours. *Advances in Insect Physiology*, 38: 181–218.
- Vigneron JP, Rasart M, Vértésy Z, Kertész K, Sarazzin M, et al (2005a) Optical structure and function of the white filamentary hair covering the edelweiss bracts. *Phys Rev E* 71: 011906.
- Vukusic P (2004) Natural photonics. *Phys World* 17: 35–39.
- Vukusic P & Sambles JR (2003) Photonic structures in biology. *Nature* 424: 852–855.
- Vukusic P, Sambles JR, Lawrence CR & Wootton RJ (1999) Quantified interference and diffraction in single *Morpho* butterfly scales. *Proc R Soc B* 266: 1403–1411.
- Vukusic P, Sambles JR, Lawrence CR & Wootton RJ (2001) Structural colour: now you see it-now you don't. *Nature* 410(6824): 36.
- Vukusic P & Stavenga DG (2009) Physical methods for investigating structural colours in biological systems. *J R Soc Interface* 6(Suppl. 2): S133–S148.

- Vukusic P, Wootton RJ & Sambles JR (2004) Remarkable iridescence in the hindwings of the damselfly *Neurobasis chinensis chinensis* (Linnaeus) (Zygoptera: Calopterygidae). *Proc R Soc B* 271: 595–601.
- Vulinec K (1997) Iridescent dung beetles: a different angle. *Fla Entomol* 80: 132–141.
- Wagner T, Neinhuis C & Barthlott W (1996) Wettability and Contaminability of Insect Wings as a Function of Their Surface Sculptures. *Acta Zoologica* 77: 213–225.
- Wagner-Döbler I, Beil W, Lang S, Meiners M & Laatsch H (2002) Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. *Adv Biochem Eng Biot* 74: 207–238.
- Walter EW, Cooper ML & Keller HM (1954) The detection microscopically of colonies of shigella in stool cultures. *J Bacteriol* 67: 247–251.
- Zhang W, Zhang D, Fan T, Ding J, Gu J, et al (2006) Biomimetic zinc oxide replica with structural color using butterfly (*Ideopsis similis*) wings as templates. *Bioinspiration & biomimetics* 1: 89–95.
- Watasé S (1896) On the physical basis of animal phosphorescence. Kessinger Publishing. 24 pp. ISBN: 1167033736.
- Waters CM & Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 319–346.
- Weeks OB (1955) *Flavobacterium aquatile* (Frankland and Frankland) Bergey et al., type species of the genus *Flavobacterium*. *J Bacteriol* 69: 649–658.
- Wei SL & Young RE (1989) Development of symbiotic bacterial bioluminescence in a nearshore cephalopod, *Euprymna scolopes*. *Mar Biol* 103: 541–546.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA & Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697–703.
- Welch V, Vigneron J-P, Lousse V & Parker A (2006) Optical properties of the iridescent organ of the comb-jellyfish *Beroë cucumis* (Ctenophora). *Phys Rev E* 73: 0419161–0419167.
- Wensinck F, van Dalen A & M. Wedema (1967) Iridescent material and the effect of iron on its production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* 33: 73–86.
- Wheeler WM (1916) A Phosphorescent Ant. *Psyche* 23: 173–174.
- Whitney MW, Kolle M, Andrew P, Chittka L, Steiner U & Glover BJ (2009) Floral iridescence, produced by diffractive optics, acts as a cue for animal pollinators. *Science* 323: 130–133.
- Widder EA (2010) Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity. *Science* 328: 704–708.
- Williams T (1996). The iridoviruses. *Adv Virus Res* 46: 347–412.
- Williams T (1998). Invertebrate iridescent viruses. In: Miller LK & Ball LA (eds). *The Insect Viruses*. pp. 31–68. Plenum Press, New York.

- Winogradsky (1929). Etudes sur la microbiologie du sol. Sur la dégradation de la cellulose dans le sol. *Ann Ins Pasteur* 43: 549-633.
- Witman JD, Etter RJ & Smith F (2004) The relationship between regional and local species diversity in marine benthic communities: a global perspective. *Proc Natl Acad Sci* 101: 15664–15669.
- Wu D, Chen QD, Xia H, Jiao J, Xu BB, et al (2010) A Facile Approach for Artificial Biomimetic Surfaces With Both Superhydrophobicity and Iridescence. *Soft Matter* 6: 263–267.
- Yan L, Boyd KG, Adams DR & Burgess JG (2003) Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in bacilli. *Appl Environ Microbiol* 69: 3719-3727.
- Yang F, Moss L & Phillips G (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 14(10): 1246–1251.
- Yin H, Shi L, Li Y, Quin Y, Dong B, et al (2006) Iridescence in the neck feathers of domestic pigeons. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 74: 051916.
- Yoon J-H, Kang S-J & Oh T-K (2005) *Tenacibaculum lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat in the Yellow Sea, Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 2): 793-798.
- Yoshinaga I, Kim MC, Katanozaka N, Imai I, Uchida A & Ishida Y (1998) Population structure of algicidal marine bacteria targeting the red tide forming alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), determined by restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial 16S rRNA genes. *Mar Ecol Prog Ser* 170: 33–44.
- Youderian P (1998). Bacterial motility: secretory secrets of gliding bacteria. *Curr Biol* 8: 408 – 411.
- Young RE (1983) Oceanic Bioluminescence: an Overview of General Functions. *Bull Mar Sci* 33(4): 829-845.
- Youvan DC & Michel-Beyerle ME (1996) Structure and fluorescence mechanism of GFP. *Nature Biotechnol* 14: 1219–1220.
- Zierdt CH (1971) Autolytic nature of iridescent lysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 37: 319–337.

ANNEXES



Annexe 1. Caractéristiques des souches mentionnées iridescentes.

(méthodes d'observation : trans = transillumination, Epi = illumination directe, ND : non décrit). M : mucoïde, L : large, S (smooth) : lisse

Espèce	Origine	Observation			Caractéristiques			Références
		Trans	Epi	ND	Colonies	Encapsulation	Virulence	
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Coques</i> , <i>Bacillus coli</i> , <i>Diplocoques</i> , <i>Monilia (fungi)</i> <i>Pasteurella sp.</i>	Septicémie de lapin	•		•	circulaire, bord régulier, Type D (diffuse)		•	Pijper, 1918 De Kruif, 1921
<i>Bacillus coli</i> <i>Bacterium ochraceum</i> <i>Bacilles Gram-négatifs</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Bacillus pyocyaneus</i> <i>Coli- typhoid</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>H. influenzae</i>	Collection Granulomona, lésions respiratoires et collection pus de lésions Collection méningites et arthrites méningites, sang et crachat de pneumonie, infection pharynx, nez d'un singe souffrant de tuberculose	• • • • • •	•		M, bord régulier L L, M, S	• • •	• • •	Pijper, 1923 Small & Julianelle 1923 Hadley, 1924 Pijper, 1925b Scott, 1929 Pittman, 1931
<i>Pseudomonas sp.</i> <i>H. influenzae</i>	mine de charbon fluide cérébrospinal de méningite			• •	S	•	•	Farrell & Turner, 1932 Mulder, 1939
<i>H. influenzae</i>	Fluide spinale de méningite, septicémie	•			L, M, S, convexe	•	•	Chandler et al, 1939
<i>B. paratyphosum</i> <i>B. typhosum</i> <i>Staphylococcus citreus</i> <i>Pasteurella mastitidis</i> <i>Pseudomonas pyocyanea</i> <i>H. influenzae</i>	Collection Infection mamelle brebis Clinique et collection fluide cérébrospinal purulent	• • • • •		• •	S	• •	• •	Guillot, 1941 ; 1942 Jasmin, 1945 Dickinson, 1948 ; 1952 Engboek, 1950
<i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella</i> <i>paratyphi</i> ,	collections	•			S, bombée			Nicolle et al, 1950

Espèce	Origine	Observation			Colonies	Caractéristiques		Références
		Trans	Epi	ND		Encapsulation	Virulence	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pathologies cliniques		•		S		•	Don & van den Ende 1950
<i>Shigella</i>	Souches cliniques	•			S, M	•		Walters et al, 1953
<i>Non identifiée</i>	Terre et sable			•	opaque			Bromfield, 1953
<i>Pasteurella multocida</i>	Septicémie et collections				M	•		Carter, 1962
<i>H. influenzae Bordetella bronchiseptica</i>	méningite infantile	•			S		•	Nogrady & Guérault, 1964
<i>P. aeruginosa</i>	Collection			•	lytique			Wensinck et al, 1967
<i>P. aeruginosa</i>	Collection			•	M		•	Zierdt, 1971
<i>P. aeruginosa</i>	Souches cliniques			•				Rogul & Brendle, 1974
<i>P. multocida</i>	Souches cliniques	•			M, S	•	•	Heddleston & Wessman 1975
<i>P. multocida</i>	lapin	•			L, M, S, convexe	•		Brogden, 1980
<i>Haemophilus paragallinarium</i>	Souches cliniques	•				•	•	Sawata & Kume, 1983
<i>Listeria monocytogenes</i>	Excrément de moutons	•						Dominguez Rodriguez et al, 1984
<i>Listeria sp.</i>	Eau de rivière	•						Luppi et al, 1986
<i>Haemophilus sp.</i>	Nez sains et infectés de porcs	•				•		Morozumi & Nicolet, 1986
<i>Bordetella trematum</i>	Infections d'oreille	•			convexe	•		Vandamme, 1996
<i>P. multocida</i>	ATCC 15742			•	M, S	•	•	DeAngelis et al, 1998
<i>P. multocida</i>	ATCC 11039			•	M	•		Champlin et al, 1999
<i>P. aeruginosa mutant lasR</i>	infection voies aériennes (mucovicirose)		•		L			D'Argino et al, 2007
<i>Alcanivorax balearicus</i>	lac souterrain salé	•			L, M, opaque			Rivas et al, 2007
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	collection		•		S, convexe, transparente			Berditsch et al, 2007
<i>P. aeruginosa lasR</i>	infection poumon (mucovicirose)		•		M			Hoffman et al, 2009
<i>Listeria marthii</i>	Sol et eau			•	S, transparente			Graves et al, 2010
<i>P. aeruginosa mutant lasR pqsH</i>	collection		•				•	Cugini et al, 2010

Annexe 2. Systématique des souches de cette étude

Phylum XIV. “*Bacteroidetes*”

Class II. “*Flavobacteriia*”

Order I. “*Flavobacteriales*”

Family I. *Flavobacteriaceae*

Genus I. *Flavobacterium*

Flavobacterium degerlachei

Flavobacterium johnsoniae

Flavobacterium aquatile

Flavobacterium succinicans

Flavobacterium flevensis

“*Promyxobacterium flavum*”

Genus VI. *Aquimarina*

Aquimarina latercula

Genus XI. *Cellulophaga*

Cellulophaga lytica

Cellulophaga baltica

Cellulophaga geojensis

Cellulophaga fucicola

Cellulophaga pacifica

Cellulophaga tyrosinoxydans

Cellulophaga algicola

Genus XXXVII. *Leeuwenhoekiella*

Leeuwenhoekiella marinoflava

Genus XLI. *Maribacter*

Maribacter dokdonensis

Genus LIII. *Psychroflexus*

Psychroflexus gondwanensis

Genus LXVII. *Tenacibaculum*

Tenacibaculum discolor

Tenacibaculum gallaicum

Tenacibaculum aiptasiae

Tenacibaculum ovolyticum

Tenacibaculum soleae

“*Flexibacter aurantiacus* subsp. *copepodarum*”

Genus LXXVI. *Zobellia*

Zobellia uliginosa

Class IV. « *Cytophagia* »

Order I. *Cytophagales*

Family I. *Cytophagaceae*

Genus XIX. *Sporocytophaga*

“*Sporocytophaga cauliformis*”

Annexe 3. Souches marines iridescentes isolées.

Collectes	Echantillons inoculés sur CYT			Colonie		Espèce identifiée (souche de référence)	
	Type d'échantillon		Espèce	+24h	+72h		
29.09.11 Plage, La Tremblade	Sédiments	Sable sec				<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
						<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
	Macroalgue	Phaeophyceae	<i>Fucus vesiculosus</i>			<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
	Plante marine	Zoostère	<i>Zoostera marina</i>				<i>C. lytica</i> (souche type 14)
							<i>C. lytica</i> (souche type 14)
							<i>T. gallaicum</i> (souche type 4)
24.10.11 Phare des baleines, Ile de Ré	Liquide	Eau de mer	Eau de mer			<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)	
	Algues	Rhodophyceae	Algue encroutante			<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
			<i>Laurencia sp.</i>			<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
			<i>Palmaria palmata</i>			<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
						<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
			<i>Corallina officinalis</i>			<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
			<i>Dumontia contorta</i>			<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)	
			<i>Phyllophora heredia</i>			<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
			<i>Pterocladia capillacea</i>			<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
						<i>T. aiptasiae</i> (souche type 105)	
						<i>C. lytica</i> (souche type 14)	

Collectes	Echantillons inoculés sur CYT			Colonie		Espèce identifiée (souche de référence)
	Type d'échantillon	Espèce		+24h	+72h	
24.10.11 Phare des baleines, Ile de Ré	Algues	Rhodophyceae	<i>Pterocladia capillacea</i>			<i>C. lytica</i> (souche type 14)
						<i>A. latercula</i> (souche type 46)
						<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)
		Phaeophyceae	<i>Fucus spiralis</i> en décomposition			<i>C. lytica</i> (souche type 14)
						<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)
		Autre	Algue mixte en décomposition			<i>C. lytica</i> (souche type 14)
	Spongiaires	corps mou	<i>Hemimycale columella</i>			<i>C. lytica</i> (souche type 14)
	Cnidaires	Anémone	<i>Actinia equina</i>			<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)
						<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)
	Mollusques	Gastéropode	<i>Patella depressa</i>			<i>C. lytica</i> (souche type 14)
		Pelecypoda	Huître			<i>C. lytica</i> (souche type 14)
	3.11.11 Plage sable entre La Flotte et Rivedoux Ile de Ré, avec bateau (pollution moyenne)	Liquide	Eau	Eau stagnante		
						<i>C. lytica</i> (souche type 14)
Mollusques		Autre	Coquille huitre en décomposition			<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)
						<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)
						<i>T. aiptasiae</i> (souche type 82)
						<i>T. aiptasiae</i> (souche type 105)
						<i>T. aiptasiae</i> (souche type 105)
						<i>T. aiptasiae</i> (souche type 105)

Collectes	Echantillons inoculés sur CYT			Colonie		Espèce identifiée (souche de référence)
	Type d'échantillon	Espèce		+24h	+72h	
3.11.11 Plage sable entre La Flotte et Rivedoux Ile de Ré, avec bateau (pollution moyenne)	Mollusques	Autre	Coquille huitre en décomposition			<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 116)
						<i>C. lytica</i> (souche type 14)
						<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)
						<i>T. soleae</i> (souche type 70)
						<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)
						<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)
3.11.11 Belvédère de La Rochelle (bord pont de Ré), près de La Pallice/Chef de Baie (très pollué) Plage sable	Sédiments	Sable				<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)
	Algues	Chlorophyceae				<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)
	Déchets	anthropique	pneu			<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)
15.11.11 Concession scientifique (non polluée) Phare de chassiron, Ile d'oléron	Liquide	Eau	Eau large			<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 116)
						<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 116)
						<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 116)
						<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)
						<i>T. discolor</i> (souche type 103)
						<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)
	Algues	Rhodophyceae	<i>Corallina officinalis</i>			<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)
			<i>Chondrus crispus</i>			<i>A. latercula</i> (souche type 46)
					<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
					<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
					<i>A. latercula</i> (souche type 46)	
					<i>A. latercula</i> (souche type 46)	

Collectes	Echantillons inoculés sur CYT		Colonie		Espèce identifiée (souche de référence)	
	Type d'échantillon	Espèce	+24h	+72h		
15.11.11 Concession scientifique (non polluée) Phare de chassiron, Ile d'oléron	Rhodophyceae	Algue rouge inconnue			<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
	Chlorophyceae	<i>Ectocarpus siliculosus</i>			<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)	
		<i>Ulva lactuca</i>			<i>T. aiptasiae</i> (souche type 105)	
	Phaeophyceae	Crampon laminaire décomposition <i>Saccorhiza polyschides</i>			<i>T. aiptasiae</i> (souche type 105)	
					<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
						<i>C. lytica</i> (souche type 14)
						<i>C. lytica</i> (souche type 14)
						<i>C. lytica</i> (souche type 14)
						<i>C. lytica</i> (souche type 14)
						<i>C. lytica</i> (souche type 14)
	Songiaires	Corps mou	<i>Halichondria panicea</i>			<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)
	Cnidaires	Hydrozoaire	<i>Aglaophenia harpago</i>			<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)
						<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)
						<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)
					<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)	
					<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)	
Crustacés	Décapode	Crabe décomposition			<i>T. aiptasiae</i> (souche type 105)	
Mollusques	Gastéropode	Patelle			<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
					<i>C. lytica</i> (souche type 14)	
Echinodermes	Crinoïde	Etoile de mer <i>Asterina gibbosa</i>			<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)	
					<i>T. aiptasiae</i> (souche type 105)	

Collectes	Echantillons inoculés sur CYT		Colonie		Espèce identifiée (souche de référence)		
	Type d'échantillon	Espèce	+24h	+72h			
15.11.11 Concession scientifique (non polluée) Phare de chassiron, Ile d'oléron	Eau	Eau du large			<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 116)		
					<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)		
	Rhodophyceae	Eau flaue				<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)	
						<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)	
		<i>Corallina officinalis</i>				<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)	
						<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)	
		Phaeophyceae	<i>Dictyota dichotoma</i>				<i>C. lytica</i> (souche type 14)
							<i>C. lytica</i> (souche type 14)
	Algue brune					<i>T. ovolyticum</i> (souche type 66)	
						<i>T. ovolyticum</i> (souche type 66)	
Vers	Autre	Formation vers			<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)		
					<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)		
Crustacés	Décapode	Petit crabe			<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)		
					<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)		
mollusques	Gastéropode	Bigorneau			<i>C. lytica</i> (souche type 14)		
					<i>C. lytica</i> (souche type 14)		
Déchets	humains	Plastique noir décomposition			<i>T. soleae</i> (souche type 70)		
					<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)		
					<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)		
					<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)		
					<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 116)		
					<i>F. aurantiacus</i> subsp <i>copepodarum</i> (souche type 35)		
					<i>T. gallaicum</i> (souche type 68)		

Annexe 4. Plan du CD

Dossier « Chapitre 1 »

- « Chapitre 1. a » (Movie #1 dans l'article 1). Colonie de *C. lytica* (MA noir) x30
- « Chapitre 1. b » (Movie #2 dans l'article 1). Colonie de *C. lytica* (LN) x100.
- « Chapitre 1. c » (Movie #3 dans l'article 1). Colonie de *C. lytica* (MA) x 200 sous des angles d'incidence variables de la lumière.
- « Chapitre 1. d ». Colonie de *C. lytica* (MA) x100.
- « Chapitre 1. e ». Colonie de *C. lytica* (CYT) x200.
- « Chapitre 1. f ». Colonie de *C. lytica* (CYT) x100 sous des angles d'incidence variables de la lumière.
- « Chapitre 1. g ». Colonie de *C. lytica* (MA) x50 lors d'une rotation de la caméra.

Dossier « Chapitre 3 »

- « Chapitre 3. a » (Movie S1 dans l'article 3). Motilité « gliding » de zones centrales d'une colonie de *C. lytica* CECT 8139.
- « Chapitre 3. b » (Movie S2 dans l'article 3). Motilité « gliding » de zones périphériques d'une colonie de *C. lytica* CECT 8139.
- « Chapitre 3. c » (Movie S3 dans l'article 3). Formation dynamique d'une paillette sur une colonie de *C. lytica* DSM 2040.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire LIENSs de l'Université de la Rochelle dans le bâtiment Marie-Curie et plus précisément dans le laboratoire de Microbiologie mais également lors de missions à Exeter (Angleterre), à la Tremblade, à Banyuls et à Marseille.

Je tiens à remercier le Dr Eric Rosenfeld, directeur de thèse, pour m'avoir permis de réaliser ces travaux et pour avoir accepté de changer le sujet de cette thèse, en fin de première année, sur cette bactérie « DISCO » que je trouvais si jolie.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger cette thèse. Merci au Dr Yvan MARTIN (Institut océanographique Paul Ricard, Île des Embiez) et au Dr Gurvan MICHEL (Station biologique de Roscoff) pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux. J'exprime par ailleurs toute ma reconnaissance aux examinateurs : Pr Serge BERTHIER (Institut des nanosciences, Paris VI), Pr Peter VUKUSIC (Université d'Exeter, Angleterre), Pr Marianne GRABER (LIENSs, Université de La Rochelle) et Dr Tâm MIGNOT (Laboratoire de Chimie Bactérienne, Marseille).

Je remercie chaleureusement les différents chercheurs qui m'ont accueilli lors des diverses collaborations indispensables à cette thèse et qui me permettent de m'accrocher à une croyance personnelle : la recherche scientifique est réalisée par des personnes passionnées. De plus, je voudrais adresser mes sincères remerciements au personnel technique, ingénieur, doctorant et post-doctorant de ces différents laboratoires sans qui les expériences n'auraient pu être réalisées. Par ordre chronologique, merci donc au Pr Daniel Sellos pour avoir mis à disposition une paillasse au Marinarium de Concarneau et à Mme Annie Péron pour son aide lors des collectes. Merci au Dr Yvan Martin et toute l'équipe de l'institut Océanographique Paul Ricard aux Embiez pour leur accueil afin d'effectuer des collectes, l'idée de l'utilisation de *Cytophaga* agar fut inspirée lors de cette collaboration. Many thanks to the Pr Peter Vukusic from the University of Exeter for the opportunity of performing indispensable physical experiments with the best, for his warm welcome and his curry. Additionally thanks to Dr Peter Splatt from the Biological department for the firsts TEM analysis and all his precise explanations. Thanks to Dr Stephen Luke for the great help, the mounting, the quick formation in microspectrophotometry and for supporting the odor of this marine bacteria in the basement, and finally thanks to all the great people met there (all the Tim and Tom, Jo, Caroline and Laureline). Merci au Dr Tristan Renault de l'Ifremer de la Tremblade pour m'avoir permis de réaliser les images en MET, m'avoir fait confiance lors des difficultés de

préparation du biofilm et surtout pour sa présence à la paillasse avec un agenda chargé. Je remercie le Dr Tâm Mignot du Laboratoire de Chimie Bactérienne de Marseille pour son accueil et la mise à disposition du microscope inversé automatisé, ainsi qu'au Dr Adrien Ducret qui m'a aidé à réaliser les expériences de motilité « gliding » et aux filles du labo pour leur bonne humeur (Valérie, Morgane, Mathilde, Rym, Audrey et Emilia), vive le sud ! Merci au Dr Fabien Joux du laboratoire ARAGO à Banyuls-sur-mer pour son accueil et sa disponibilité lors des tests préliminaires de photoprotection, à Laurent Intertaglia pour son intérêt et à Josiane pour m'avoir aidé à couler une centaine de boîte en un temps record. Un grand merci à Frédérique (doctorante Flamande en mission) pour sa gentillesse et pour son attachement aux dictyotes, et aux stagiaires très sympas du laboratoire.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire LIENSs qui ont été présents durant ces trois années lors de collaboration ou tout supplément pour leur gentillesse, parmi eux, Dr Virginie Pasquet, Dr Hélène Agogué, Céline Lavergne, Laureen Beaugeard, Dr Pierre-Guy Sauriau, Dr Laurent Picot, Dr Michel Goldberg, Dr Paco Bustamante, Richard Coz et ceux que j'oublie. Merci au Dr Renaud Péteri, à Cyrille Beaudry et à David Simon pour l'analyse mathématique et statistique des images. En particulier je remercie du fond du cœur Mme Viviane Biou, une super secrétaire, qui a été bien plus que ça, qui est un rayon de soleil, pour sa joie, sa présence, son efficacité et son soutien.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au comité de sélection des DCACE (moniteur), et particulièrement Mr Bertrand Vachon, pour m'avoir choisi même si aucun poste n'était disponible dans mon département et m'avoir donné l'opportunité d'enseigner au cours du doctorat dans le département de chimie. Merci aux enseignants qui m'ont fait confiance : Pr Christian Eskenazi, Dr Stéphanie Mallarino, Dr Karel Bertet et Dr Isabelle Goubet ... pour m'avoir confié des cours, TD ou TP. Je remercie également le personnel du laboratoire d'en face (LEMMA) Stephane, Christelle et Roselyne pour leur aide. J'exprime toute ma reconnaissance aux enseignants des cours de monitorat, en particulier Mr Proudhon, qui m'ont appris beaucoup sur la pédagogie et les qualités d'un bon enseignant. Un grand merci à Mme Frederique Deloffre pour son aide sur la valorisation des compétences lors du NCT, son soutien moral lors de difficultés et ses conseils avisés.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au personnel administratif de l'Université dont spécialement les secrétaires de l'école doctorale Gay Lussac, Mme Brigitte Hudelaine, Mme Jennifer de la Corte et Isabelle Hirsch toujours disponibles et souriantes. Merci aux personnes responsables des commandes et missions, Laetitia Darre, Johan Guiard et Lucia Picard. Je

suis reconnaissante envers le personnel de la bibliothèque universitaire et en particulier les responsables des prêts entre bibliothèque pour leur efficacité et pour avoir trouvé les nombreux articles remontant jusqu'à 1904 et les ouvrages nécessaires à cette thèse.

Je tiens à remercier mes voisines de bureau Delphine, Esther et Rana, pour leur présence, nos discussions et remontage de moral, la boîte antistress pleine de sucrerie et tout le reste. Un grand merci à Pauline Marié, la meilleure des stagiaires, pour m'avoir écouté, pour sa curiosité, sa bonne humeur, ses petits mots, son look en guy cotten, et ses petites maladresses (oups !).

Je remercie du fond du cœur les supers moniteurs de la Rochelle pour les rendez-vous hebdomadaires au RU (même si je préfère le Mcdo) et amis: Mathieu pour ses remarques pertinentes, son humour, ses corrections, son soutiens en période difficile et pour la pêche au crabe ; Abdou pour sa bonne humeur, son courage, sa conduite sportive, les journées shopping et vélo, les KFC et les multiples soirées ciné et Alexandra pour son caractère joyeux, ses avis contraires (au moins on ne s'ennuie pas). Un grand merci à ceux qui ont suivi de près ou de loin, ces trois ans particuliers, Lucille, Raouf, Andy, Amadou, Gaël, Alexandre, et les autres.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont permis de me ressourcer lors d'activités externes : les membres du club de Samba SurdoRei où j'ai pu apprendre à jouer du repinique, Virginie, Andréa, Lolo, Mickael (super prof), Nadia, Coco.... Les membres du Subaqua club de la Rochelle pour m'avoir permis de passer mon niveau 3 de plongée dans la bonne humeur et les nudibranches, Patrice, Thomas, Philippe, Patrick, Florence, David, mes papis plongeurs Joël et Jacques, Michel ... et Yoyo fidèle équipier de palanquée.

Un grand merci à ma famille qui a toujours était là (même à 800 km en moyenne), pour leur soutien sans faille, leur aide, leur réconfort dans les moments de découragement, leur confiance, pour m'avoir préserver afin de me consacrer à cette thèse et pour leur encouragement. A ma mère pour sa fierté, mon père pour son soutien, mon grand-père Daniel pour ses conseils, ma sœur Caroline pour son implication et pour m'avoir donné la plus mignonne des nièces et filleules Sarah, à mon beau-père Michel, Gérard, Loulou et Chrichri, tata Françoise, mes grands-parents paternels André et Lydia, les cousins judoka, Elie, Lydie, Hervé et les petits qui grandissent si vite... Je dédicace cette thèse à ma grand-mère Eliane qui m'a vu commencer mais pas finir, qui s'est battue avec courage et serait, je pense, fière de moi, pour cette phrase « *Il y a ceux qui bossent... et ceux qui roulent leur bosse !* ».

Etude de l'iridescence d'une bactérie marine, *Cellulophaga lytica* : caractérisations physico-optique, microbiologique et écologique

Résumé

Lors de la prospection de bactéries d'intérêt dans le milieu marin, nous avons isolé des colonies aux couleurs brillantes sous illumination directe, ressemblant à l'iridescence de certains papillons. L'iridescence est une couleur physique induite par des structures nanoscopiques périodiques. Ce phénomène est peu détaillé chez les procaryotes. Dans cette thèse nous avons souhaité caractériser le phénomène par des analyses physico-optiques, microbiologiques et écologiques. La souche fut identifiée comme appartenant à l'espèce *Cellulophaga lytica*.

Les premières étapes ont permis d'illustrer le phénomène et de prouver une coloration structurale des colonies par microspectrophotométrie. Une comparaison de diverses souches a démontré l'iridescence singulière de *C. lytica*, dénommée iridescence « glitter-like ». Nous avons ainsi proposé la première classification des iridescences bactériennes. Certaines souches du même phylum *Bacteroidetes* exprimaient le phénomène. Un lien entre cette iridescence et la motilité « gliding » fut mis en évidence. De façon intéressante, l'iridescence était conservée en conditions mimant le biotope *C. lytica*. De plus, diverses souches marines iridescentes ont pu être ré-isolées. Elles étaient particulièrement abondantes sur les macroalgues (rouges, brunes), mollusques, cnidaires et dans l'eau de mer. Nous supposons alors que ce phénomène pourrait avoir des rôles bio-écologiques. Grâce à la microscopie électronique à transmission et une modélisation, nous avons pour la première fois élucidé des structures responsables d'une iridescence bactérienne : une organisation populationnelle de cellules alignées équidistantes.

Les bases fondamentales et méthodologiques de l'iridescence bactérienne sont données dans cette thèse. Les applications correspondraient aux domaines des nanotechnologies et de la biomimétique.

Mots clés : Iridescence bactérienne, « glitter-like », *Cellulophaga lytica*, *Bacteroidetes*, motilité par glissement.

Iridescence of a marine bacterium, *Cellulophaga lytica*: physical, microbiological and ecological characterizations

Abstract

During collections in the marine environment, colony with bright coloration under direct illumination was isolated. Colors were similar to butterfly iridescence. Iridescence is a property of structural color where periodic nanoscopic structures are responsible of intense coloration. Bacterial iridescence is poorly described in the literature. In this work, we aimed to characterize the phenomenon by physico-optical, microbiological and ecological analysis. The marine bacterium was identified as *Cellulophaga lytica*.

In the first experiment we illustrated and proved the physical color by microspectrophotometry. Comparison with diverse bacteria permitted to demonstrate the uniqueness of *C. lytica* iridescence, named "glitter-like". We proposed the first classification of iridescences within the prokaryotes. Others *Bacteroidetes* strains showed "glitter-like" iridescence effects. A link between iridescence and gliding motility was additionally identified. Abiotic factors demonstrated conservation of the phenomenon under conditions that mimic *C. lytica* stressing biotope. Moreover, other iridescent marine strains were isolated. They were particularly associated to macroalgae (red, brown), mollusks, cnidarians and seawater. Biological and ecological functions of iridescence are then supposed. By using transmission electron microscopy and modeling, structures responsible for iridescence in the colony were first identified: aligned and equidistant cells at a population level.

Bacterial iridescence's fundamental and technical skills are described in this thesis. Applications could lead to biomimetic and nanotechnology of iridescent structures.

Keywords: Bacterial iridescence, « glitter-like », *Cellulophaga lytica*, *Bacteroidetes*, gliding.



Laboratoire LIENSs, Littoral Environnement et Sociétés
UMR 7266, CNRS-ULR
Bâtiment Marie-Curie - 17042 LA ROCHELLE CEDEX

