

LES EFFETS DE LA LUMIÈRE SUR LE METABOLISME DU CARBONE DES BACTÉRIES CONTENANT LA PROTÉORHODOPSINE

Alicia Courties

▶ To cite this version:

Alicia Courties. LES EFFETS DE LA LUMIÈRE SUR LE METABOLISME DU CARBONE DES BACTÉRIES CONTENANT LA PROTÉORHODOPSINE: Cas d'etude en culture continue d'une Gammaproteobacterie: Photobacterium angustum S14.. Biodiversité et Ecologie. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), 2013. Français. NNT: 2013PA066672. tel-01247046

HAL Id: tel-01247046 https://theses.hal.science/tel-01247046

Submitted on 21 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright





THÈSE

PRÉSENTÉE À

L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

ÉCOLE DOCTORALE DIVERSITÉ DU VIVANT

Par Alicia COURTIES

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Écologie microbienne

LES EFFETS DE LA LUMIÈRE SUR LE METABOLISME DU CARBONE DES BACTÉRIES MARINES CONTENANT LA PROTÉORHODOPSINE. Cas d'étude en culture continue d'une *Gammaprotéobactérie* : *Photobacterium angustum*

S14.

Directeur de recherche : Philippe LEBARON Co-directeur de recherche : Marcelino SUZUKI

Soutenue le : 18 décembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

M. Carlos Pedros-Alio, Professeur, CSIC, Barcelone (Espagne)

M. Pierre Servais, Professeur, Université libre de Bruxelles (Belgique)

M. Marc Bouvy, Directeur de recherche, ECOSYM, Montpellier (France)

M. François Lallier, Professeur, Station biologique de Roscoff, UPMC (France)

M. Marcelino Suzuki, Professeur, OOB, UPMC (France)

M. Philippe Lebaron, Professeur, OOB, UPMC (France)

Rapporteur Rapporteur Examinateur Co-directeur de thèse Directeur de thèse

« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.

La pratíque, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait

pourquoí.

Sí la pratíque et la théorie sont réunies, rien ne fonctionne et on

ne saít pas pourquoí. »

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Cette fameuse page des remerciements qui résonne dans la tête d'un thésard comme une chanson racontant la fin d'un projet immense, d'une aventure extrême, d'un sprint de longue haleine et en même temps comme une angoisse nocturne... Ai-je remercié tous ceux qui le méritaient, m'ayant apporté une aide précieuse de près ou de loin pour mener à bien mes dizaines de « manipes » ou à garder le cap durant ces trois années (et des poussières) si peu chémostatées (l'état de parfait équilibre voire même de quasi-équilibre n'est vraiment pas de mise au cours d'un doctorat !!). Alors je me fais et vous fais la promesse de relire soigneusement les lignes qui suivront car sans vous tous, jamais je ne serais arrivée au bout de « mon challenge ».

En premier lieu, je tiens à remercier grandement les membres du jury (C. Pedro-Alio, P. Servais, M. Bouvy et F. Lallier) d'avoir accepté d'assister à ma soutenance et d'évaluer ce manuscrit afin d'engager la dernière discussion scientifique de ma vie de doctorant. Un grand mercí également à Mr Philippe Lebaron et à Marcelino Suzuki pour m'avoir donné la chance d'accomplir cette thèse au sein du LOMIC et d'acquérir toutes ces compétences techniques et ces capacités de réflexions scientifiques. Travailler et étudier à l'observatoire océanologique de Banyuls-sur-Mer fût un réel plaisir. Merci Rémy, pour tout... mon premier stage de recherche à Pau sous ta responsabilité, quel enthousiasme de travailler à tes cotés... et grâce à toi me voilà, futur jeune docteur, je n'oublierais jamais le jour où tu m'as poussé à demander une inscription en M2R (le jour de ma soutenance de M1, pause cigarette sur les marches devant le hall des amphis de l'UPPA). Tu as été le premier à croire en moi dans ce domaine et je ne te remercierais jamais assez pour ça. Et Marc, merci d'avoir su discerner les moments où le courage et la motivation me quittaient et de m'avoir soutenu tout au long de cette thèse, bien que tu sois loin et débordé. J'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme « comité de thèse », votre investissement et vos idées scientifiques m'ont apporté énormément.

Le paragraphe de « mes acolytes de chémostats ». Un immense merci aux courageux qui durant de brèves ou de plus longues périodes ont eux aussi manqué de sommeil afin de satisfaire les moindres désirs de ces instruments capricieux. Clémence, ton professionnalisme, ton assiduité et ta patience font de toi ma première alliée, María P., Nícole B, Maríe O et María N., mercí pour votre aíde précieuse dans l'accomplissement de diverses expériences. Thomas R. Thanks a lot for your help too... I know and you know what is the real work to finish a chémostat run in good conditions; it's not necessary to write 1000 words for explain that between us! I wish you good luck for the end of your postdoc with them! Il n'aurait évidemment pas été possible d'analyser tous ces échantillons et de comprendre ce qu'il se passait avec ma souche favorite sans Jocelyne (pour tous ces filtres GFF analysés), Nyree (pour m'avoir formé sur la qPCR et si bien conseillé pour mes expériences de biologie moléculaire), Philippe et Christophe (les dilutions de tous ces time-points et la cytométrie auraient eu ma peau sans votre aide), Alain, Jérome, Twefik et Fabien (vos connaissances théoriques sur les chémostats m'ont ouvert les yeux sur la complexité des mathématiques et des modèles). Les discussions autours de mes résultats et de mes outils techniques avec Ingrid et Stéphane m'ont permis de comprendre certains éléments qui m'échappaient. Merci à vous tous !

A tous ceux que je vais citer dans ce paragraphe, un grand merci pour les soirées partagées, les échanges scientifiques qui m'ont souvent amenés à me poser les bonnes questions, le soutien, les congrès, les pauses café ou cigarette, l'aide personnelle ou professionnelle : Raphaël L, Sabine M, Florent A, Nathalie P, Thomas L, David P, Laurent I, Delphine G, Jeff G, Cécile V, Claude C, Josiane F, Nathalie T et Sandrine B.

Mes amies, mes complices, mes confidentes... Comment aurais-je tenue le coup sans vous... Ma poupée russe, **Marine**, un infini merci pour ces longues discussions philosophiques, scientifiques, amicales, humorístiques et j'en passe pour ne pas nous faire remarquer ^^ parfois légères, parfois profondes mais toujours, toujours riches. Mon petit écureuil, **Julie**, merci de toujours avoir été présente, dans les beaux comme dans les douloureux moments, ta sensibilité et ta gentillesse n'ont pas d'égal, jamais je n'oublierais nos fous rires et nos « serrage de coude » face à nos délicieuses manipes. Ma féérique clochette, **Chloé**, un grand merci pour nos moments de détente hors labo, hors banyuls, hors prise de tête, qu'est-ce que j'ai adoré ces moments volés partagés, ta perspicacité et ton soutien hors pair m'ont souvent rendu le sourire. A quand la prochaine virée en tant que jeune Docteur ? Ma juanita, **Caro**, merci pour tout... (Lâcheuse), merci pour les soirées interminables durant lesquelles je me suis plaint et où tu m'as écouté, dorloté, fais rire, changé les idées... les hivers banyulencs auraient été bien tristes sans ton sourire quotidien. Et plus récemment rencontré, mon amí, mon confident, **Eríc**, un énorme merci pour ta psychologie, ton écoute sans limite, tes conseils sages et réfléchis, ta cuisine exquise !

Mes palois favoris qui ont suivi autant que possible ma vie de thésarde, de jeune femme, merci à toi **Lionel**, jamais tu ne m'as laissé tomber... Ma **Caco**, mon amie de toujours, comme tu m'as manqué durant ces années, loin des yeux, loin du cœur, nous prouvons toi et moi à la perfection la fausseté de ce proverbe, merci ma Caco. A mon cher Montpelliérain, **Davy**... Merci pour les évasions et les découvertes sportives et humaines.

Et enfin ceux sans qui, je ne serais là. Mes **parents** aimants, **Marceau** et **Monía**, je ne trouve aucun mot pour vous exprimer ma gratitude, mon respect, mon amour... Vous m'avez poussé à faire mes propres choix, à mener mon chemin. Malgré mes faux pas, mes hésitations, grâce à la liberté que vous m'avez offerte, mon envol est aujourd'hui certain. Mon frère **Ange** et ma sœur **Aurore**, même loin vous êtes si près. C'est si bon de se sentir soutenu par ce lien fraternel. Infiniment, merci. Je serais si petite sans vous.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES ABRÉVIATIONS	
Avant propos	29
CHAPITRE I : Synthèse bibliographique	
1. Le cycle biogéochimique du carbone	
1.1 Utilisation microbienne du carbone dans les océans	
1.2 Les échanges de carbone entre l'atmosphère, les océans et la terre	
1.3 Augmentation du CO ₂ atmosphérique et conséquences	
2. La lumière dans les océans	
2.1 Variation de l'exposition lumineuse dans la colonne d'eau	
2.1.1 Variations spatiales de l'exposition lumineuse	38
2.1.2 Variations temporelles de l'exposition lumineuse	40
2.2 Adaptation des micro-organismes marins à la lumière	
3. La photohétérotrophie	42
3.1 Définition	
3.2 La protéorhodopsine	44
3.2.1 Découverte et description de la protéorhodopsine	44
3.2.2 Classification et diversité	46
3.2.3 Les rôles connus de la protéorhodopsine	
3.3 Comparaison des gains énergétiques par la photohétérotrophie	52

4.	La culture continue	54
Z	1 Principe du chémostat	54
2	Avantage par rapport aux cultures en batch	55
5.	Objectifs de la thèse	56
CH	APITRE II : Les chémostats, théorie et outils utilises	61
1.	La théorie des chémostats	62
2.	Les photobioréacteurs utilisés	71
CH sur	APITRE III : Conditions de croissance et tests expérimentaux en culture contin Photobacterium angustum S14	ue 77
1.	Matériels et Méthodes	78
2.	Résultats	81
3.	Conclusions	89
CH car	APITRE IV : Effet d'une exposition cyclique a la lumière sur le métabolisme de <i>P. angustum</i> S14 en limitation de glucose (540mg/l et 108mg/l)	du 95
1.	Résumé du chapitre	96
2.	Introduction	97
3. pro	<u>Article 1 : Light-driven increase in C yield is linked to maintenance in t</u> Deteorhodopsin-containing <i>Photobacterium angustum</i> S14	he 98

СН	APITRE V : Description de nouveaux génomes13	35
1.	Introduction13	36
2.	Criblage de souches de la collection MOLA13	38
2	2.1 Matériels et méthodes13	38
2	2.2 Résultats14	41
2	2.3 Conclusion	13
3.	Description de génomes : <u>Article 2 et 3</u> 14	14
4.	Courbes de croissance 15	54
4	.1 Matériels et Méthodes15	54
4	.2 Résultats	56
5.	Conclusion 15	59
СН	APITRE VI : Discussions générales et perspectives16	53
1.	De nouvelles connaissances sur le métabolisme photohétérotrophe peuvent-ell	es
ém	erger grâce à une approche méthodologique originale ?	58
2. PC	Quelles conditions environnementales régulent le comportement phototrophe d Ps ?	.es 70
3.	Perspectives	73
AN	NEXES	77
RE	FERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	95

LISTE DES FIGURES

Hors article, Chapitre I:

Figure 1 : Représentation schématique des réseaux trophiques marins. En rouge, la boucle microbienne ; en vert, la chaîne trophique classique ; en noir, les voies de MOD et, en violet, les voies de minéralisation.

Figure 2 : Diagramme montrant la relation entre la pompe biologique et la pompe carbone microbienne étroitement connectées dans le cycle du carbone marin (Jiao and Azam, 2010).

Figure 3 : Pénétration de la lumière dans la colonne d'eau selon la profondeur (modifié à partir de Matallana-Surget Sabine, manuscrit de thèse 2009).

Figure 4 : Modèle de la bio-utilisation de la lumière et du carbone dans l'océan. Chl = Chlorophylle, Bchl = Bactériochlorophylle, PR = Protéorhodopsine ; PP = Pompe à protons ; PSI+II = Photosystème I et II (Modifiée à partir de Jiao et al., (2006)).

Figure 5 : Structure secondaire de la protéorhodopsine (A) (Béjà et al., 2000) et modèle moléculaire de la protéorhodopsine (B) (Friedrich et al., 2002).

Figure 6 : Circuit énergétique potentiel de la protéorhodopsine (Adapté selon DeLong and Béjà, 2010).

Figure 7: Arbre phylogénétique des représentants de protéorhodopsine. Les séquences environnementales retrouvées à partir d'amplicons de PCR et de banques de BAC et de fosmides ainsi que celles provenant du métagénome de la mer des Sargasses (Venter et al., 2004) sont écrites en blanc sur un fond noir. (Béjà and Suzuki, 2008).

Figure 8 : Abondance bactérienne en fonction du temps à l'obscurité (courbe noire) et lors d'une illumination à la lumière blanche (ronds blancs sur courbe noire), à la lumière verte

(courbe verte), à la lumière bleue (courbe bleue) et à la lumière rouge (courbe rouge) (Gomez-Consarnau et al., 2007).

Figure 9 : Influence de la lumière continue (blanc) et de l'obscurité (noir) sur la croissance (densité optique à 600 nm et nombre de cellules) de *Vibrio campbelii* (souche sauvage, carrés et mutant Δ Protéorhodopsine, ronds) (Wang Z et al., 2012).

Figure 10 : Différence des photosystèmes récoltant la lumière chez les bactéries contenant la protéorhodopsine (A) et les bactéries phototrophes aérobies anoxygéniques (B) (Kirchman and Hanson, 2013).

Figure 11 : Représentation schématique des phases de la croissance bactérienne en culture continue (A) et en culture en batch (B), adaptée de Pearson Education (2004).

Figure 12 : Schéma représentant l'hypothèse écologique avantageuse de la photohétérotrophie (à droite) par rapport à l'hétérotrophie (à gauche).

Hors article, Chapitre II:

Figure 13 : Taux de croissance en fonction de la concentration en substrat selon le modèle de Monod pour une souche à faible (A) et haute (B) affinité pour le substrat limitant.

Figure 14: Méthode graphique pour calculer la maintenance énergétique et le « vrai rendement » (Pirt, 1975).

Figure 15 : Concentration de biomasse à l'état stationnaire en fonction du taux de dilution quand il y a un besoin en maintenance pour une croissance limitée par le substrat avec μ_m (taux de croissance maximal spécifique) = 1 h⁻¹; Ks = 0,005 g.l⁻¹; s_r (concentration en substrat dans le milieu frais) = 1 g.l⁻¹; Y_{EG} = 0,5 g biomasse (g de substrat ⁻¹ et m=0,08 (g.biomasse.h)⁻¹ (Pirt, 1975).

Figure 16 : Représentation schématique des trois réservoirs constituant le dispositif matériel utilisé pour la culture continue au cours de la thèse.

Figure 17 : Photographie d'un photobioréacteur Labfors Lux 3, (Infors) disponible au laboratoire (A) et de la double enveloppe contenant les néons d'éclairage (B).

Hors article, Chapitre III:

Figure 18 : Courbe de croissance à l'obscurité de *P. angustum* S14 dans une eau de mer artificielle (Berges et al., 2001), (A) et calcul du taux maximum de croissance (B). L'équation de la droite de régression $y = 0,2013 \times -4,2839$ des LN des valeurs de DO durant la phase exponentielle de croissance permet de déterminer le μ_{max} .

Figure 19 : Détermination du pH optimum de croissance de *P. angustum* S14 selon la densité optique (A) et le taux de croissance maximal (B).

Figure 20 : Taux de croissance maximal de *P.angustum* S14 selon la concentration en glucose à l'obscurité (rond noir) et à la lumière (rond blanc).

Figure 21 : Evolution de l'abondance bactérienne (cellules/ml) et de la pO_2 (%) en fonction du temps lors d'une exposition à une forte intensité de lumière (2241 µmol photon.m⁻².s⁻¹) et d'une intensité plus faible (896 µmol photon.m⁻².s⁻¹) après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 110 heures. Les losanges gris représentent les points de cytométrie et la courbe, l'évolution de la pO_2 .

Figure 22 : Evolution de l'abondance bactérienne (cellules/ml), de la pO_2 (%) et du POC (μ gC/ml) en fonction du temps lors d'une exposition à une intensité de lumière moyenne (406 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 60 heures. Après une brève autre phase d'obscurité, une intensité plus forte (747 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) a été appliquée. Les losanges gris représentent les points de cytométrie, les ronds noirs, les mesures de POC et la courbe, l'évolution de la pO₂.

Figure 23 : Evolution de l'abondance bactérienne (cellules/ml), du POC (μ g C/ml) (A) ; les losanges gris et les ronds noirs représentent les mesures de cytométrie et de POC respectivement ; de la pO2 (%) (B) et du ratio C:N (C) en fonction du temps lors d'une exposition à une intensité de lumière moyenne (406 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en continue après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 120 heures.

Figure 24 : Evolution de l'abondance bactérienne (cellules/ml), du POC (μ g C/ml) (A) ; les losanges gris et les ronds noirs représentent les mesures de cytométrie et de POC respectivement ; de la pO2 (%) (B) et du ratio C:N (C) en fonction du temps lors d'une exposition à une faible intensité de lumière (224 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en continue après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 120 heures.

Figure 25: Evolution de l'abondance bactérienne (cellules/ml) et du POC (μ g C/ml) (A) ; les losanges gris et les ronds noirs représentent les mesures de cytométrie et de POC respectivement ; du ratio C:N (B) en fonction du temps lors d'une exposition à une intensité de lumière moyenne (406 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en cycle 12h lumière – 12h obscurité. Les rectangles gris et blancs représentent les phases de lumière et d'obscurité respectivement.

Figure 26 : Photographie des bouchons utilisés pour le réservoir 1 du dispositif de culture continue pour la bouteille de 5 litres (A) et le bidon de 20 litres (B).

Hors article, Chapitre V:

Figure 27 : Le site d'observation du laboratoire ARAGO et ses trois stations de prélèvements (SOLA, POLA et MOLA).

Figure 28 : Station de prélèvements du projet MALINA, la souche MOLA 814 a été prélevée sur la station 240.

Figure 29 : Exemple d'un gel d'agarose après migration électrophorétique des produits de PCR ciblant le gène codant pour la protéorhodopsine obtenus pour quatre souches MOLA. Les souches écrites en jaune ont été testées avec le couple d'amorces possédant l'étiquette M13F en forward et les souches écrites en vert avec le couple d'amorces possédant l'étiquette M13F en reverse. S.L. signifie Smart Ladder (marqueur de taille) ; C- et C+ les témoins négatif et positif. Les marques rouges sont positionnées au niveau des bandes à séquencer.

Figure 30 : Exemple de la voie métabolique complète pour la phototrophie *via* la protéorhodopsine de *P. angustum* S14 en comparaison à celle de *Photobacterium sp.* SKA34, une *Gammaprotéobactérie* (Gomez-Consarnau et al. 2007, informations supplémentaires).

Figure 31 : Courbe de croissance à l'obscurité (ronds noirs reliés par une courbe noire) et à la lumière (ronds blancs reliés par une courbe en pointillés) de MOLA 455 sur l'eau de mer modifiée (2) (A) et détermination des taux maximaux de croissance à l'obscurité (losanges noirs) et à la lumière (losanges blancs) (B). Les équations des droites de régression des LN du nombre de cellules par ml obtenus en phase exponentielle de croissance y = 0,0166x + 14,735 (obscurité) et y = 0,0184x + 14,344 (lumière) ont permis de les déterminer.

Figure 32 : Courbe de croissance à l'obscurité (ronds noirs reliés par une courbe noire) et à la lumière (ronds blancs reliés par une courbe en pointillés) de MOLA 814 sur l'eau de mer d'Eguchi et al. (1996) (A) et détermination des taux maximaux de croissance à l'obscurité (losanges noirs) et à la lumière (losanges blancs) (B). Les équations des droites de régression des LN du nombre de cellules par ml obtenus en phase exponentielle de croissance y = 0,009x + 16,323 (obscurité) et y = 0,0088x + 16,69 (lumière) ont permis de les déterminer.

Figure 33 : Courbe de croissance à l'obscurité (ronds noirs reliés par une courbe noire) et à la lumière (ronds blancs reliés par une courbe en pointillés) de MOLA 814 sur l'eau de mer modifiée (2) (A) et détermination des taux maximaux de croissance à l'obscurité (losanges noirs) et à la lumière (losanges blancs) (B). Les équations des droites de régression des LN du nombre de cellules par ml obtenus en phase exponentielle de croissance y =0,018x + 16,316 (obscurité) et y = 0,0205x + 15,86 (lumière) ont permis de les déterminer.

Hors article, Chapitre VI:

Figure 34 : Proposition de protocole expérimental pour évaluer les rendements en carbone d'une souche bactérienne cultivable contenant la protéorhodopsine.

Hors article, Annexe :

Figure a : Relation entre le taux spécifique de croissance et la densité de la population d'une culture en continue d'*Aerobacter aerogenes* à l'équilibre en limitation de carbone (ronds noirs) et en limitation d'azote (ronds blancs) (Contois, 1959).

Figure b : Relation entre les réciproques des taux spécifiques de croissance $(1/\mu)$ et les ratios de la densité de population et de la concentration du substrat limitant P_e/S_e (glucose pour les ronds noirs et ammonium pour les ronds blancs) de cultures en continue *d'Aerobacter aerogenes* à l'équilibre (Contois, 1959).

Figure c : Représentation de la fonction d'inhibition d'Haldane (en rouge) par rapport au modèle de Monod (en bleu).

Figure d : Représentation de courbe de croissance selon la fonction d'inhibition d'Haldane (courbe rouge) selon le taux de dilution D choisi (ligne bleue). Les points d'équilibres sont entourés d'un cercle vert.

Figure e : Evolution de la densité optique (OD_{620nm}) , et du POC (µg.ml⁻¹) en fonction du temps lors d'une exposition à une intensité de lumière moyenne (406 µmol photon.m⁻².s⁻¹) après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 115 heures. Les losanges blancs et noirs représentent les points de densité optique pour les réplicat 1 et 2 respectivement, les ronds blancs et noirs, les mesures de POC pour les réplicat 1 et 2 respectivement.

Figure f : Evolution du pH au cours du temps pour les répliquas de cycles en chémostat.

Figure g : Evolution du pH ajusté avec une solution de soude à 0,25 M en fonction du temps lors d'une exposition continue à l'obscurité.

Figure h : Evolution de la densité optique (OD_{620nm}) et du POC (µgC/ml) en fonction du temps lors d'une exposition cyclique à une intensité de lumière moyenne (406 µmol photon.m⁻².s⁻¹) après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 120 heures en présence d'un ajustement de pH par une solution de soude. Les losanges noirs et blancs représentent les points de densité optique pour les réplicats 1 et 2 respectivement, les ronds noirs et blancs, les mesures de POC pour les réplicats 1 et 2 respectivement.

Figure i : Evolution du débit en $ml.h^{-1}$ en fonction du temps en heures pour les répliquas 1 (courbe noire) et 2 (courbe en pointillés).

Figure j : Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat H1. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps.

Figure k : Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat H2. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps.

Figure I : Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat contrôle H. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps.

Figure m : Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat L1. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps.

Figure n : Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat L2. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps.

Figure o: Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat contrôle L. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps.

LISTE DES TABLEAUX

Hors article, Chapitre I:

Tableau 1 : Mesure de l'intensité lumineuse (quanta.cm⁻².s⁻¹) fournie selon le nombre de néons allumés, à l'aide d'un luminomètre (Biospherical Instrument Inc. QSL-100 quantum solar irradiance meter). Le coefficient de conversion pour obtenir des μ Einstein (μ mol de photons par mètre carré et par seconde) est 1 quanta.cm⁻².s⁻¹ = 1,66.10⁻¹⁴ μ Einstein.

Hors article, Chapitre III:

Tableau 2: Description des expériences en co-limitation carbone-azote. Les signes +signifient que le paramètre est mesuré et les signes - qu'il ne l'est pas.

Hors article, Chapitre V :

 Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour cette étude.

Tableau 4 : Conditions de PCR appliquées selon le gène à amplifier.

Tableau 5 : Liste des souches bactériennes testées. Les quantités d'ADN extrait ainsi que les résultats de PCR et de séquençage sont répertoriés dans ce tableau. Les signes +, ++ ou +++ représentent l'intensité de la bande visible sur gel d'agarose après amplification du gène codant pour l'ARNr16S. La couleur verte est utilisée pour signaler les échantillons ayant subit une dilution au 100^{ème}. Les numéros dans la colonne « PCR PR » représentent le nombre de bandes coupées et purifiées sur le gel pour le séquençage. Le sigle NT signifie « Non Testée », le signe – que le gène de la protéorhodopsine n'est pas présent. Les cases grisées représentent une absence de résultat.

Tableau 6: Conditions de croissance des deux souches étudiées pour la réalisation des courbes de croissance.

Tableau 7 : Les différents milieux de culture testés et les temps de croissance de chaque souche. Les signes + représentent l'intensité du trouble observé et les signes – représentent les milieux pour lesquels aucune croissance n'a pu être observée.

Hors article, Chapitre VI:

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des études réalisées en lien avec la protéorhodopsine. Le code couleur est le suivant :



LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa : acide aminé
ADN : Acide DesoxyriboNucléotique
ADP : Adénosine Di Phosphate
ANR : Agence Nationale de Recherche
ARN - ARNm : Acide RiboNucléotique - Acide RiboNucléotique messager
Asp : Acide aspartique
ASW : Artificial Sea Water (en anglais)
ATP : Adénoside Tri Phosphate
ATPase : Adénoside Tri Phosphatase
BAC : Bacterial Artificial Chromosome (en anglais)
Bchl a : Bactériochlorophylle a
Bet : Bromure d'éthidium
Car : caroténoïde
Chl : Chlorophylle
C:N:P : ration Carbone-Azote-Phosphate
CO ₂ : Dioxyde de carbone
D : Taux de dilution
DAPI: 4',6'-diamidino-2-phénylindole
dNTP : desoxy Nucléotide Tri Phosphate
DO : Densité Optique
DOC : Carone Organique Dissout
E. coli : Escherichia coli
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
Fwd : Forward
GDPP : Global Distribution Database of Proteorhodopsin (en anglais)
GGPP synthase : Geranygéranyl Pyrophosphate synthase
Glu : Acide glutamique
H ₂ : Dihydrogène
HCl : Acide chloridrique

HMS : Her Majesty's Ship

LB: Lysogeny Broth (Luria-Bertani)

LN : Logarithme népérien

LNHM : Low Nutrient Heterotrophic Medium (en anglais)

LOMIC : Laboratoire d'Océanographie MICrobienne

m : Coefficient de maintenance

MB: Marine Broth

MOD : Matière Organique Dissoute

MODR : Matière Organique Dissoute Refractaire

MOLA : Microbial Observatory Laboratoire Arago est un site ayant mis en évidence une variabilité haute fréquence représentative des échanges entre le plateau continental et le courant Nord et se situant sur le flanc nord du canyon Lacaze-Duthiers à 19 milles de la côte ($42^{\circ}27^{\circ}205 \text{ N} - 03^{\circ}32^{\circ}565 \text{ E}$, fond d'environ 600m).

NaOH : Hydroxide de sodium

P. angustum S14 : Photobacterium angustum S14

PAR : Photosynthetically Active Radiation (en anglais)

PAA : Phototrophes Aérobie Anoxygénique

PAnA : Phototrophes Anaérobie Anoxygénique

pCO₂ : Pression partielle en dioxyde de carbone

PCP : Procaryote Contenant la Protéorhodopsine

PCR - PCRq : Polymerase Chain Reaction - Polymerase Chain Reaction quantitative (en anglais)

pmf: Force Protons Motrice

POC : Carbone Organique Particulaire

POLA : Plateau Observatoire Laboratoire Arago

PON : Azote Organique Particulaire

pO2 : Pression partielle en oxygène

PP : Pompe à Protons

ppm : Parties par million

PR : Protéorhodopsine

PRB : Protéorhodopsine Bleue

PRV : Protéorhodopsine Verte

PS: Photosystème

Rev : reverse

RHOMEO: ProteoRHOdopsin-containing prokaryotes in Marine EnvirOnments

- **rpm**: Rotation par minute
- **RS** : Rhodopsine Sensorielle
- SOLA : Station fixe Observatoire Laboratoire Arago
- T°C : Température en degré Celsius
- TAE : Tris-Acétate-EDTA
- **TB**: Tryphone Broth
- UV-A / UB-B : Ultra Violet A / Ultra Violet B
- UVR : Radiation Ultra Violet
- μ μ_{max} : Taux de croissance taux de croissance maximal

Avant propos

AVANT PROPOS

Le terme d'océanographie (étude des mers et des océans de la planète Terre) a été introduit en 1584 et il est vraiment employé depuis 1876 suite à la première grande expédition maritime Challenger à bord de la corvette britannique HMS (Her Majesty's Ship). Cette campagne océanographique a permis de recueillir de nombreuses données sur la température, la salinité et la densité de l'eau de mer mais aussi de cataloguer plus de 4 000 espèces animales inconnues. Elle a surtout montré l'importance fondamentale d'étudier ces vastes étendues océaniques, représentant plus de 70 % de notre planète. Depuis cette période, les océanographes cherchent à appréhender le fonctionnement de l'océan mondial en abordant des domaines très variés. Ils cherchent notamment à comprendre le fonctionnement des grands cycles biogéochimiques et la manière dont les océans répondent aux perturbations environnementales de plus en plus importantes (naturelles et anthropiques). Ces travaux intègrent les processus métaboliques d'une grande diversité d'organismes (macro- et micro- organismes).

Une des questions importantes posées dans le domaine de l'écologie marine consiste à établir les liens existants entre l'identité, la biodiversité et les fonctions des organismes et comment ces liens sont influencés par les perturbations de l'environnement. L'écologie microbienne marine est une discipline très jeune qui s'est fortement développée au cours des deux dernières décennies et qui s'intéresse à la nature de ces liens au sein des communautés de micro-organismes. La difficulté à cultiver les micro-organismes environnementaux – et donc à les étudier – a longtemps été un frein à l'avancée des recherches dans ce domaine, jusqu'à ce que les méthodes de biologie moléculaire, de séquençage massif et plus généralement d'« omics » puissent apporter des outils capables de révéler la structure et les fonctions des communautés naturelles sans avoir recours à des approches de mise en culture. Les micro-organismes (présents à environ 10⁵ cellules par millilitre d'eau de mer) ont montré à maintes reprises le rôle majeur qu'ils jouent dans l'équilibre et le fonctionnement des grands cycles de la matière. Les découvertes continuelles de nouvelles stratégies de survie, de nouveaux métabolismes, de processus d'adaptation à des conditions extrêmes rendent ce domaine d'étude particulièrement passionnant.

Le projet ANR (ProteoRHOdopsin-containing prokaryotes in Marine EnvirOnments RHOMEO) dans lequel s'inscrit ce doctorat a pour objectif principal d'apporter de nouvelles connaissances sur un groupe microbien particulier dont le métabolisme est encore mal connu et controversé. Il s'agit des procarvotes (Eubactérie, Archaea) contenant la protéorhodopsine (PCP). La combinaison entre des études in situ de la dynamique spatiale et temporelle des bactéries à protéorhodopsine à haute résolution phylogénétique et des études physiologiques de micro-organismes en culture au laboratoire (projet de cette thèse) est un réel atout pour comprendre le rôle que jouent ces bactéries dans l'océan. La protéorhodopsine est une protéine agissant comme une pompe à protons dépendant de la lumière. Elle apporterait des avantages aux micro-organismes la possédant et jouerait ainsi un rôle positif dans les interactions entre les bactéries (compétition) occupant des milieux pauvres en nutriment et dans lesquels la survie est un défi. L'hypothèse globale de ce projet de thèse est qu'en présence de lumière, le carbone disponible dans le milieu pourrait être utilisé de manière plus efficace par les PCPs puisqu'une partie de l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire serait apportée par l'énergie lumineuse supplémentaire qu'ils peuvent utiliser via ce photosystème. La synthèse bibliographique suivant cet avant-propos fournit la définition des éléments clés (le carbone, nutriment essentiel à la croissance bactérienne et à la production de biomasse ; la lumière, source d'énergie supplémentaire pour les PCPs, la protéorhodopsine) régissant ce projet de thèse, les détails de la technique de culture utilisée pour exploiter ce métabolisme (la culture en continu) et les objectifs précis de la thèse.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le cycle biogéochimique du carbone

La terre est une immense matrice à l'équilibre régi en particulier par les cycles biogéochimiques des principaux éléments que sont le carbone, l'azote, l'hydrogène, l'oxygène et le phosphore. Ces éléments sont essentiels à toutes les formes de vie. Parmi eux, le carbone constitue l'essentiel de la matière organique dissoute (MOD) et particulaire présente dans les océans.

1.1 Utilisation microbienne du carbone dans les océans

La matière organique présente dans l'eau de mer est un mélange complexe de composés organiques de compositions chimiques et de structures diverses. La MOD est la forme de carbone organique dominante dans les océans (700 Gigatonnes). Longtemps considérées comme des acteurs mineurs dans le fonctionnement des réseaux trophiques océaniques (Steele, 1974), les bactéries marines ont été jugées comme une composante majeure depuis qu'il a été démontré qu'elles participent directement aux flux de carbone et d'énergie (Pomeroy, 1974). Une décennie plus tard, Azam et al., (1983) formulent le concept de la boucle microbienne qui prend en compte différentes interactions écologiques (le commensalisme, la compétition et la prédation). Dans la boucle microbienne, les bactéries sont consommées par certains flagellés, eux-mêmes consommés par des flagéllés plus grands, les protozoaires. Cette chaîne permet la libération de substances utilisables par les bactéries. Grâce à leurs systèmes enzymatiques propres et variés les bactéries dégradent et assimilent la matière organique. La boucle microbienne fournit ainsi des ressources aux consommateurs primaires et la production primaire est soutenue par le phénomène de reminéralisation (Figure 1).



Figure 1 : Représentation schématique des réseaux trophiques marins. En rouge, la boucle microbienne ; en vert, la chaîne trophique classique ; en noir, les voies de MOD et, en violet, les voies de minéralisation.

Les bactéries hétérotrophes ont, par conséquent, une place essentielle dans le cycle biogéochimique du carbone puisque qu'elles consomment parfois près de la moitié du carbone fixé par les producteurs primaires (Cole et al., 1988; Ducklow, 2000). De plus, le carbone respiré par ces bactéries est recyclé en CO₂ et il participe à l'augmentation de la pression partielle en CO₂ (pCO₂) dans l'océan. Si le rôle des bactéries hétérotrophes est très souvent appréhendé par l'étude de leur rôle dans le fonctionnement des cycles biogéochimiques, celui des bactéries photohétérotrophes dans le cycle du carbone marin est en revanche beaucoup plus complexe à étudier. La capacité de ces bactéries à utiliser la lumière pour fixer le carbone minéral pourrait réduire leurs besoins en carbone organique, ce qui signifierait que leur contribution à la pression partielle de CO₂ serait moindre. Les recherches en cours sur ces bactéries visent à mieux comprendre leur métabolisme et leur rôle dans le cadre de la séquestration du carbone dans les océans, donc dans l'équilibre des échanges entre l'atmosphère et l'océan.

1.2 Les échanges de carbone entre l'atmosphère, les océans et la terre

Le CO₂ atmosphérique est rapidement échangé avec les océans et les écosystèmes terrestres (Kleypas et al., 1999). Il est maintenant bien établi que les océans sont le principal puits de carbone avec un taux d'absorption de 30 % contre environ 20 % (selon la latitude) en milieu terrestre (Veron et al., 2009). Le taux de carbone inorganique dans les océans est 50 fois celui de l'atmosphère. L'échange entre ces deux réservoirs atteint 90 Gigatonnes par an dans les deux sens résultant en un équilibre rapide entre l'atmosphère et la surface de l'océan (Falkowski, 2000). Toutefois, plus le CO₂ atmosphérique augmente et moins l'océan est efficace dans son rôle d'absorption (Kleypas et al., 1999). La concentration en carbone inorganique dissout dans l'océan résulte de l'action de deux procédés : la pompe de solubilité et la pompe biologique (Sarmiento and Bender, 1994; Volk and Hoffert, 1985). Grâce à la pompe biologique, la concentration de CO₂ atmosphérique reste 150 à 200 parties par million (ppm) plus basse qu'elle ne devrait l'être si tout le phytoplancton océanique venait à disparaître (Laws, 2000). Plus récemment, un nouveau concept est venu se greffer à ces deux pompes, celui de la pompe à carbone microbienne (Figure 2). Elle conceptualise un mécanisme de séquestration de la phase dissoute basée sur la formation, par les microorganismes, de matière organique dissoute réfractaire (MODR) résistante à la décomposition et à l'assimilation biologique et donc qui persiste dans la colonne d'eau (Jiao and Azam, 2010).



Figure 2 : Diagramme montrant la relation entre la pompe biologique et la pompe carbone microbienne étroitement connectées dans le cycle du carbone marin (Jiao and Azam, 2010).

Les écosystèmes terrestres échangent également rapidement le CO_2 avec l'atmosphère mais il n'existe pas de pompes physicochimiques. Le CO_2 est prélevé dans l'atmosphère par les processus de photosynthèse et stocké sous forme de matière organique. Il retourne à l'atmosphère *via* différentes voies respiratoires (respiration des plantes, respiration hétérotrophe et perturbation de l'environnement comme des feux) (Falkowski, 2000).

1.3 Augmentation du CO₂ atmosphérique et conséquences

Depuis 200 ans, l'activité humaine a fortement influencé le cycle global du carbone et a déstabilisé l'équilibre des flux entre les différents réservoirs. Le CO₂ atmosphérique a augmenté de 280 ppm environ pour atteindre un niveau à 387 ppm aujourd'hui (Veron et al., 2009). Plusieurs conséquences écologiques en résultent comme l'acidification des océans, l'augmentation de la température des océans, la réduction du transport du CO₂ atmosphérique de la surface vers les couches plus profondes de la colonne d'eau ou encore les changements du niveau des océans (Joos, 1999). Bien que les avis quant aux importances de ces conséquences soient parfois controversés (Maier-Reimer and Hasselmann, 1987; Sarmiento and Quéré, 1996; Sarmiento et al., 1998), il est tout de même évident que le CO₂ dissous forme de l'acide carbonique qui altère le ratio du tampon carbonate/bicarbonate qui régule le pH. Cela engendre une acidification du milieu (Sabine et al., 2004; Feely et al., 2009; Royal Society (Great Britain), 2005). Il est utopique de croire qu'une baisse estimée à 0,3-0,4 unités de pH (sachant que la diminution d'une unité de pH augmente de 10 l'acidité) sur le siècle à venir (Feely et al., 2009) n'affectera pas des organismes parmi les poissons, les coraux, les algues et les bactéries, donc l'équilibre des réseaux trophiques et des écosystèmes. Sans compter les changements climatiques globaux (Houghton et al., 1996; Karl, 2003), la température des surfaces océaniques est également affectée par l'augmentation du CO2 atmosphérique (Levitus, 2000); or la température a un effet positif direct sur les taux de croissance des organismes, dont les bactéries (Kirchman et al., 1995).

Pour l'ensemble de ces impacts écologiques, il est nécessaire de comprendre au mieux les flux de carbone dans les océans. Le carbone est un nutriment souvent limitant dans les océans et les autres sources d'énergie exploitables par les organismes, comme la lumière, se révèlent d'une importance majeure pour la survie de certaines espèces.

2. La lumière dans les océans

Jusqu'à environ 200 mètres de profondeur, l'intensité de la lumière est telle que la production primaire photosynthétique domine les processus microbiens (zone euphotique). Son intensité diminue donc exponentiellement avec la distance depuis sa source (le soleil). Cette perte est appelée l'atténuation lumineuse. La propagation de la lumière dans la colonne d'eau est régie par deux processus : l'absorption (qui implique la conversion de l'énergie électromagnétique en chaleur ou en énergie chimique) et la diffusion (changement de direction de l'énergie électromagnétique).

2.1 Variation de l'exposition lumineuse dans la colonne d'eau

Au-delà des actions physiques, la couverture nuageuse, la présence de glace ou de neige à la surface de l'eau et même les changements dans les angles du zénith solaire peuvent jouer un rôle important dans l'intensité et la qualité de la source lumineuse disponible pour les organismes marins. Deux types de variations sont répertoriées : les variations selon une échelle spatiale (présence de particules, profondeur, latitude) et les variations selon une échelle temporelle (cycles jour/nuit, saisons).

2.1.1 Variations spatiales de l'exposition lumineuse

L'intensité de la lumière pénétrant dans les océans est un facteur très important influençant le rôle que cette énergie peut jouer sur les métabolismes mais la qualité de cette lumière n'est pas à négliger. Le soleil produit un large spectre de radiations et selon leur longueur d'onde et la profondeur (**variation verticale**) des organismes vivants, l'exposition varie, avec une pénétration parfois non négligeable des radiations ultraviolettes (UVR). En effet, les longueurs d'ondes les plus courtes (UV-B) sont absorbées plus rapidement dans la colonne d'eau que les longueurs d'onde plus grandes, notamment les UVA puis les Radiations Photosynthétiquement Actives (PAR en anglais)-(Hargreaves, 2003). Donc la surface océanique est exposée à l'ensemble du spectre (UV-A, UV-B et PAR) et les couches les plus profondes de la zone photique sont seulement exposées aux PAR (Figure 3). Les UVR sont plus faibles également dans les régions polaires qu'à des latitudes plus basses (variation latitudinale) mais la destruction de la couche d'ozone peut parfois renforcer leur effet dans certaines de ces régions. D'ailleurs, de nombreuses études ont été menées sur les effets des UVR sur l'Arctique et l'Antarctique puisqu'elles sont les régions les plus affectées par les effets collatéraux du réchauffement climatique (Johannessen, 1999; Rothrock et al., 1999) et la destruction progressive de la couche d'ozone (Jones and Shanklin, 1995; Müller et al., 1997). De plus, les organismes occupant ces eaux sont exposés à de longues périodes de lumière continue durant les étés polaires. Dans les eaux tropicales et subtropicales, les organismes sont exposés à de très fortes doses d'UVR du fait de la stratification des masses d'eau. Enfin, les régions tempérées sont soumises au rythme de saisons changeantes entraînant des eaux mélangées le long de la colonne d'eau en hiver et une colonne plus stratifiée en été. Ainsi, les micro-organismes sont exposés à des conditions très différentes de lumière selon leur localisation spaciale, latitudinale et le long de la colonne d'eau.



Figure 3 : Pénétration de la lumière dans la colonne d'eau selon la profondeur (modifié à partir de Matallana-Surget Sabine, manuscrit de thèse 2009).

2.1.2 Variations temporelles de l'exposition lumineuse

Tout au long d'une journée, les micro-organismes marins sont exposés à des conditions de radiations variables allant de fortes intensités de lumière à l'obscurité totale (variation diurne). Les variations des paramètres biologiques dans les océans selon les changements diurnes ont des conséquences directes sur les relations entre le soleil et les organismes marins. Par exemple, le pic journalier dans la production primaire se produit généralement vers le midi solaire et il pourrait contrôler la plupart des patterns cycliques chez les brouteurs et les consommateurs de MOD selon certains auteurs (Gasol et al., 1998; Hernández-León et al., 2001; Shiah, 1999). Il a également été montré que les UVR affecteraient directement les organismes au cours d'un cycle journalier. Par exemple, le gène *recA* (responsable de la réparation du matériel génétique) a montré une surexpression à la fin de la journée (Booth et al., 2001). Plus récemment et dans la même optique, l'abondance bactérienne, l'activité hétérotrophique bactérienne et le broutage par les flagellés ont révélé des variations synchronisées avec des valeurs plus hautes la nuit par rapport aux mesures effectuées en journée (Ruiz-González et al., 2012b).

Parallèlement aux variations journalières, les niveaux de radiations dans la colonne d'eau ne sont pas les mêmes selon les saisons (**variation saisonnière**). Ils augmentent durant l'été, ce qui entraîne une stratification plus prononcée de la colonne d'eau (thermocline) à cause des températures plus chaudes et ainsi l'augmentation de l'exposition lumineuse de la couche superficielle due au confinement des organismes.

Les quelques études réalisées sur la réponse des communautés naturelles microbiennes aux variations saisonnières du régime lumineux demeurent controversées. En effet, il a initialement été montré que durant les périodes estivales, l'inhibition de la croissance du phytoplancton par les UVR était moins forte (Gala and Giesy, 1991; Hobson and Hartley, 1983). Quelques années plus tard, il a été révélé que les communautés phytoplanctoniques étaient autant sensibles aux rayons lumineux l'été que durant le printemps ou l'automne (Furgal and Smith, 1997). Il est aujourd'hui évident qu'il existe une saisonnalité dans la réponse des bactéries aux rayonnements solaires qui ne varie pas seulement selon le niveau de radiations et les caractéristiques spectrales mais aussi selon la composition taxonomique de la communauté et les antécédents historiques de la lumière dans l'environnement étudié (Ruiz-González et al., 2012a).

2.2 Adaptation des micro-organismes marins à la lumière

Bien que certaines souches bactériennes isolées aient révélé des sensibilités différentes aux UVR ainsi que des capacités et des stratégies diverses de réparations aux dommages créés à l'ADN (Agogue et al., 2005; Alonso-Saez et al., 2006; Arrieta et al., 2000; Joux et al., 1999; Kataoka et al., 2009), il n'a pas encore été clairement montré que le bactérioplancton était capable de s'adapter pleinement aux changements d'intensités lumineuses.

Certaines études suggèrent l'absence de stratégie de photo-adaptation en soulignant le fait que les bactéries pigmentées n'étaient pas plus résistantes aux radiations solaires que les bactéries non pigmentées (Agogue et al., 2005) ou qu'il n'existe pas de corrélation entre les profondeurs d'échantillonnage et les indices de survie des souches exposées en laboratoire (Bailey et al., 1983), ou encore que les bactéries issues de la couche très superficielle de la colonne d'eau (microcouche de surface) sont plus sensibles aux UV-B que les bactéries présentes sous la pynocline (Herndl et al., 1993). D'autres équipes scientifiques ont publié des résultats contradictoires. Par exemple, dès 1980, il a été suggéré qu'une communauté bactérienne hétérotrophe exposée à des UVR aurait une plus grande proportion de cellules pigmentées bien que le nombre total de cellules soit plus faible (Thomson et al., 1980). Toujours dans l'optique de démontrer l'existence d'une photo-adaptation du bactérioplancton, il a été observé que les bactéries retrouvent une activité plus forte après le premier jour d'exposition aux radiations (Pakulski et al., 1998), mais aussi qu'elles sont plus sensibles aux UVR au printemps qu'en été (Alonso-Saez et al., 2006) et que, contrairement à l'étude de Bailey et al., (1983), les communautés bactériennes des eaux profondes sont plus sensibles que celles des eaux de surface (Joux et al., 1999). Une plus faible réduction de la diversité bactérienne et un potentiel de réparation plus important ont été observés au sein du bactérioneuston comparativement au bactérioplancton (Santos et al., 2009). L'ensemble de ces études semble suggérer que l'hypothèse de la photo-adaptation des communautés microbiennes marines est réaliste, mais très variable selon la structure des communautés et selon les échelles d'observation.

3. La photohétérotrophie

3.1 Définition

La photohétérotrophie peut être définie comme la capacité d'un organisme à utiliser à la fois des molécules organiques et la lumière comme source d'énergie. Ce type de mélange mixotrophe constitue une stratégie d'adaptation non négligeable des micro-organismes dans les écosystèmes qu'ils colonisent. En effet, dans des environnements oligotrophes, lorsque les ressources en carbone se font rares, les micro-organismes photohétérotrophes pourraient basculer d'un métabolisme hétérotrophe à un métabolisme phototrophe (Kolber et al., 2001), voire coupler les deux métabolismes. Cette capacité pourrait leur apporter un avantage certain sur les micro-organismes capables uniquement d'hétérotrophie. Ce métabolisme particulier, bien qu'encore mal compris, est retrouvé chez de nombreux organismes taxonomiquement diversifiés et largement distribués dans les environnements aquatiques.

Trois grands groupes microbiens sont aujourd'hui répertoriés comme photohétérotrophes. (1) Le premier groupe comprend les Cyanobactéries comme les espèces des genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus*. Elles ont été qualifiées de photohétérotrophes facultatifs. Longtemps connues pour le processus de photosynthèse aérobie oxygénique, durant lequel l'énergie lumineuse est capturée par des pigments transmembranaires et convertie en énergie chimique sous forme de carbone réduit (Falkowski, 2000), certains auteurs ont aussi démontré leur capacité à utiliser l'urée (Rippka et al., 2000), les acides aminés (Chen et al., 1991; Paerl, 1991) et même une activité d'aminopeptidase (Martinez and Azam, 1993). Le rôle écologique de ces micro-organismes photoautotrophes est majeur en particulier grâce à leur forte implication dans la production bactérienne (Zubkov et al., 2003) et l'assimilation du diméthylsulfopropionate (Malmstrom et al., 2005). (2) Le second groupe se compose des bactéries phototrophes aérobies et anaérobies (bactéries pourpres et vertes) anoxygéniques (PAA et PAnA respectivement). Elles sont caractérisées par la présence d'un pigment collecteur de lumière, la bactériochlorophylle bactériochlorophylle a (Bchl a) (Yurkov and Beatty, 1998). Les bactéries contenant la Bchl a ont initialement été décrites comme des micro-organismes nécessitant des conditions strictement anaérobies pour réaliser la photosynthèse (Pfennig, 1968). Puis Shiba and Simidu (1982), ont prouvé qu'une bactérie aérobie stricte, Erythrobacter longus, produisait cet appareil photosynthétique en présence d'oxygène et de lumière. Depuis, plusieurs études ont dévoilé la large distribution taxonomique de ces micro-organismes bien que la plus grande partie des isolats soit restreinte aux genres *Roseobacter*, *Erythrobacter* et à deux genres de *Gammaprotéobactéries* (Cho and Giovannoni, 2004; Rathgeber et al., 2004). En plus d'être phylogénétiquement variées, elles sont aussi ubiquistes et abondantes dans différents océans du globe (Koblížek et al., 2007; Kolber et al., 2001). La fonction de l'appareil photosynthétique anoxygénique est de transformer l'énergie lumineuse en un gradient de protons électrochimique à travers la membrane mais sans production d'oxygène à la fin de la chaîne de transport. Ce gradient pourra ensuite être utilisé pour la production d'ATP, le transport actif de molécules, la mobilité et autres procédés nécessitant de l'énergie (Eiler, 2006). (3) Le groupe le plus récemment découvert (Béja et al., 2000) est celui des bactéries contenant la protéorhodopsine, groupe d'intérêt majeur qui constitue le support biologique de la thèse.

Assemblées, ces différentes formes de photohétérotrophie ont permis d'évaluer conceptuellement un modèle (Jiao et al., 2006) des flux énergétiques et du cycle du carbone dirigés par la lumière et par les différents photosystèmes cités plus haut (Figure 4).



Figure 4 : Modèle de la bio-utilisation de la lumière et du carbone dans l'océan. Chl = Chlorophylle, Bchl = Bactériochlorophylle, PR = Protéorhodopsine ; PP = Pompe à protons ; PSI+II = Photosystème I et II (Modifiée à partir de Jiao et al., (2006)).

3.2 La protéorhodopsine

C'est en 1971 que la première photoprotéine est découverte dans une souche d'*Archaea, Halobacterium halobium*. Tout d'abord appelée membrane pourpre, (Oesterhelt and Stoeckenius, 1971) ont décidé de nommer ce photorécepteur bactériorhodopsine après avoir mis en avant les fortes similarités qu'il partageait avec les pigments visuels (les rhodopsines).

3.2.1 Découverte et description de la protéorhodopsine

Il y a une dizaine d'année, la protéorhodopsine (PR) a été découverte par Béjà et al., (2000) lors de l'analyse de séquence d'un fragment génomique de 130 kb d'une *Gammaprotéobactérie* marine non cultivable (SAR86). Le gène de la protéorhodopsine code pour un polypeptide de 249 acides aminés (aa). Comme les rhodopsines des *Archaea*, cette protéine est constituée de sept hélices α transmembranaires qui forment une poche contenant un chromophore rétinilien (Figure 5). Cette photo-protéine est spécialement conçue pour absorber les longueurs d'onde de lumière qui sont présentes dans leur environnement proche comme la lumière verte dans les eaux de surface et la lumière bleue dans des profondeurs plus importantes de la colonne d'eau (Béjà et al., 2001). Les résultats obtenus lors de ces études indiquent également que la protéorhodopsine transloque des protons lors d'une exposition lumineuse permettant de générer un potentiel de membrane. Elle fonctionne donc comme une pompe à protons dépendant de la lumière.



Figure 5 : Structure secondaire de la protéorhodopsine (A) (Béjà et al., 2000) et modèle moléculaire de la protéorhodopsine (B) (Friedrich et al., 2002).

Un circuit énergétique potentiel de la protéorhodopsine (Figure 6) a été proposé par DeLong et Béjà (2010). Dans ce schéma conceptuel, la protéorhodopsine utilise la lumière pour transloquer des protons à travers la membrane cytoplasmique. Les protons extracellulaires en excès créent une force proton motrice (pmf) et l'ATPase se sert de cette pmf pour synthétiser de l'énergie sous forme d'Adénosine triphosphate (ATP) à partir d'ADP. Pour être fonctionnel, le photosystème de la protéorhodopsine nécessite la présence de six gènes seulement (cinq codant pour les protéines de biosynthèse de photo-pigments et un pour une protéorhodopsine) : *crtE* (GGPP synthase putative), *crtI* (phytoène dehydrogenase), *crtB* (phytoène synthase), *crtY* (lycopène cyclase) permettant ensemble de synthétiser le β carotène à partir de farnesyle diphosphate, *blh* (15,15' β carotène dioxygénase) qui coupe le β carotène produisant deux molécules d'*all-trans*-retinale et *idi* (isopentenyle diphosphate δ -isomérase) (Martinez et al., 2007). Il s'avère que même sans le gène *idi*, le photosystème fonctionne correctement dans le cas des *Gammaprotéobactéries* (Gómez-Consarnau et al., 2007, informations supplémentaires).

Le fonctionnement de la protéorhodopsine n'est pas simplement dirigé et contrôlé par la lumière environnante mais il l'est également par le pH. En effet, à pH alcalin la PR est une pompe libérant des protons à l'extérieur de la cellule mais, à pH acide, la direction de la pompe serait inversée (Friedrich et al., 2002).



Figure 6 : Circuit énergétique potentiel de la protéorhodopsine (Adapté selon DeLong and Béjà, 2010).

Plusieurs acides aminés constituant la protéorhodopsine ont montré leur rôle crucial dans son fonctionnement. L'accepteur et le donneur de protons sont respectivement l'Asp97 et la Glu108, respectivement homologues de l'Asp85 et de l'Asp96 dans la bactériorhodopsine (Dioumaev et al., 2002). Le résidu d'acide aminé Asp97 joue un rôle fondamental dans la direction du transport de ceux-ci selon son état de protonation (Friedrich et al. 2002). Une mutation du donneur de protons n'entraîne pas de changement significatif dans le spectre d'absorption de la protéorhodopsine. En revanche, une mutation sur le résidu d'acide aminé à la position 105 a complètement inter-converti le spectre d'absorption. Cet acide aminé est l'élément clé responsable du « tuning » spectral chez les protéorhodopsines (Man et al., 2003). Sa mutation engendre une déstabilisation de la structure et la perturbation du transport de protons (Maiti et al., 2012). Il a également été montré que les interactions protéinechromophore dans la protéorhodopsine étaient dépendantes du type d'acide aminé présent à la position 178 (Yamada et al., 2010). L'évaluation du spectre pH-dépendant a montré que la neutralisation de la charge à la position 227 avait une influence remarquable sur les propriétés interne de la protéine. La mutation n'engendre pas seulement une constante d'acidité (pka) plus faible mais empêche également les réactions de reprotonation (Herz et al., 2012).

3.2.2 Classification et diversité

Les rhodopsines sont classées dans deux grands groupes distincts (Jiao et al., 2006) : - le type I ou type microbien : ce sont des pompes à ions également subdivisées en deux classes, les pompes à chlorides (halorhodopsine) qui transportent des ions Cl⁻ vers l'intérieur de la cellule avec un maximum d'absorption à λ_{max} de 570nm et les pompes à protons (bactériorhodopsine, protéorhodopsine) qui transportent des H⁺ vers l'extérieur de cellule ; - le type II ou rhodopsine sensorielle (RS) : ce sont les récepteurs photosensibles dans les yeux des animaux. Ce type est également divisé en deux groupes, les RS I (photo-axe pour la lumière orange) et RS II (photo-axe pour la lumière verte) que l'on distingue par la séquence de gène et les caractéristiques spectroscopiques.

Les protéorhodopsines peuvent également être différenciées comme suit (Jiao et al. 2006) : protéorhodopsine verte (PRV), retrouvée majoritairement en surface océanique avec une λ_{max} de 527 nm ; protéorhodopsine bleue (PRB), retrouvée dans les eaux plus profondes (75m) avec une λ_{max} de 490 nm et protéorhodopsine verte et bleue (PRVB) avec une λ_{max} de

515 nm. L'acide aminé retrouvé en position 105 différencie ces sous-classes, une leucine pour les PRV et une glutamine pour les PRB (Man et al., 2003). Mais très récemment, il a été souligné qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les communautés de protéorhodopsines trouvées à des profondeurs diverses sur un site de même profil mais qu'entre différents lieux géographiques, il y avait une différence significative (Bo, 2010). Les protéorhodopsines se regrouperaient donc davantage selon leur situation géographique que par la profondeur dans laquelle elles évoluent.

Peu de temps après sa découverte, les études sur l'abondance, la diversité et la distribution des communautés portant le gène codant pour la protéorhodopsine se sont multipliées. Sur la base de données génomiques, les protéorhodopsines sont présentes à une fréquence allant de 13 % à 80 % chez les bactéries marines et les *Archaea* dans les eaux de surface océanique (de La Torre et al., 2003; Moran and Miller, 2007). Sachant que le nombre de cellules bactériennes par litre d'eau de mer peut approcher le billion, l'influence potentielle des flux énergétiques basés sur la protéorhodopsine pourrait être significative. En plus d'être très abondant, le gène codant pour la protéorhodopsine a été retrouvé parmi une grande variété taxonomique dont les *Alphaproteobactéries* (SAR11 et SAR92 par exemple) et les *Gammaproteobactéries* (SAR86 par exemple) (Béjà et al., 2000; Giovannoni et al., 2005; Sabehi et al., 2004; Stingl et al., 2007) mais aussi les *Betaproteobactéries* (De la Torre et al., 2003), les *Bacteroidetes* (Venter, 2004) et les *Euryarchaeotes* (Frigaard et al., 2006). Ces recherches ont donc largement montré l'importante diversité taxonomique du gène de la protéorhodopsine au sein de groupes écologiquement importants (Figure 7).

Il a également été montré que les bactéries contenant la protéorhodopsine sont distribuées dans tous les océans du globe comme dans les eaux de surface de la baie de Monterey (Béjà et al., 2001), dans le Pacifique ouest, le long des côtes chinoises (Jiao et al. 2006), dans la mer Méditerranée et la mer des Sargasses (Sabehi et al., 2007), dans la mer du Nord , dans la mer de glace Antarctique et la mer de Ross (Koh et al., 2010) et même dans les eaux douces, les eaux saumâtres et la mer Baltique (Atamna-Ismaeel et al., 2008) et dans des points chauds acides et situés dans les hauteurs des Andes (Bohorquez et al., 2012).

La large distribution géographique de ce gène parmi une gamme de taxons phylogénétiques très divers démontre aisément le rôle significatif que tient la protéorhodopsine dans la physiologie des micro-organismes, l'écologie des océans et les flux d'énergie et de carbone dans la colonne d'eau.



Figure 7 : Arbre phylogénétique des représentants de protéorhodopsine. Les séquences environnementales retrouvées à partir d'amplicons de PCR et de banques de BAC et de fosmides ainsi que celles provenant du métagénome de la mer des Sargasses (Venter et al., 2004) sont écrites en blanc sur un fond noir. (Béjà and Suzuki, 2008).

3.2.3 Les rôles connus de la protéorhodopsine

Jusqu'à présent, les études réalisées sur les fonctions de cette photo-protéine et le lien étroit qu'elle pourrait avoir avec la lumière demeurent controversées. Elle n'a pas été associée à ce jour à une fonction spécifique mais à divers rôles dans la physiologie des souches testées. Walter et al., (2007) ont démontré l'expression du gène de la protéorhodopsine d'une souche de SAR86 dans *Escherichia coli*. Ils ont aussi montré que lorsque la respiration était inhibée, cette souche d'*E. coli* devenait plus efficace à la lumière. L'illumination de ces cellules crée une pmf qui fait fonctionner le moteur flagellaire. Quand la lumière est coupée, les cellules protéorhodopsine⁺ ralentissent considérablement et finissent par s'arrêter de bouger. Une autre étude a démontré un impact positif de la lumière sur la croissance de *Dokdonia*

MED134, une Flavobactérie marine. La croissance la plus stimulée était due à l'illumination par la lumière blanche suivie de la lumière verte, puis bleue et enfin rouge (Figure 8) avec une surexpression des ARNm à la lumière. Cette étude a conclu que la phototrophie via la protéorhodopsine pouvait permettre à ces micro-organismes de maintenir une croissance nette durant les périodes où la concentration en matière organique diminuait (Gómez-Consarnau et al., 2007). L'illumination de clones contenant le gène codant pour la protéorhodopsine génère une pmf qui conduit à la synthèse d'ATP cellulaire. Des expériences de culture en milieu riche et en milieu pauvre à la lumière et à l'obscurité avec une souche de Vibrio AND4 et un mutant sans protéorhodopsine ont suggéré que la protéorhodopsine pouvait augmenter la survie durant des périodes de carence en eau de mer et que ceci était la conséquence directe de leur capacité à utiliser l'énergie lumineuse via la protéorhodopsine (Gómez-Consarnau et al., 2010). En 2011, Steindler et al., ont suggéré que la lumière provoquerait des changements importants dans la physiologie et l'expression du gène codant pour la protéorhodopsine de Candidatus Pelagibacter ubique lorsqu'elle était limitée en carbone mais qu'elle fournissait peu ou pas d'avantage dans la phase active de croissance sur des substrats de carbone organique. Ces résultats les amenèrent à conclure que la protéorhodopsine pourrait exercer son impact seulement dans des conditions de limitation en carbone. La protéorhodopsine aurait donc une fonction et un rôle dans la résistance aux stress largement commun aux océans limités en carbone. Ils ont également formulé l'hypothèse selon laquelle la fonction de la protéorhodopsine serait de remplacer la respiration.

Des essais de photo-induction comparative réalisés récemment ont démontré une surexpression du gène codant pour la protéorhodopsine en présence de lumière et une photophosphorylation conduite par la protéorhodopsine chez des cellules sauvages de *Vibrio campbelli* conduisant à une amélioration de la survie cellulaire durant le stress respiratoire. Il est aussi souligné que RpoS1 (régulateur de la réponse au stress et de la phase stationnaire) régulerait positivement l'expression de la protéorhodopsine et de la pigmentation (Wang Z. et al., 2012).



Figure 8 : Abondance bactérienne en fonction du temps à l'obscurité (courbe noire) et lors d'une illumination à la lumière blanche (ronds blancs sur courbe noire), à la lumière verte (courbe verte), à la lumière bleue (courbe bleue) et à la lumière rouge (courbe rouge) (Gomez-Consarnau et al., 2007).

Cependant toutes les études publiées à ce jour n'ont pas confirmé l'avantage que pourrait avoir une souche à posséder ce gène d'intérêt majeur. En effet, des cultures de SAR11 (*Pelagibacter*) avec croissance à la lumière ou à l'obscurité n'ont pas montré de différence dans le taux de croissance ou le rendement cellulaire (Giovannoni et al., 2005). De la même manière, l'étude sur un des groupes bactériens les plus abondants dans les océans, les SAR92 (qui atteignent 10 % de la communauté bactérienne totale dans les eaux de surface) a révélé que les souches testées n'amélioraient ni le rendement de croissance ni leur taux de croissance. L'hypothèse soulevée est que bien qu'aucun supplément de carbone n'ait été ajouté dans le milieu, les cellules se sont déjà développées à leur taux maximal et donc l'effet de la protéorhodopsine n'était pas visible (Stingl et al., 2007). Plus récemment, dans son étude sur *Vibrio campbelii*, Wang Z. et al., (2012), avance l'effet négatif de la lumière continue sur le long terme. Le déclin du nombre de cellules (Figure 9) pourrait être dû au stress d'une exposition continue pouvant conduire à l'accumulation d'effets néfastes sur les composés cellulaires et/ou l'induction d'un phage lytique dirigé par le stress lumineux puisque la souche contient quatre phages dans son génome.



Figure 9 : Influence de la lumière continue (blanc) et de l'obscurité (noir) sur la croissance (densité optique à 600 nm et nombre de cellules) de Vibrio campbelii (souche sauvage, carrés et mutant Δ Protéorhodopsine, ronds) (Wang Z et al., 2012).

Comme le suggèrent Akram et al., (2013), les informations sur la façon dont est régulée l'expression du gène codant pour la protéorhodopsine dans les diverses souches bactériennes le possédant demeurent fortement limitées. D'après leur étude, la surexpression du gène à la lumière dans la souche de *Vibrio* AND4 était surtout visible et significative **en phase stationnaire de croissance et non en phase exponentielle.** Seule une autre souche, *Pelagibacter ubique*, a démontré une meilleure survie à la lumière lors d'une carence de nutriments (Steindler et al., 2011). Deux souches aux stratégies de vie opposées (copiotrophe pour *Vibrio* AND4 et oligotrophe pour *Pelagibacter ubique*) utilisent cependant la protéorhodopsine pour augmenter leur capacité de survie en conditions extrêmes. Ces auteurs ont également suspecté que la limitation en nutriment jouerait un rôle plus important que la lumière dans la régulation de l'expression du gène.

D'après l'étude d'Akram et al., (2013), ces différentes stratégies d'utilisation de la protéorhodopsine seraient corrélées aux différentes caractéristiques génomiques des souches bactériennes (génomes contenant un nombre variable de gènes fonctionnels comme ceux impliqués dans la fixation du CO_2 ou encore génomes de taille variable). Ainsi, à la synthèse de nos connaissances actuelles sur cette voie de photohétérotrophie, il reste de nombreuses choses à explorer et à interpréter pour comprendre parfaitement le rôle et la finalité de la phototrophie via la protéorhodopsine dans les océans.

3.3 Comparaison des gains énergétiques par la photohétérotrophie

Par rapport aux autres populations bactériennes, les bactéries mixotrophes et particulièrement les bactéries photohétérotrophes devraient tirer un avantage énergétique de leur capacité métabolique. Le but *in fine* est de gagner de l'énergie par la lumière pour assurer une part du métabolisme cellulaire. Il a été rendu compte que les différentes voies de photohétérotrophie n'étaient pas toutes égales face au gain et au coût énergétique qu'engendrent les photosystèmes. En effet, la complexité des deux grands types de photosystèmes des bactéries photohétérotrophes (Figure 10) ne peut qu'engendrer des différences de coûts énergétiques pour leur bon fonctionnement. Bien que l'hypothèse d'une meilleure efficacité chez les bactéries phototrophes aérobies par rapport aux bactéries contenant la protéorhodopsine ait déjà été posée, la quantité exacte d'énergie gagnée par ces voies restait mal connue et peu explorée jusqu'à l'étude de (Kirchman and Hanson, 2013). D'après cette étude, bien que le coût énergétique soit estimé 10 fois plus important pour les bactéries phototrophes aérobie (8,29.10⁻¹⁸ KJ contre 8,20.10⁻¹⁹ pour les bactéries contenant la protéorhodopsine), la phototrophie fournirait 30 fois plus d'énergie nette aux bactéries phototrophes aérobies qu'aux bactéries contenant la protéorhodopsine.



Figure 10 : Différence des photosystèmes récoltant la lumière chez les bactéries contenant la protéorhodopsine (A) et les bactéries phototrophes aérobies anoxygéniques (B) (Kirchman and Hanson, 2013). BChla = Bactériochlorophylle a ; car = caroténoïde

Les bactéries à protéorhodopsine ont besoin d'un grand nombre de molécules de protéorhodopsine par cellule et d'une forte intensité de lumière (>700µmol de photons.m⁻².s⁻¹) pour que l'énergie apportée dépasse le coût de « maintenance ». Le rôle des PRB dans la

production d'énergie a été très questionné puisque leur cycle de réaction photochimique est similaire à celui des rhodopsines sensorielles soit environ 10 fois plus lent que celui des PRV (Wang et al., 2003), mais il reste impliqué dans la génération d'énergie (Sabehi et al., 2004). Kirchman and Hanson, (2013) concluent en précisant que le gène de la PR est ubiquiste et abondant, probablement parce que seulement peu de gènes sont nécessaires pour cette forme de phototrophie. Cependant les bactéries contenant la protéorhodopsine fournissent bien de l'énergie grâce à la lumière mais, a priori, trop faiblement pour qu'elle soit traduite de manière visible en termes d'abondance cellulaire, ou simplement parce qu'elle n'est pas convertie en biomasse (Riedel et al., 2013). Le peu d'énergie apportée par la phototrophie via la protéorhodopsine pour le métabolisme cellulaire dans les océans est donc souvent rapporté. Toutefois, des recherches plus appliquées s'intéressent malgré tout au potentiel photohétérotrophe de ces souches et les recherches menées restent particulièrement importante pour la compréhension de ces processus. L'introduction de ces pompes à protons dépendant de la lumière comme la protéorhodopsine dans des organismes spécialisés pourrait fournir une voie relativement simple pour augmenter l'efficacité de conversion de l'énergie solaire en carburant (Walter et al., 2010). Il a également été montré que la production d'H₂ était améliorée par la co-expression de la protéorhodopsine et de la [NiFe]-hydrogénase chez un recombinant d'E. coli par une voie dépendante de l'intensité lumineuse. Ces résultats démontrent qu'E. coli pourrait être utilisée comme cellule productrice de biohydrogène (alternative prometteuse aux combustibles) par l'introduction de la protéorhodopsine (Kim et al., 2012).

Pour étudier la physiologie et le fonctionnement de ces PCPs, le passage par les techniques de culture en laboratoire est essentiel et incontournable. Il est en effet important de pouvoir étudier le comportement d'une souche spécifique en conditions contrôlées afin de mieux comprendre ces processus et leur régulation, puis de valider les hypothèses issues de ces études au sein de communautés plus complexes. Deux grandes techniques de culture sont aujourd'hui connues et utilisées, **les culture en batch** (système fermé) permettant des expériences testant la réponse d'une population dans un contexte expérimental souvent simple et cela sur des périodes courtes, et **les cultures continues** (système ouvert) pour des expériences plus longues et complexes sur des cellules dont le taux de croissance et les paramètres de culture sont parfaitement contrôlés.

4. La culture continue

4.1 Principe du chémostat

La culture continue est une technique de microbiologie classique dont le principe a été décrit et mis au point il y a plus de soixante ans par Monod, (1950) et Novick and Szilard, (1950) pour cultiver en système ouvert une population bactérienne. Le principe repose sur l'obtention d'un état d'équilibre (Figure 11A) permettant de stabiliser durant une longue période une population bactérienne issue d'une souche pure ou d'une communauté entière par rapport à une culture en batch (système fermé) dans laquelle la population bactérienne décline une fois que les nutriments sont consommés (Figure 11B). Ce dispositif permet, à l'aide d'un système de flux, d'apporter d'une part un milieu de culture connu et de manière stable, constante, parfaitement contrôlée et reproductible et, d'autre part, d'évacuer le milieu usagé, les bactéries et les débris cellulaires. Il est utilisé pour la production de biomasse, l'extraction et la dégradation de certains polluants dans un milieu liquide, la production de substances organiques résultant de l'activité métabolique ou l'étude de procédés physiologiques et métaboliques de micro-organismes dans un milieu spécifique. Il est alors possible, d'après les variations de l'élément nutritif limitant, de quantifier l'influence de ce dernier sur la population cultivée. En d'autres termes, le chémostat est un système contrôlé dans lequel il est possible de quantifier précisément la réponse d'un organisme dans un contexte expérimental reproductible.

Pour atteindre l'état d'équilibre ou de quasi-équilibre, il est nécessaire de renouveler au moins entre 4 et 10 fois le volume du chémostat pour laisser un assez grand nombre de générations se développer. En effet, il y a peu de chance d'atteindre cet état en début d'expérience :

- si le taux de croissance μ est inférieur au taux de dilution D, la concentration cellulaire va doucement diminuer et entraîner le lavage du chémostat ;

- si le taux de croissance μ est supérieur au taux de dilution D, la concentration cellulaire va augmenter ;

 \dot{A} l'équilibre, le taux de croissance μ est égal au taux de dilution D.



Figure 11 : *Représentation schématique des phases de la croissance bactérienne en culture continue (A) et en culture en batch (B), adaptée de Pearson Education (2004).*

4.2 Avantage par rapport aux cultures en batch

Pour obtenir des informations physiologiques ou fonctionnelles significatives et reproductibles, une population cellulaire doit idéalement croître dans des conditions définies, constantes et des paramètres physico-chimiques parfaitement contrôlés. Répondre à une telle question par de simples cultures en système fermé (culture en batch) s'avère délicat et difficilement interprétable car la population bactérienne consomme rapidement les nutriments avant d'entrer en phase de déclin (Figure 11B). Ce type d'approche fut assez critiqué à ses débuts par un manque d'approches rigoureuses et de compréhension théorique. Par ailleurs, les premiers chémostats étaient parfois difficilement utilisés car souvent difficiles à maintenir en conditions stériles durant de longues périodes. Les risques de mutation au sein de la population étudiée (Warner *et al.*, 1954a et 1954b) ont aussi été évoqués mais il a rapidement été montré que ces hypothèses n'étaient pas fondées (Herbert et al., 1956). L'avantage principal des systèmes en culture continue est qu'ils permettent de travailler dans un milieu environnemental constant et contrôlé.

Utiliser ce type d'outil incontournable en microbiologie permet d'éviter les effets du stress et d'une croissance hétérogène pouvant masquer les variations physiologiques. Par exemple, dans leur étude sur l'analyse du protéome de *Saccharomyces cerevisiae*, Kolkman et

al., (2005) affirment que les effets collatéraux comme les variations continuelles du taux spécifique de croissance, la répression des catabolites carbone et l'accumulation de substrats toxiques observés en culture en batch disparaissaient lors des expériences en culture continue. Les résultats obtenus en chémostat permettaient des réponses biologiques beaucoup plus spécifiques non biaisées par des modifications non spécifiques du milieu réactionnel. Les résultats avancés par Futcher et al., (1999) concernant la surexpression de protéines *heat-shock* d'une levure croissant en batch ont finalement été critiqués et associés à une anomalie du système de culture (Hoskisson, 2005). Des résultats controversés entre les deux techniques ont également fait l'objet d'une étude sur la croissance des bactéries marines (Goldman and Dennett, 2000). En effet, ces auteurs ont relaté que les variations de ratio C:N du substrat testé impactaient différemment les C:N bactériens de la communauté microbienne marine lorsqu'elle était cultivée en batch ou en chémostat.

Un autre avantage non négligeable de la culture continue est la forte reproductibilité des expériences. Par exemple, une comparaison de la reproductibilité d'expériences entre laboratoires a été réalisée et il a été montré que les chémostats offraient un contrôle des conditions de culture plus rigoureux que celui obtenu en batch (Piper et al., 2002). La robustesse de cette technique de culture est également soulignée lors de la réponse du transcriptome de *Saccharomyces cerevisiae* aux changements de source de carbone, robustesse qui n'avait pu être remarquée lors d'une même étude à partir de cultures ayant crû en batch (Daran-Lapujade et al., 2004). De plus, dans l'ère post-génomique, le chémostat reste un dispositif d'actualité par sa sensibilité et son pouvoir sélectif entre espèces, permettant de distinguer deux mutants fonctionnellement proches (Hoskisson, 2005).

5. Objectifs de la thèse

Les travaux précédemment cités ont apporté des informations importantes dans la compréhension de la dynamique et de la composition des populations bactériennes à protéorhodopsine. Toutefois de nombreuses questions subsistent, notamment en ce qui concerne les effets de la lumière sur le métabolisme du carbone des bactéries marines contenant la protéorhodopsine. Ce travail de thèse vise à étudier l'avantage que ce type de métabolisme apporte aux micro-organismes à protéorhodopsine par rapport à ceux n'ayant pas cette protéine. Pour répondre à cette question, il a fallu mesurer l'efficacité d'utilisation

du carbone organique disponible lorsque la souche bactérienne étudiée était exposée à la lumière et comparer cette efficacité en phase d'obscurité. Pour comprendre pourquoi certaines études réalisées sur cette thématique ne trouvaient aucun avantage chez les souches possédant ce gène, plusieurs conditions ont été testées (différents ratio C:N:P, différents milieux de culture et différentes sources d'azote) en utilisant la technique de la culture continue. Des analyses d'abondance bactérienne (cytométrie en flux), des mesures de l'expression du gène codant pour la protéorhodopsine (PCR quantitative), des analyses de carbone particulaire et d'azote particulaire (POC et PON) ont été réalisées sur une population de *Photobacterium angustum* S14 en état d'équilibre tout au long des cycles en chémostat et dans diverses conditions d'exposition lumineuse. En utilisant la culture continue, les taux de croissance sont faibles et contrôlés, permettant à la souche bactérienne d'utiliser cette source d'énergie supplémentaire lorsqu'elle est capable de le faire.

La théorie énonce qu'en l'absence de lumière, les bactéries hétérotrophes utilisent le carbone organique disponible comme source de carbone et d'énergie. Elles peuvent ainsi produire de la biomasse et d'autre part de l'énergie sous forme d'ATP. La respiration est un procédé biologique durant lequel les substrats organiques sont oxydés pour libérer de l'énergie. Cela entraîne un flux d'électrons le long des systèmes de transports associés à la membrane à partir d'un donneur jusqu'à un accepteur d'électrons. Pour la respiration aérobie des bactéries, l'accepteur final d'électrons est une molécule d'oxygène. Donc ce phénomène leur permettra également de produire de l'ATP mais engendrera aussi, par l'oxydation, la formation de CO₂ et donc le relargage d'une grande quantité de ce gaz à effet de serre. Le CO₂ libéré entrera dans les échanges de carbone avec l'atmosphère (Figure 12). En présence de lumière, l'hypothèse voudrait que les bactéries photohétérotrophes soient capables d'utiliser la lumière comme source d'énergie supplémentaire via la protéorhodopsine. Ainsi le carbone disponible pourrait être utilisé de manière plus efficace puisqu'une partie de l'ATP nécessaire serait produite par l'énergie lumineuse. Pour les mêmes raisons, les processus de respiration seraient également diminués et donc une plus faible quantité de CO₂ serait dégagée (Figure 12). C'est cette hypothèse générale que ce projet de thèse a permis de tester.

Travailler avec une souche pure d'une espèce à protéorhodopsine nous a semblé être le contexte le plus adapté pour étudier ce métabolisme, éliminant ainsi toutes les interactions complexes entre espèces au sein d'une communauté. La souche *Photobacterium angustum* S14 a été choisie en fonction de plusieurs critères :

(1) elle a un taux de croissance maximal très élevé et des conditions optimales de croissance faciles à mettre en œuvre (*cf.* Chapitre III) ;

(2) cette souche est bien connue puisque son génome est entièrement séquencé
(5,1 Méga paires de bases avec 4 558 gènes et un contenu en GC de 39,6 %) (Cavicchioli & Kjelleberg, 2006) ;

(3) cette souche était disponible dans la souchothèque du laboratoire. *Photobacterium angustum* S14 est une *Gammaprotéobactérie* marine copiotrophe appartenant à la famille des Vibrionaceae. Elle est adaptée à une croissance rapide dans des environnements riches et est connue pour sa forte résistance aux UVB (Matallana-Surget et al., 2009) et sa grande capacité à résister dans des conditions de stress telle la carence en nutriments (Marouga and Kjelleberg, 1996; Ostling et al., 1996, 1995; Srinivasan et al., 1998). Les membres du genre *Vibrio* sont parmi les plus étudiés de la zone photique à cause de leur distribution globale, leur facilité à être isolés, leur abondance, leur traçabilité génétique et leur métabolisme hétérotrophe versatile (Thompson et al., 2004). L'ensemble de ces critères répondait parfaitement aux objectifs fixés.

Au cours de cette thèse, plusieurs questions scientifiques d'ordre méthodologique et écologiques ont pu être abordées :

- sur un plan plus technique, comment utiliser au mieux le dispositif de culture, comprendre la théorie sur les modèles régissant les dynamiques des chémostats (Chapitre II);
- sur un plan physiologique, quelles sont les conditions optimales de croissance de *Photobacterium angustum* S14 et quel est l'effet de la lumière sur l'efficacité d'utilisation du carbone dans des conditions non optimales (co-limitation et source d'azote difficilement assimilable) (Chapitre III);
- sur un plan écologique, quels sont les effets de la lumière sur l'efficacité d'utilisation du carbone y compris en condition de stress (Chapitre IV);

- Sur le plan génomique, possédons nous des souches candidates pour élargir les connaissances à des groupes bactériens écologiquement significatifs (description de nouveaux génomes et test de la croissance de ces souches) (**Chapitre V**) ;
- le manuscrit se termine par une discussion générale et des perspectives pour mieux comprendre le métabolisme des photohétérotrophes dans les océans (**Chapitre VI**).



Figure 12: Schéma représentant l'hypothèse écologique avantageuse de la photohétérotrophie (à droite) par rapport à l'hétérotrophie (à gauche).

CHAPITRE II

Les chémostats, théorie et outils utilisés

CHAPITRE II : LES CHÉMOSTATS, THÉORIE ET OUTILS UTILISÉS

1. La théorie des chémostats

Classiquement, le modèle de Monod (Monod, 1950) dirige la théorie des chémostats et s'applique comme suit dans le contexte d'une souche unique et d'un seul substrat limitant, avec une efficacité de croissance notée Y:

Le taux de renouvellement du milieu, encore appelé taux de dilution D est donné par la relation :

$$D = \frac{Q}{V}$$

Où :

- Q est le débit volumique de milieu de culture qui s'écoule dans et hors du chémostat

- V est le volume réactionnel du chémostat.

Les dynamiques de biomasse et de concentration en substrat sont décrites comme suit :

$$\frac{\mathrm{dS}}{\mathrm{dt}} = -\frac{\mu(S)X}{Y} + \frac{Q}{V} (S_{\mathrm{in}} - S)$$

La concentration en substrat S est déterminée par l'utilisation bactérienne $-\mu(S)$ X avec le rendement de conversion Y, la quantité de substrat fournie par le milieu de culture frais $\frac{Q}{V} S_{in}$ et la perte de substrat par le flux de sortie $-\frac{Q}{V} (S)$.

Et

$$\frac{dX}{dt} = \mu(S)X - \frac{Q}{V}X$$

La biomasse X dépend de la croissance bactérienne $\mu(S)$ X et de la perte de biomasse due au flux sortant $-\frac{Q}{V}(X)$.

Où :

- S est la concentration en substrat limitant dans le chémostat en mol.l⁻¹
- S_{in} est l'apport en concentration de substrat en mol.1⁻¹
- μ(S) est le taux de croissance de la souche bactérienne fonction de la concentration en substrat en h⁻¹
- X est la biomasse en mol.l⁻¹
- Q est le flux en $l.h^{-1}$
- V est le volume de la culture en l.

Lorsque que l'état stationnaire est atteint (Figure 13), la biomasse et la concentration en substrat sont stables et les équations ci-dessus sont nulles, on obtient le système:

$$\begin{cases} \mathbf{0} = -\frac{\mu(\mathbf{S}) \mathbf{X}}{\mathbf{Y}} + \frac{\mathbf{Q}}{\mathbf{V}} (\mathbf{S}_{in} - \mathbf{S}) \\ \mathbf{0} = \mu(\mathbf{S}) \mathbf{X} - \frac{\mathbf{Q}}{\mathbf{V}} \mathbf{X} \end{cases}$$

On peut alors écrire comme suit l'équilibre dans le chémostat :

$$\begin{cases} \mathbf{X}_{\mathbf{e}} = \mathbf{Y}(\mathbf{S}_{in} - \mathbf{S}_{e}) \\ \mu(\mathbf{S}_{e}) = \frac{\mathbf{Q}}{\mathbf{V}} \end{cases}$$

Où :

- X_e et S_e représentent la biomasse et la concentration de substrat dans la culture à l'équilibre
- μ (S_e) est le taux de croissance à l'équilibre

Le modèle de Monod admet donc (i) que la concentration de substrat à l'équilibre Se est directement contrôlée par le flux pour un $\mu(S)$ donné, (ii) que le taux de croissance est égal au taux de dilution (Figure 13) et, (iii) que la biomasse X_e est déterminée par S_{in} et S_e , eux même dépendant du flux. La quantité de substrat résiduel varie selon l'affinité de la souche pour le substrat. Pour une affinité très forte (Figure 13B), il approche de zéro et devient négligeable, on a alors une biomasse à l'équilibre déterminée principalement par S_{in} .



Figure 13 : *Taux de croissance en fonction de la concentration en substrat selon le modèle de Monod pour une souche à faible (A) et haute (B) affinité pour le substrat limitant.*

Le modèle de Monod suppose également que la fonction de croissance spécifique $\mu(.)$ est une fonction croissante de le concentration en substrat S, selon la loi dite de Monod :

$$\mu(S) = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S}.$$

Où :

- μ_{max} est le taux de croissance maximal ;
- Ks est la constante d'affinité de la souche étudiée pour le substrat.

Ainsi, la concentration en substrat à l'équilibre S_e croît avec le débit Q imposé. Par conséquent, le modèle de Monod présente la propriété suivante :

La valeur à l'équilibre de la concentration en biomasse X_e décroît avec le débit Q.

Or il s'avère que cette propriété n'a pas été observée sur les données expérimentales obtenues durant cette thèse. C'est pourquoi on s'est intéressé à d'autres modèles de la littérature, extensions du modèle de Monod.

Le modèle de Monod est un modèle très simple dans lequel la croissance cellulaire ne dépend que du taux d'assimilation du substrat. Cependant, les cellules peuvent connaître différents états physiologiques selon leur stade de croissance et la croissance est davantage déterminée par les voies métaboliques intrinsèques que par les facteurs extérieurs (Postgate & Calcott, 1990). D'autres paramètres tels que les oscillations dans la densité numérique des cellules pendant la croissance (Lemesle and Gouzé, 2007), l'efficacité de croissance variable (Arino et al., 2003). la croissance densité dépendante ou ratio dépendant (Arditi and Saïah, 1992; Lobry et al., 2006; Ruan et al., 2007) régie par exemple par le modèle de Contois (Contois, 1959) (cf. annexe A), la maintenance énergétique (Pirt, 1982, 1965), l'inhibition de la croissance (Grivet, 2001; Wolkowicz and Lu, 1992; Xiu et al., 1998) régie notamment par le modèle d'Haldane (Andrews, 1968) (cf. annexe B), la compétition (Freedman and Yuantong, 1993; Hardin, 1960; Pavlou, 2006; Ruan et al., 2003) et la notion de « proieprédateur » (pour les paires bactérie-virus) régie par le modèle de Lokta Volterra (Lotka, 1978; Volterra, 1928) ont donc été inclus aux équations du système afin de palier à la simplicité de ce premier modèle n'expliquant pas toujours les interactions et les observations obtenues en chémostat. L'énumération de ces modèles et de ces paramètres est non exhaustive et ne seront pas plus développés ici mais il est primordial de les aborder et de les envisager lors de la mise en place d'expériences en chémostat et avant l'interprétation des résultats obtenus. Toutes ces extensions concernent pour la plupart la modélisation des régimes hors équilibre. Parmi ces modèles, le modèle de Pirt propose une explication simple et adaptée au contexte d'une biomasse à l'équilibre qui n'est pas nécessairement décroissante en fonction du débit imposé, invalidant ainsi le modèle classique de Monod.

Lors de ce projet de thèse et aux vues des observations réalisées au fil des cycles en chémostats, l'application de ce modèle semblait plus appropriée et a été explorée. Le paramètre de **maintenance énergétique** appliqué dans le **modèle de Pirt** a permis de mieux comprendre les résultats.

Lorsqu'un substrat est la source de carbone et d'énergie pour un microorganisme, il est difficile d'estimer la part de carbone assimilée et celle dissimulée pour fournir de l'énergie. Une des manière de le faire est décrite comme suit :

$$\Delta_{\boldsymbol{S}} = \Delta \boldsymbol{S}_{\boldsymbol{C}} + \Delta \boldsymbol{S}_{\boldsymbol{E}}$$

Où :

- Δ_s est le substrat total utilisé
- ΔS_C est la part de substrat utilisée pour fournir du carbone à la cellule
- ΔS_E est la part de substrat utilisée pour fournir de l'énergie

Si on divise cette balance de substrat par la quantité de biomasse produite Δ_x on obtient :

$$\frac{\Delta_{\mathbf{S}}}{\Delta_{\mathbf{x}}} = \frac{\Delta \mathbf{S}_{\mathbf{C}}}{\Delta_{\mathbf{x}}} + \frac{\Delta \mathbf{S}_{\mathbf{E}}}{\Delta_{\mathbf{x}}}$$

Qui peut aussi être écrit comme ceci:

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{Y_{C}} + \frac{1}{Y_{E}}$$

Où :

- Y, Y_C et Y_E sont le rendement, le rendement de carbone et le rendement d'énergie respectivement.

Il est depuis longtemps bien établi que les microorganismes nécessitent de l'énergie pour la croissance d'une part, et pour la maintenance cellulaire d'autre part. La maintenance cellulaire comprend entre autre le renouvellement du matériel cellulaire, le travail osmotique et la mobilité cellulaire. Le **modèle de Pirt** (1965) met en relation les besoins en maintenance, le rendement de croissance et le taux de croissance. Le modèle énonce que l'énergie totale consommée est supposée contribuer à la croissance et à la maintenance et que la perte d'ATP peut être distinguée de l'énergie de maintenance. Cette relation est décrite comme suit :

$$\mathbf{Y}_{\mathrm{ET}} = \Delta_{\mathrm{x}} / \Delta \mathbf{S}_{\mathrm{E}} = \Delta_{\mathrm{x}} / \left(\Delta \mathbf{S}_{\mathrm{G}} + \Delta \mathbf{S}_{\mathrm{M}} \right)$$

Où :

- Y_{ET} est le rendement total énergétique,
- ΔS_E est la source d'énergie totale consommée,
- ΔS_G est la ration d'énergie pour la croissance,

- ΔS_M est la ration d'énergie pour la maintenance.

Quand l'énergie de maintenance est nulle, on a $\Delta S_M = 0$ et on obtient le vrai rendement de croissance Y_{EG} qui représente la valeur maximale possible du rendement de croissance à partir de la source d'énergie :

$$\mathbf{Y}_{\mathbf{EG}} = \Delta_{\mathbf{x}} / \Delta \mathbf{S}_{\mathbf{G}}$$
$$\frac{1}{Y_{ET}} = \frac{1}{Y_{EG}} + \frac{\Delta S_{\mathbf{M}}}{\Delta_{\mathbf{x}}}$$

D'où :

Le modèle de Pirt dicte donc que si le taux de croissance cellulaire augmente, la proportion d'énergie dédiée à la maintenance diminue. La balance pour l'utilisation de la source d'énergie est décrite comme suit:

Taux total de consommation =

Taux de consommation pour la croissance

+

Taux de consommation pour la maintenance

Il est supposé que pour une quantité de biomasse donnée \mathbf{x} , la source d'énergie est consommée à un taux constant pour la maintenance donné par :

$$\Delta S_{M} = \mathbf{m} \mathbf{x}$$

Si:

- $\Delta_{\mathbf{x}} = \mu \mathbf{x}$
- m est une constante appelée coefficient de maintenance.

On a donc :

$$\frac{\mu \mathbf{x}}{\mathbf{Y}_{\text{ET}}} = \frac{\mu \mathbf{x}}{\mathbf{Y}_{\text{EG}}} + \mathbf{m} \mathbf{x}$$

 $O\dot{u}$: μ est le taux spécifique de croissance.

Et finalement :

$$\frac{1}{Y_{ET}} = \frac{1}{Y_{EG}} + \frac{m}{\mu}$$

A partir de cette dernière équation, la droite mettant en relation 1/Y et 1/ μ peut être tracée (Figure 14A). En considérant que m est une constante, la pente de la droite de régression donne la valeur de m et l'intersection avec l'axe des ordonnées donne la valeur de 1/ Y_{EG} et donc la valeur du « vrai rendement » quand m=0. Alternativement, la droite mettant en relation directement μ et le quotient métabolique pour la source d'énergie q_E peut être tracée en suivant cette équation :

$$\mathbf{q}_{\mathbf{E}} = \frac{\mu}{\mathbf{Y}_{\mathbf{E}\mathbf{G}}} + \mathbf{m}$$

Ainsi, la pente de la droite donne $\frac{1}{Y_{EG}}$ et donc par extension le « vrai rendement » et l'intersection avec l'axe des ordonnées révèle la valeur de m (Figure 14B).



Figure 14 : *Méthode graphique pour calculer la maintenance énergétique et le « vrai rendement » (Pirt, 1975).*

Ces deux méthodes d'estimation du paramètre m sont théoriquement équivalentes, mais d'un point de vue pratique, elles peuvent différer par leur sensibilité par rapport aux imprécisions ou bruits de mesures (puisque le passage d'une formule à l'autre s'effectue par une transformation non linéaire).

Notons que la considération d'un terme de maintenance m dans le modèle initial de Monod revient à corriger ce modèle de la façon suivante :

$$\begin{cases} \mathbf{0} = -\frac{\mu(\mathbf{S}) \mathbf{X}}{\mathbf{Y}} + \frac{\mathbf{Q}}{\mathbf{V}} (\mathbf{S}_{in} - \mathbf{S}) \\ \mathbf{0} = \mu(\mathbf{S}) \mathbf{X} - \frac{\mathbf{Q}}{\mathbf{V}} \mathbf{X} \end{cases}$$

Ainsi, les équilibres de ce système sont toujours caractérisés par l'équation :

$$\mu\left(\mathbf{S}_{\mathbf{e}}\right) = \frac{\mathbf{Q}}{\mathbf{V}}$$

Mais pour la détermination de X_e on obtient :

$$X_{e} = \frac{Y_{EG}(S_{in} - S_{e})}{1 + m \frac{Y_{EG}}{\mu(S_{e})}}$$

Par conséquent, X_e n'est pas nécessairement une fonction décroissante de S_e , contrairement au modèle de Monod (Figure 15). En effet, pour S_e petit on peut écrire :

$$X_{e} \sim rac{Y_{EG}S_{in}}{1+mrac{Y_{EG}}{\mu(S_{e})}}$$

Expression croissante en S_e , alors que si S_e est grand, on a :

$$X_e \sim Y_{EG}(S_{in} - S_e)$$

Comme dans le modèle de Monod (i.e. \boldsymbol{X}_e décroissant en fonction de $\boldsymbol{S}_e).$


Figure 15: Concentration de biomasse à l'état stationnaire en fonction du taux de dilution quand il y a un besoin en maintenance pour une croissance limitée par le substrat avec μ_m (taux de croissance maximal spécifique) = 1 h⁻¹; Ks = 0,005 g.l⁻¹; s_r (concentration en substrat dans le milieu frais) = 1 g.l⁻¹; Y_{EG} = 0,5 g biomasse (g de substrat ⁻¹) et m = 0,08 (g.biomasse.h)⁻¹ (Pirt, 1975).

La relation linéaire entre q_E et μ a été confirmée par Hempfling and Mainzer, (1975) et Stouthamer (1977). Mais le modèle est toutefois questionné surtout lorsque les conditions de croissance offrent suffisamment d'énergie à la culture microbienne étudiée (Neijssel and Tempest, 1976). De plus, (Tempest, 1978) suggère que la pente de la droite de régression de q_E en fonction de μ n'a pas d'homologue physiologique dans des environnements naturels. Du coup, Pirt propose une légère modification de son modèle en ajoutant un nouvel élément (Pirt, 1982) permettant des analyses en condition de limitation d'énergie et de condition énergétique suffisante. En plus du coefficient de maintenance énergétique précèdent m, il ajoute le terme de maintenance énergétique dépendante du taux de croissance m'. L'hypothèse est que le terme de maintenance énergétique inclut une portion qui diminue quand le taux de croissance spécifique μ augmente. Ainsi, les besoins énergétiques sont donnés par l'équation suivante :

$$q=\frac{\mu}{Y_{EG}}+m+m'(1-k\mu)$$

Où :

- q est le taux spécifique d'utilisation du substrat,
- m'(1 kμ) est le taux de croissance dépendant de la maintenance énergétique et m' est sa valeur quand μ=0,
- m est la maintenance énergétique constante (modèle non modifié).

Il est également supposé que la maintenance énergétique chute jusqu'à 0 quand le taux de croissance spécifique μ est égal au taux de croissance maximal observé μ'_m et donc que k = $\frac{1}{\mu'_m}$, ce qui permet d'après l'équation précédente d'obtenir :

$$\mathbf{q} = \left(\frac{\mathbf{1}}{\mathbf{Y}_{\mathsf{G}}} - \frac{\mathbf{m}'}{{\boldsymbol{\mu}'}_{\mathbf{m}}}\right)\boldsymbol{\mu} + \mathbf{m} + \mathbf{m}'$$

Ayant connaissance de ces divers paramètres, l'analyse de données en chémostats devient plus facile et apporte des aperçus nouveaux encore jamais explorés en écologie microbienne comme évaluer quantitativement le stress apporté à une culture bactérienne.

2. Les photobioréacteurs utilisés

L'ensemble des plans d'expériences a été structuré autour de 2 photobioréacteurs (Figure 17A) disponibles au sein de la plateforme BIO2MAR. L'appareil est constitué de trois réservoirs reliés entre eux. Le premier contient des nutriments supposés être en abondance excepté un parmi eux (le carbone durant cette thèse), nommé substrat limitant à densité S. Un débit Q_{in} (provenant du premier réservoir) alimente le chémostat (deuxième réservoir) dans lequel interagissent et se mélangent la (ou les) biomasse(s) X (d'une ou de différentes espèces de microorganismes à densité Xi) avec les nutriments. De plus, le substrat limitant doit possèder une concentration d'alimentation constante $S_{in} > 0$. Le deuxième réservoir (chambre interne) est parfaitement mélangé ; afin de garantir un milieu homogène et par conséquent aucune variation spatiale dans la concentration du substrat limitant et la distribution des cellules. Par ailleurs, l'hypothèse d'homogénéité assure que les organismes et le substrat sont évacués du chémostat par action du flot au même taux D. Le troisième réservoir reçoit les déchets du chémostat avec un débit Q_{out} (Figure 16). Un équilibre au sein de la chambre

interne est obtenu puisque le nombre de cellules formées par la croissance de la culture est directement contrebalancé par le nombre de cellules éliminées.



Figure 16 : *Représentation schématique des trois réservoirs constituant le dispositif matériel utilisé pour la culture continue au cours de la thèse.*

Ces photobioréacteurs (Labfors Lux 3 Infors) sont semi automatisés et permettent le contrôle et le suivi de nombreux paramètres indispensable au bon déroulement d'une culture continue (pH, température, agitation, aération, pression partielle en oxygène (pO₂)) à l'aide d'un logiciel permettant le suivi de l'ensemble des paramètres sous forme de graphiques et de tableaux numériques (IRIS Version 5).

En effet, l'homogénéisation de la culture est importante pour que les diverses réactions se déroulant au sein du photobioréacteur aient lieu. Des systèmes d'agitation et d'aération du milieu sont à mettre en place pour favoriser le mélange. Ici, un agitateur central possédant deux hélices permet une agitation continue dont le rpm (rotation par minute) peut être choisi et modifié à tout moment de l'expérience. L'aération est contrôlée à l'aide d'une pompe à air comprimé (KNF Neuberger) stérilisée par passage à travers un filtre 0,2 µm avant l'entrée dans la chambre en verre contenant la culture bactérienne. Le débit d'air entraine un bullage du milieu améliorant l'homogénéisation. Il est réglé pour saturer le milieu en oxygène et

éviter une limitation supplémentaire de la culture. Une sonde (Mettler Toledo) mesurant en continu la pression partielle en oxygène à l'intérieur de la chambre en verre et reliée à un ordinateur permet de le contrôler. Cependant, ces systèmes peuvent aussi fragiliser le matériel biologique. L'ensemble des éléments au sein d'un photobioréacteur doit être mélangé afin de favoriser l'accès à la lumière et les transferts liquide-liquide et gaz-liquide, de limiter les phénomènes de photolimitation et de photoinhibition et d'éviter l'encrassement des parois (biofilm). L'hydrodynamique (turbulence, bulles...) est un facteur potentiellement stressant pour la croissance des cellules. Elle peut perturber voire modifier l'état physiologique cellulaire au-delà d'un certain seuil. Cela peut se traduire par l'excrétion de polysaccharides, par l'altération physique de la cellule pouvant aller jusqu'à sa destruction. Il est à noter également que le bullage peut provoquer des perturbations de l'état physiologique des cellules et de la croissance. Différents facteurs peuvent en être responsables : les forts cisaillements au niveau de l'injecteur de gaz, l'entraînement des cellules par flottation et l'éclatement des bulles à la surface. En conséquence, un compromis hydrodynamique est à rechercher.

La température doit être maintenue constante afin d'optimiser la croissance cellulaire et ne pas modifier le taux de croissance. La chambre en verre contenant une double enveloppe permettant la circulation d'eau à l'aide d'un système de tuyaux reliés à un cryostat assure ce maintien. La stabilité est vérifiée à l'aide d'une sonde et les données sont collectées en temps réel. Le pH est également un élément important et dirigeant la croissance microbienne. Il est possible de maintenir un pH constant et parfaitement défini par un ajout de NaOH ou de HCl totalement contrôlé et automatisé, en indiquant au niveau du logiciel le point de réglage désiré. Ainsi à chaque variation de pH, deux pompes spéciales ajoutent la solution basique ou acide selon les besoins. Les mesures en temps réel sont effectuées grâce à une sonde (Mettler Toledo) plongeant dans la culture.



Figure 17 : Photographie d'un photobioréacteur Labfors Lux 3 (Infors) disponible au laboratoire (A) et de la double enveloppe contenant les néons d'éclairage (B).

La particularité d'un photobioréacteur tient, en plus des besoins habituels et communs à tous les bioréacteurs, à la nécessité de fournir une énergie photonique aux microorganismes à cultiver (ici, les bactéries contenant la protéorhodopsine). Cet apport est incontournable pour la réalisation de la phototrophie. D'un point de vue technologique, l'enceinte du système doit donc être transparente et être conçue de façon à fournir une intensité lumineuse suffisante, mais non létale, pour les microorganismes. L'intensité lumineuse fournit avec ces photobioréacteurs est également contrôlable. Une double enveloppe entourant la chambre en verre contient 16 néons entourant la chambre en verre (Figure 17B). Le choix d'allumer un ou plusieurs néons permet un réglage de l'intensité (Tableau 1). Grâce au logiciel, il est possible également de façon automatique d'allumer ou d'éteindre les néons à intervalles réguliers. La simulation de cycles jour/nuit ou d'expositions par flashes rapides de lumière est donc facilement réalisable.

Nombre de néon	Mesure	Intensité de lumière µE				
1	1,35E+16	224				
2	2,45E+16	407				
3	3,60E+16	598				
4	4,50E+16	747				
5	5,40E+16	896				
6	6,60E+16	1096				
7	7,50E+16	1245				
8	8,50E+16	1411				
9	1,00E+17	1660				
10	1,10E+17	1826				
11	1,25E+17	2075				
12	1,35E+17	2241				
13	1,50E+17	2490				
14	1,55E+17	2573				
15	1,65E+17	2739				
16	1,80E+17	2988				

Tableau 1 : Mesure de l'intensité lumineuse (quanta.cm⁻².s⁻¹) fournit selon le nombre de néons allumés à l'aide d'un luminomètre (Biospherical Instrument Inc. QSL-100 quantum solar irradiance meter). Le coefficient de conversion pour obtenir des μ Einstein (μ mol de photons par mètre² et par seconde) est 1 quanta.cm⁻².s⁻¹ = 1,66.10⁻¹⁴ μ Einstein.

CHAPITRE III

Conditions de croissance et

tests expérimentaux en

culture continue sur

Photobacterium angustum

S14

<u>CHAPITRE III</u>: CONDITIONS DE CROISSANCE ET TESTS EXPERIMENTAUX EN CULTURE CONTINUE SUR *Photobacterium angustum* S14.

Élément de contexte :

Ce chapitre porte sur une phase de développement méthodologique qui s'est révélée essentielle avant d'entreprendre des expériences en conditions contrôlées qui soient reproductibles. Les bioréacteurs ont été mis en place pour la première fois dans le cadre du projet RHOMEO et une mise au point technique a dû être réalisée pendant plusieurs mois pour définir les conditions d'utilisation, mettre en place des protocoles d'utilisation et maitriser les conditions de culture. Dans ce chapitre, nous exposons les différentes expérimentations qui ont permis de définir le taux et le pH de croissance maximal, l'effet de la concentration en carbone sur le taux de croissance et les effets de diverses intensités de lumière sur l'abondance bactérienne et sur l'efficacité d'utilisation du carbone.

1. Matériels et Méthodes

Souche bactérienne.

La souche *P. angustum* S14 (*Vibrio* sp. S14) a été isolée en juin 1981 des eaux de surface (1 mètre de profondeur) sur la Baie Botany, Australie (Humphrey et al., 1983). Son génome a précédemment été séquencé et interprété (Lauro et al., 2009). Il est disponible sous le numéro d'accès GenBank Acc. No. AAOJ00000000.

Conditions de culture.

<u>Culture en batch</u> : dans le but d'obtenir le taux maximal de croissance de *P. angustum* S14 et de choisir le meilleur débit pour les expériences en chémostat, la courbe de croissance a été réalisée en eau de mer artificielle (Berges et al., 2001), à l'obscurité et à 25°C avec une agitation de 110 rotations par minute (rpm) (Infors shaker, Infors HT, Botmingen, Switzerland).

Le pH optimum de croissance à l'obscurité a été déterminé en eau de mer artificielle (Eguchi et al., 1996) avec une gamme allant de 5.5 à 10. Les expériences ont été réalisées en dupliqua pour chaque valeur de pH et en microplaque de 24 puits (Evergreen Scientific, LA) incubées à 25°C avec une agitation de 110 rpm.

Dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le pH, la concentration en carbone (glucose) permettant une croissance optimale a été déterminée. Les expériences ont été faites à l'obscurité et à la lumière (350 µmol photons. m⁻². s⁻¹) avec une gamme allant de 10 à 1000 mg.l⁻¹ en triplicat pour chaque concentration de glucose. Les expériences ont été faites en microplaque de 24 puits (Evergreen Scientific, LA) à 25°C avec une agitation de 110 rpm. Pour chaque expérience, la croissance a été estimée par mesure de la densité optique à 620nm.

Culture continue : la culture continue de P. angustum S14 a été effectuée dans de l'eau de mer artificielle (avec du glucose comme seule source de carbone $(0.540 \text{ g.l}^{-1}, 3 \text{ mM})$ et en utilisant un photobioreacteur Labfors Lux 3 (Infors HT, Botmingen, Switzerland). L'utilisation de ce milieu de culture engendre une co-limitation carbone azote avec un ratio C:N:P de 216:26:1. Les paramètres physiques dans le bioréacteur étaient prédéfinis et contrôlés. La température a été régulée à 25°C et une source d'aération a été continuellement fournie. L'agitation a été réglée à 300 rpm grâce à un agitateur central. Des néons de 14 Watt ont été utilisés comme source de lumière et ont procuré plusieurs intensités (Biospherical Instruments Inc. QSL-100, San Diego, USA, tableau 1) selon les expériences réalisées (Tableau 2). Une exposition continue ou en cycles lumière-obscurité ont été appliqués à la culture (Tableau 2). Le bioréacteur contenait un litre d'eau de mer artificielle (pour un volume maximal d'environ 41 dans la chambre interne du bioréacteur). Avant l'inoculation de la bactérie dans le bioréacteur, une pré-culture a été réalisée dans le même milieu de culture à 25°C et à l'obscurité (Infors shaker, Infors HT, Botmingen, Switzerland). Le photobioréacteur contenant 1 l d'eau de mer artificielle a été inoculé avec 10 ml de la pré-culture en phase stationnaire de croissance. Les pompes d'entrée de milieu frais et de sortie ont été mises en marche quand la biomasse était suffisante (environ 0,500). Le taux de dilution était de 0,1.

Cytométrie en flux.

Le nombre de cellules a été évalué en triplicat par cytométrie en flux avec un cytomètre FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) équipé d'un laser Argon

refroidit par air (488 nm, 15 nM). Les échantillons sont conservés à -80°C après fixation avec une solution de glutaraldéhyde (Grade II, 25 % Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 1 %. Après fixation, ils sont congelés immédiatement dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Avant analyse, ils sont décongelés, dilués 100 fois dans de l'eau de mer artificielle stérile. Les cellules contenues dans 1 ml d'échantillon dilué ont été marquées pendant 15 minutes par du SYBR green I (1:4000 concentration finale), marqueur de l'ADN et de l'ARN (Molecular Probes) puis incubées à température ambiante et à l'obscurité totale (Lebaron et al., 1998).

Microscopie.

Les biovolumes des cellules bactériennes ont été déterminés par un marquage au DAPI (Sigma Aldrich, France). Les échantillons testés ont été dilués 100 fois, marqués 8 minutes à l'obscurité avec une concentration finale de DAPI de 2,5 µg.ml⁻¹ et filtrés sur un filtre noir 0,2 µm de 25mm de diamètre (Nucleopore Track Etch Membrane,Whatman) superposé sur un Absorbant Pads du même diamètre (Millipore). Les échantillons ainsi préparés ont été observés sur un microscope (Olympus AX70, Provis) à l'objectif x100 sous huile à immersion. Un comptage et des mesures manuelles, à partir des micrographies digitales, ont ensuite été réalisés.

Détermination du Carbone Organique Particulaire.

Les échantillons pour les mesures de carbone organique particulaire (POC) ont été prélevés en triplicats à différents moments stratégiques des expériences (en phase de lumière et d'obscurité). Cette analyse permet de déterminer la biomasse bactérienne. Un volume de 5 ml de culture est filtré sur filtre GF/F de 25 mm de diamètre (Whatman, USA), pré-traité à 450°C et conservé dans du papier aluminium. Avant d'ajouter les filtres retenant les bactéries, les tubes en verre ont été rincés à l'eau et stérilisés à 450°C pendant 4 heures. Puis, les tubes en verre contenant les filtres ont été séchés à 60°C pendant au moins 24 heures. Après cela, les tubes ont été traités par fumigation dans de l'acide chloridrique concentré pendant 8 heures et à nouveau séchés à 60°C pendant au moins 8 heures. Les analyses de POC ont été menées à l'aide du Carlo Erba analyzer selon la méthode de Dumas (Jacobs, 2006). Chaque filtre est individuellement plié et emballé dans des disques en métal de 28 mm

de diamètre (Santis) et transformé en petit culots. Chaque échantillon a été mesuré en triplicat. Tous les 18-20 échantillons, un standard de concentration CHN (Carbon Hydrogen Nitrogen en anglais) connue est mesuré. Un filtre blanc sert de témoin et il est traité et analysé de la même manière que les filtres d'échantillons. La valeur obtenue pour les blancs a été soustraite aux valeurs de concentration en carbone obtenues.

Plan d'expériences.

Un ensemble de 5 expériences en chémostats a été réalisé en faisant varier l'intensité de la lumière et le temps d'exposition (tableau 2). Le ratio C:N:P de l'eau de mer artificielle utilisée pour les cycles en chémostat (Berges et al., 2001), était de 216:26:1 contre 54:28:1 pour les tests d'optimum de croissance (Eguchi et al., 1996).

Numéro d'expérience	Intensité de lumière en µE	Type d'exposition	Temps d'exposition en heures	Fer	Abondance bactérienne	POC	Ratio C:N
1	2241	continu	40	oui	+	-	-
2	406-747	continu	100-30	non	+	+	-
3	406	continu	65	non	+	+	+
4	224	continu	65	non	+	+	+
5	406	Cycles12h	9 cycles	non	+	+	+

Tableau 2 : Description des expériences en co-limitation carbone-azote. Les signes +signifient que le paramètre est mesuré et les signes – qu'il ne l'est pas.

2. Résultats

Optimum de croissance en batch.

La courbe de croissance a été réalisée par lecture de la densité optique (OD) à 620 nm. La phase exponentielle de croissance a débuté après 12.5 heures pour atteindre un plateau (la phase stationnaire de croissance) après 20 heures de croissance correspondant à une OD d'environ 0.650 (Figure 18A). La transformation en logarithme népérien (ln) des valeurs d'OD obtenues pendant la phase exponentielle de croissance (Figure 18B) permet l'obtention du taux maximal de croissance μ_{max} donné par la pente de la droite de régression. Dans ces conditions (Glucose à 540 mg.l⁻¹; NaNO₃ comme source d'azote ; ratio C:N:P de 216:26:1 ; à 25°C ; agitation à 110 rpm et à l'obscurité), le μ_{max} de *P. angustum* S14 est de 0,2013 h⁻¹. Cette information a permis de choisir un taux de dilution adéquate pour les cycles en chémostat afin d'assurer un maintien de la population. La valeur a été fixée à 0,1 soit un débit de 100 ml.h⁻¹.



Figure 18 : Courbe de croissance à l'obscurité de P. angustum S14 dans une eau de mer artificielle (Berges et al., 2001), (A) et calcul du taux maximum de croissance (B). L'équation de la droite de régression $y = 0,2013 \times -4,2839$ des LN des valeurs de DO durant la phase exponentielle de croissance permet de déterminer le μ_{max} .

Le pH optimum de croissance a été évalué à l'aide d'un milieu de culture plus adapté pour la souche bactérienne. La source d'azote était de l'ammonium et le ratio C:N:P de 58:26:1. Pour le déterminer deux paramètres ont été estimés : la OD_{620nm} maximale (Figure 19A) et le μ_{max} le plus élevé (Figure 19B). Les courbes de croissances (données non montrées) ont été réalisées à des pH variant entre 5.5 et 10. Certaines données incohérentes ont été éliminées (pH 7 et 8,5 pour la OD_{620nm} maximale et pH 7 ; 7,5 et 8,5 pour le μ_{max}). Pour les deux paramètres, les valeurs les plus élevées ont été obtenues pour une valeur de pH



de 8-9 (Figure 19 A et B). Le pH optimum de croissance de *P. angustum* S14 dans ces conditions a donc été estimé à 8.

Figure 19 : Détermination du pH optimum de croissance de P. angustum S14 selon la densité optique (A) et le taux de croissance maximal (B).

Les taux de croissance les plus élevés avec ce même milieu de culture et à différentes concentrations de glucose ont été déterminés à la lumière et à l'obscurité. A faible concentration de glucose (30 et 50 mg.l⁻¹), les μ_{max} obtenus à la lumière ont été plus importants que ceux obtenus à l'obscurité. Mais à partir de 100 mg.l⁻¹ de glucose, cette différence s'est estompée voire même s'est inversée pour la très forte concentration testée

(1000 mg.l⁻¹) (Figure 20). La lumière, à l'intensité testée, a révélé un effet positif en améliorant le taux de croissance maximal de *P. angustum* S14 à faible concentration de carbone, c'est-à-dire lorsque le milieu est pauvre en carbone. Par contre à la concentration de glucose utilisée pour les expériences en chémostat (500 mg.l⁻¹), la lumière n'avait aucun effet sur le taux de croissance de la souche.



Figure 20 : *Taux de croissance maximal de P.angustum S14 selon la concentration en glucose à l'obscurité (rond noir) et à la lumière (rond blanc).*

Expériences en chémostats co-limités azote-carbone.

En lumière continue :

La première expérience en chémostat a été réalisée pendant une période courte de moins de 6 jours. Une phase approchant les 110 heures d'obscurité a été nécessaire pour stabiliser la culture et obtenir un état de quasi équilibre, visible par un nombre de cellules constant et une pO₂ stable (Figure 21). A ce moment, une intensité lumineuse de 2241 μ mol de photons.m⁻².s⁻¹ a été appliquée pendant environ 40 heures (Figure 21). Après 10 heures d'exposition, l'abondance bactérienne a augmenté de 16,8 % et atteint une valeur maximale (1,46.10⁸ cellules par ml) mais la concentration en cellules a ensuite chuté jusqu'au lavage du chémostat, entrainant inévitablement une pO₂ plus importante (Figure 21). Dans ces conditions, la lumière a eu un effet positif sur l'abondance bactérienne à court terme mais sur

une plus longue période, un paramètre a été néfaste au maintien de la population. Deux hypothèses ont pu être émises suite à cette observation : (1) l'effet d'une photo-inhibition après un temps d'exposition prolongé et (2) la présence de virus (le génome de *P. angustum* S14 contenant de nombreux prophages) qui pourraient être activés par la lumière et lyser la population bactérienne. La recherche de virus en microscopie, réalisée sur deux prélèvements (avant lumière et quelques heures après exposition) s'est avérée négative et a permis d'exclure la deuxième hypothèse (données non montrées). L'hypothèse de la photo-inhibition en présence d'une trop forte intensité de lumière s'est révélée être la plus probable.



Figure 21 : Evolution de l'abondance bactérienne (cellules/ml) et de la pO_2 (%) en fonction du temps lors d'une exposition à une forte intensité de lumière (2241 µmol photon.m⁻².s⁻¹) et d'une intensité plus faible (896 µmol photon.m⁻².s⁻¹) après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 110 heures. Les losanges gris représentent les points de cytométrie et la courbe, l'évolution de la pO_2 .

Pour tester cette hypothèse, l'intensité de la lumière a été diminuée (expérience 2 à 4, tableau 2). Une intensité de 406 μ mol photon.m⁻².s⁻¹ a été imposée sur la population de *P. angustum* S14 stabilisée (nombre de cellules par ml et pO₂ constants, Figure 22, 23A et 23B). L'abondance bactérienne a montré la même évolution que précédemment sur un des deux réplicats réalisés (Figure 22) avec une augmentation du nombre de cellules de 20,5 % après 10 heures d'exposition lumineuse suivi d'une brutale diminution alors que dans le deuxième réplicat, l'abondance cellulaire est restée stable à la lumière avant de diminuer (Figure 23A).

La chute de l'abondance cellulaire a pu être maitrisée par une phase d'obscurité mais la seconde phase d'exposition à 747 μ mol photon.m⁻².s⁻¹ a enclenché presque immédiatement la perte de la population (Figure 22). Par contre, une intensité encore plus faible (224 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) n'a pas mis en avant d'augmentation de l'abondance bactérienne mais permet un maintien de la population même après 80 heures d'exposition à la lumière (Figure 24A).



Figure 22 : Evolution de l'abondance bactérienne (cellules/ml), de la pO_2 (%) et du POC (μ gC/ml) en fonction du temps lors d'une exposition à une intensité de lumière moyenne (406 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 60 heures. Après une brève autre phase d'obscurité, une intensité plus forte (747 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) a été appliquée. Les losanges gris représentent les points de cytométrie, les ronds noirs, les mesures de POC et la courbe, l'évolution de la pO_2 .

Les résultats des mesures de POC ont révélé des profils aléatoires et difficilement interprétables. En effet, la concentration de carbone particulaire a augmenté au fil du temps, que ce soit en phase d'obscurité ou de lumière, alors que le nombre de cellules n'est pas plus important (Figure 22). Ces résultats nous ont conduit à formuler deux hypothèses : (1) l'augmentation du POC est due à une augmentation du biovolume cellulaire et (2) les variations de POC sont liées à un problème technique (lors de la préparation des échantillons ou lors des mesures a proprement parlé). Une mesure des biovolumes cellulaires réalisée en

microscopie (données non montrées) montre que les biovolumes sont relativement constants au cours du temps. La première hypothèse n'est donc pas valide et les variations de POC n'ont pas été expliquées. Toutefois, une meilleure efficacité d'utilisation du carbone a pu être envisagée pour le deuxième réplicat (Figure 23A) puisque la concentration en carbone particulaire est plus importante à la lumière (excepté pour un point au-delà de 150 heures) que la mesure effectuée à l'obscurité et que les ratios C:N ont considérablement augmenté avec le temps d'exposition (Figure 22C). Cela n'est plus du tout visible avec une intensité plus faible (Figure 24A et 24C).



Figure 23 : Evolution de l'abondance bactérienne (cellules/ml), du POC (μ g C/ml) (A) ; les losanges gris et les ronds noirs représentent les mesures de cytométrie et de POC respectivement ; de la pO2 (%) (B) et du ratio C:N (C) en fonction du temps lors d'une exposition à une intensité de lumière moyenne (406 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en continue après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 120 heures.

La durée de l'exposition lumineuse n'est donc pas à l'origine du lavage des chémostats mais des intensités plus fortes ont un effet létal sur les cellules. Inversement, l'exposition à des intensités plus faibles supprime l'effet escompté de la lumière sur l'abondance bactérienne mais réduit l'efficacité d'utilisation du carbone. Un moyen pour tenter d'observer ces mêmes effets tout en conservant plus longuement la population bactérienne et en se rapprochant encore plus des conditions naturelles était d'exposer cycliquement à la lumière (avec l'intensité la plus faible montrant un effet, soit 406 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) la population.



Figure 24 : Evolution de l'abondance bactérienne (cellules/ml), du POC (μ g C/ml) (A) ; les losanges gris et les ronds noirs représentent les mesures de cytométrie et de POC respectivement ; de la pO2 (%) (B) et du ratio C:N (C) en fonction du temps lors d'une exposition à une faible intensité de lumière (224 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en continue après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 120 heures.

En exposition cyclique 12h-12h :

Les résultats obtenus (sachant qu'une contamination est survenue après le cycle 4) ont permis de suggérer qu'avec une exposition cyclique et à cette intensité de lumière, la population bactérienne se maintenait tout au long du cycle en chémostat (soit pendant environ 300 heures) (Figure 25A). Les profils observés avant contamination n'ont cependant pas permis d'affirmer un effet positif de la lumière sur la physiologie de la souche étudiée, ni en terme d'abondance cellulaire, ni en terme d'efficacité d'utilisation du carbone (mesure de POC) ni sur les ratio C:N calculés (Figure 25A et 25B), les profils étant très variables.



Figure 25: Evolution de l'abondance bactérienne (cellules/ml) et du POC (μ g C/ml) (A) ; les losanges gris et les ronds noirs représentent les mesures de cytométrie et de POC respectivement ; du ratio C:N (B) en fonction du temps lors d'une exposition à une intensité de lumière moyenne (406 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en cycle 12h lumière – 12h obscurité. Les rectangles gris et blancs représentent les phases de lumière et d'obscurité respectivement.

3. Conclusions

Le premier volet de ce projet de thèse a permis de déterminer les conditions optimales de croissance de *P. angustum* S14 et d'obtenir des résultats préliminaires sur les effets de la lumière sur l'abondance cellulaire et sur l'utilisation du carbone organique par la population

bactérienne. L'ensemble des expériences réalisées a permis d'appréhender la technique de culture continue et de maitriser les outils.

Etude physiologique

En testant des expositions allant de 206 μ E à 2241 μ E en lumière continue, une valeur de 406 μ E s'est révélée suffisante pour observer des réponses cellulaires et éviter les phénomènes de photoinhibition. Au fil des expériences, le choix d'une exposition cyclique s'est imposé car une lumière de moyenne intensité suffit pour générer un effet négatif ou parfois létal sur la population bactérienne, conduisant à un lavage des chémostats.

L'eau de mer artificielle utilisée pour les cycles en chémostat (Berges et al., 2001), n'était pas la plus appropriée pour la croissance bactérienne puisque la source d'azote (Nitrate, NaNO₃) devant être réduite avant son incorporation demande à la cellule bactérienne une part d'énergie plus importante pour être assimilée. Elle procure ainsi un « **stress supplémentaire** » à la souche. Le ratio C:N:P du milieu était de 426:26:1. La croissance était donc co-limitée stoechiométriquement par le carbone et par l'azote. En l'absence de données préliminaires, plusieurs intensités de lumière ont été testées.

Les concentrations en carbone organique particulaire étaient, à cette intensité lumineuse, significativement plus importante à la lumière comparativement aux concentrations de carbone organique particulaire obtenues lors des phases d'obscurité. Cela a permis de suggérer une meilleure efficacité de l'utilisation du carbone par *P. angustum* S14 dans ces conditions.

Une seconde eau de mer artificielle (Eguchi et al., 1996) a été par la suite utilisée. La source d'azote a été remplacée par de l'ammonium (NH₄) et le ratio C:N:P modifié. Ces modifications ont apporté à la souche bactérienne de meilleures conditions de croissance et seule une limitation en carbone a été imposée pour les cycles en chémostat suivant. Le taux maximal de croissance avec 500 mg.l⁻¹ (concentration la plus proche de celle utilisée pour les cycles en chémostat) de glucose a été estimé à 0,45 h⁻¹ et la lumière ne l'a pas modifié. Les effets observés avec la première eau de mer artificielle n'ont pas été observés dans ces nouvelles conditions (Annexe C). Le temps d'exposition n'a pas engendré le lavage du chémostat mais les effets sur l'abondance bactérienne et sur l'utilisation du carbone n'ont pas été observés (Annexe C).

Les effets positifs de la lumière sur l'abondance bactérienne et l'efficacité d'utilisation du carbone ont donc seulement été observés dans des conditions non optimales à la croissance de *P. angustum* S14 (forte et moyenne intensité en co-limitation carbone-azote) alors qu'en améliorant ces conditions (une source d'azote plus facilement assimilable et une limitation unique par le carbone), les avantages n'ont plus été visibles. Par contre, les effets négatifs (chute et perte de la population bactérienne) ont pu être évités. L'ensemble de ces résultats nous a permis de formuler l'hypothèse que la protéorhodopsine serait utilisée par la souche bactérienne selon ses besoins et les conditions environnantes.

Optimisation technique de la culture continue.

Le premier problème rencontré lors de la mise en route du dispositif fût les grandes variations du volume au sein de la chambre de culture (expérience 1 et 2, Tableau 2). Au départ, les pompes fournies et reliées aux chémostats ont été utilisées. Le réglage de celles-ci se faisait par un calibrage en pourcentage de la pompe d'entrée et de sortie. En testant plusieurs pourcentages et en mesurant le volume émit par les pompes sur un temps donné, le débit désiré pouvait être obtenu, en théorie. Nous avons observé des variations de débit entre les pompes pour un même réglage et dans le temps pour une pompe donnée, ce qui a nécessité des calibrations indépendantes pour chaque pompe afin d'obtenir exactement le même débit en entrée et en sortie. La variabilité au cours du temps des volumes délivrés étant toujours très importante, une pompe péristaltique indépendante (Masterflex, Cole-Parmer Instrument Company, 1-100 RPM) a été ajoutée au dispositif afin de garantir une meilleure stabilité.

Le suivi en temps réel de la pO_2 a permis de constater que la quantité d'oxygène au sein du chémostat diminuait dangereusement et limitait peut être davantage la croissance de la souche que le substrat (carbone) choisi (Figure 20, Figure 21, Figure 22B et Figure 23B). Le calibrage de la sonde à oxygène s'est fait en deux étapes pour calibrer le 0 % et le 100 %. Pour éliminer le maximum d'oxygène, un mélange d'acide acétique pur et de bicarbonate de soude a été inséré dans un flacon bouché, laissant uniquement une ouverture pour y insérer la sonde. L'oxygène était dégradé à l'intérieur du flacon et le 0% pouvait être obtenu. Le 100% était obtenu en laissant la sonde mesurer une valeur à l'air libre. Deux modifications ont été apportées au niveau de l'aération :

- la première fut d'augmenter la quantité d'air comprimé stérile envoyé pour saturer le milieu en oxygène, mais bien qu'en utilisant un débit d'air important, la courbe donnée par les mesures en temps réel montrait une diminution constante ;

- la seconde fut donc de changer le calibrage du 100 % en plongeant la sonde dans le milieu de culture frais, après une agitation et une aération maximale d'une heure. Avec ces deux nouveaux changements, la pO₂ restait bien à son maximum même durant la période de croissance en batch avant le début du cycle en chémostat.

Le dernier problème rencontré lors de cycles en chémostats a été la difficulté de maintenir la pureté de la culture. Le plus grand risque de contamination provenait du moment où le réservoir 1 (milieu de culture frais) devait être changé. Nous avons utilisé trois systèmes différents pour le renouvelement du milieu. Tout d'abord, une bouteille en pyrex (Duran) autoclavable de 5 litres était utilisée. Lorsqu'elle était vide, la bouteille était ouverte, la stérilité « maintenue » à l'aide d'un bec benzène. A l'aide d'une autre bouteille pleine de milieu autoclavé, elle était de nouveau remplie. La fréquence soutenue du changement de milieu et l'environnement de la salle amenaient à des contaminations régulières. Une autre tentative visant à remplacer les bouteilles et à transférer les bouchons n'a pas donné de meilleurs résultats (Figure 26A). Finalement, des bidons de 20 litres ont été installés permettant de réduire la fréquence des changements, mais générant des contraintes de stérilisation (six heures d'autoclavage). Une fois le réservoir presque vide, il était rempli à l'aide d'une pompe péristaltique à l'aide d'un tuyau sortant du bouchon (Figure 26B) fermé par une pince et plongé dans de l'éthanol 70° qui était connecté à un autre tuyau stérile émanant du nouveau réservoir plein au moment de remplir. Avec ce dernier système, les contaminations ont été beaucoup plus rares mais le risque reste important et il faut être très attentif et prudent durant cette étape délicate.

Choix des conditions de croissance pour les prochaines expériences

L'ensemble de ces mises au point a permis de sélectionner les conditions optimales pour obtenir des expériences en cultures continues et ainsi tester l'hypothèse centrale de ce travail de thèse. Dans le chapitre suivant, les conditions choisies ont été les suivantes :

- Débit avoisinant les 100 ml.h⁻¹, bien que légèrement variable, l'état de quasi équilibre est valable (*cf.* chapitre IV) ;
- Intensité lumineuse cyclique (12-12) de 406 μ mol photon.m⁻².s⁻¹;
- Saturation en oxygène ;
- Limitation par le carbone avec un C:N:P de 54:28:1 (Eguchi et al., 1996);
- Concentration de glucose à 540 mg.l⁻¹ et 108 mg.l⁻¹;
- pH non ajusté ;
- Réservoir de 20 litres contenant l'eau de mer artificielle stérile.



Figure 26 : *Photographie des bouchons utilisés pour le réservoir 1 du dispositif de culture continue pour la bouteille de 5 litres (A) et le bidon de 20 litres (B).*

CHAPITRE IV

Effet d'une exposition cyclique a la lumière sur le métabolisme du carbone de *Photobacterium angustum* S14 en limitation de glucose (540 mg/l et 108 mg/l) CHAPITRE IV: EFFET D'UNE EXPOSITION CYCLIQUE A LA LUMIERE SUR LE METABOLISME DU CARBONE DE *Photobacterium angustum* S14 EN LIMITATION DE GLUCOSE.

1. Résumé du chapitre

Les procaryotes contenant la protéorhodopsine sont des micro-organismes largement distribués et répartis parmi de nombreux taxons bactériens. Ils sont capables d'utiliser la lumière comme source d'énergie supplémentaire grâce à cette protéine fonctionnant comme une pompe à protons. Leur importance dans les écosystèmes marins et leur capacité à générer de l'ATP ont permis de suggérer qu'ils puissent jouer un rôle important dans les flux de matière et d'énergie dans les océans. Actuellement, seule une étude en culture fermée a mis en évidence un avantage de croissance pour les bactéries avant un potentiel phototrophe via la protéorhodopsine. Ce travail vise à étudier les effets de la lumière sur les rendements en carbone de P. angustum S14, une Gammaprotéobactérie contenant la protéorhodopsine, en utilisant des expériences en culture continue. Des expositions cycliques (12h-12h) lumièreobscurité ont été utilisées dans deux conditions de substrat différentes : (1) avec une plus forte concentration de glucose et (2) avec une plus faible concentration de glucose, engendrant un pH acide et neutre respectivement. Nous observons un rendement de carbone plus important lorsque les concentrations de substrats sont faibles par comparaison aux hautes concentrations en carbone. Cela reflète une activité physiologique de P. angustum S14 qui est plus adaptée à un pH neutre. Un effet des cycles lumière-obscurité avantageux et significatif a été observé par rapport à une population uniquement exposée à l'obscurité totale mais également durant les périodes de lumière par rapport à celle d'obscurité pendant les phases de cycles elles mêmes, mais uniquement lorsque les concentrations en substrat sont élevées. Les rendements en carbone mesurés ont été utilisés pour estimer le coefficient de maintenance énergétique selon le modèle de Pirt. Cela a permis d'obtenir une donnée chiffrée du stress imposée à la population bactérienne. Il apparaît que la réponse à la lumière par P. angustum S14 soit plus influencée par la balance énergétique que par les concentrations en substrats.

2. Introduction

De nombreux micro-organismes contiennent la protéorhodopsine (Campbell et al., 2007; Rusch et al., 2007; Sabehi et al., 2004) et sont capables de photohétérotrophie c'est-àdire de passer d'un métabolisme hétérotrophe à un métabolisme phototrophe. La protéorhodopsine est une protéine transmembranaire connu pour fonctionner comme une pompe à protons dépendante de la lumière (Béjà et al., 2000). L'énergie lumineuse est transformée en potentiel de gradient chimique utilisé pour la synthèse d'ATP. Les rôles attribués à cette protéine dans les écosystèmes marins sont très controversés et mal compris. Seulement une souche bactérienne contenant la protéorhodopsine (Dokdonia sp. MED 134) a révélé une amélioration de croissance lors d'une exposition lumineuse (Gómez-Consarnau et al., 2010; Gonzalez et al., 2011; Kimura et al., 2011). Cependant, tous les paramètres n'ont pas été pris en compte lors des études physiologiques réalisées jusqu'à aujourd'hui, et parmi eux, la maintenance énergétique, un paramètre qui pourrait être indispensable pour appréhender les comportements bactériens étudiés. La maintenance énergétique est connue pour être scindée en deux, une part de l'énergie disponible est consacrée à la production de biomasse et l'autre partie au maintien cellulaire. Si la part d'énergie dédiée au maintien est faible, autrement dit, si la bactérie est dans des conditions optimales de croissance, la biomasse produite pourra être importante. En revanche, si la cellule nécessite d'utiliser beaucoup d'énergie pour survivre, en condition de stress par exemple, il sera plus difficile pour elle de produire de la biomasse. En culture continue, le modèle de Pirt (1975) est dérivé de celui de Monod (Monod, 1950) et prend en compte ce paramètre de maintenance énergétique. Ce modèle a été appliqué aux expériences présentées dans ce chapitre puisque le modèle classique de Monod n'expliquait pas correctement les données obtenues (la biomasse augmentait avec le débit alors que le modèle de Monod implique que seule la concentration en substrat contrôle la biomasse). Aucun des concepts présentés ici (les chémostats et le modèle de Pirt) n'est nouveau mais, la connexion et l'association des deux n'ont encore jamais été explorées. Deux grandes séries d'expériences ont été valorisées dans l'article scientifique suivant. La premiere comprend des dupliquas des chémostats et leur témoin négatif dans lesquels la concentration de substrat entrant est forte, la biomasse importante et le pH acide. La seconde comprend également des dupliquas des chémostats et leur témoin négatif dans lesquels la concentration en substrat est plus faible, la biomasse également et le pH neutre. Le pH neutre a été obtenu par la réduction de la biomasse (l'ajustement du pH par un ajout de soude a également été testé, Annexe D). Nous imposons donc des stress différents à la souche bactérienne. Le point méthodologique original est qu'ici, à l'inverse des chémostats classiques, le taux de dilution n'était pas parfaitement stable donc l'état de parfait équilibre inexistant. Cependant, les variations étaient suffisamment faibles et lentes pour assurer un état quasi stationnaire se déplaçant d'un équilibre à un autre (Annexe E). Ainsi, de nombreux points différents de taux de croissance et de rendement ont pu être obtenus et le stress, dans lequel la population bactérienne était soumise, a pu être comparé et estimé par le calcul numérique de la maintenance énergétique. Cet article permet de répondre aux questions suivantes : (1) Quelles sont les différences en rendements carbone dans des conditions d'obscurité et de lumière sur une population de *P. angustum* S14 ? (2) Le stress imposé à la population bactérienne engendre t-il des changements dans le métabolisme ? (3) La lumière a t-elle un effet sur l'efficacité d'utilisation du carbone ? Il permet également d'explorer de nouvelles idées quant au métabolisme cellulaire. Les bactéries ont elles un comportement dépendant du carbone organique disponible ou est – ce que l'élément déterminant est leur besoin énergétique ?

3. <u>Article 1</u>

Light-driven increase in C yield is linked to maintenance in the proteorhodopsin-containing *Photobacterium angustum* S14.

Submitted in ISME in December 2013

Light-driven increase in C yield is linked to maintenance in the proteorhodopsin-containing *Photobacterium angustum* S14

Alicia Courties^{1,2}, Thomas Riedel^{1,2}, Alain Rapaport³, Maria C. Nielsdottir^{1,2}, Jocelyne Caparros^{1,2}, Philippe Catala^{1,2}, Christophe Salmeron^{1,2}, Nicole Batailler^{1,2}, Philippe Lebaron^{1,2}, Marcelino T. Suzuki^{1,2*}.

¹ UPMC Université Paris 6, UMR 7621, LOMIC, UMS 2348, Observatoire Océanologique, Avenue du Fontaulé, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

² CNRS, UMR 7621, LOMIC, UMS 2348, Observatoire Océanologique, Avenue du Fontaulé, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

³ UMR INRA-Supagro MISTEA, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 2, and INRA-INRIA MODEMIC team, INRIA Sophia-Antipolis Méditerranée, 06902 Sophia-Antipolis, France

* Corresponding author: Marcelino T. Suzuki, UPMC Université Paris 6 and CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Avenue du Fontaulé, 66650 Banyuls-sur-Mer, France; Phone:

+33 (0)430192401; E-mail: <u>suzuki@obs-banyuls.fr</u>

Running Title: Light-driven increase in C yield in P angustum

Subject category: Microbial ecology and functional diversity of natural habitats

Abstract

Proteorhodopsin-containing prokaryotes (PCPs) are photoheterotrophic microorganisms containing transmembrane light-driven proton pumps called proteorhodopsins (PRs). Due to the prevalence of these organisms in the upper water column of the World's Ocean, and their potential for ATP generation, PCPs have been suggested to significantly influence energy and matter flows in the biosphere. To date, evidence for the significance of PCP light-driven metabolism has been obtained by comparing growth in batch culture, under light versus dark conditions, and it appears that responses to light are linked to unfavorable conditions, which so far have not been well parameterized. We studied light responses to carbon yields of the PCP Photobacterium angustum S14 using chemostat conditions and light-dark cycles. We observed significant effects of light-dark cycles as well as significant differences between samples after 12 h illumination versus 12 h darkness only under higher substrate levels leading to higher cell counts (c.a. $5-10 \cdot 10^8$ cells \cdot ml⁻¹) and lower pH. Responses of yield to changes in growth rate were used to estimate Pirt's maintenance coefficient and to assign for the first time a metric for these so-called unfavorable conditions that might be useful to evaluate energetic budgets and the potential for light-driven metabolism by PCPs. It appears that light responses by Photobacterium angustum S14 are linked to energetic balance rather than to substrate concentrations.

Keywords: Carbon yield / *Photobacterium angustum* / photoheterotrophy / Pirt model / proteorhodopsin.

Introduction

Proteorhodopsin-containing prokaryotes (PCPs) photoheterotrophic are microorganisms containing transmembrane proton pumps called proteorhodopsins (PRs). These organisms were discovered over a decade ago when a metagenomic fragment belonging to the gammaproteobacterial SAR86-cluster was shown to contain a gene with homology to the bacteriorhodopsins found in Archaea (Beja et al 2000). The opsins in PR were shown to contain seven-transmembrane α -helices and to require the chromophore retinal for their light-driven proton pump activity (Beja et al 2000). In the presence of photons the covalently bound retinal molecule isomerizes and changes the opsin conformation, resulting in a proton translocation from the inside to the outside of the cell. This proton-pump activity generates a proton motive force (*pmf*) across the cell membrane, which has been postulated to lead to ATP generation by PCPs. In fact, light-driven ATP production via PR has been shown in recombinant E. coli cells to power general cellular functions like trans-membrane nutrient transport or flagellar rotation (Martinez et al 2007, Walter et al 2007). Although PR-based ATP generation has not been directly measured in the environment, PRs have been shown to be widely distributed (e.g. Beja et al 2001, de la Torre et al 2003, Rusch et al 2007), PRcoding genes are expressed in the environment (Lami et al 2009) as well as in pure culture (e.g. Akram et al 2013, Feng et al 2013, Giovannoni et al 2005, Gomez-Consarnau et al 2007a, Riedel et al 2010), and PR-based ATP generation has been hypothesized to have possible effects in growth rates (Fuhrman et al 2008, Gomez-Consarnau et al 2007a), carbon metabolism (Fuhrman et al 2008, Gonzalez et al 2008), transport (Fuhrman et al 2008), as well as starvation survival (Akram et al 2013, Gomez-Consarnau et al 2010, Steindler et al 2011) among others.

Since their discovery, a number of studies have widened our knowledge regarding PCPs. Genomic and metagenomic studies, including large insert cloning, shotgun sequencing and single-cell genomics indicate that PR-coding genes are present in a wide taxonomic spectrum of microorganisms, particularly among environmentally abundant planktonic prokaryotes like the alphaproteobacterial clades SAR11 (Cand. Pelagibacter ubique; Giovannoni et al 2005) and SAR116 (Cand. Puniceispirillum marinus; Oh et al 2010), the gammaproteobacterial clades SAR86 and SAR92 (Beja et al 2000, Sabehi et al 2004, Stingl et al 2007a), the marine actinobacterial clade OM1 (Cand. Actinomarinidae; Ghai et al 2013),

and the marine *Euryarcheota* (Frigaard et al 2006). PR-coding genes were also found in a number of strains belonging to groups frequently isolated from seawater such as the families *Vibrionaceae* (Akram et al 2013, Gomez-Consarnau et al 2010, Wang et al 2012) and *Flavobacteriaceae* (e.g. Gomez-Consarnau et al 2007b, Gonzalez et al 2008, Riedel et al 2010). More significantly a number of studies mostly using real-time PCR or genomic data (as PRs are difficult to detect directly) has shown that PCPs might represent a large proportion of the total bacterioplankton of the upper water column (e.g. Campbell et al 2008, Riedel et al 2010, Rusch et al 2007). These high abundances, combined with the potential roles of PR based ATP generation suggest that these organisms might have a significant impact on the ecology and biogeochemistry of marine systems.

Despite this relatively large amount of knowledge acquired for a group of bacteria discovered just over a decade ago, it is also remarkable that the significance of PR-based phototrophy in the ecology and biogeochemistry of the oceans remains poorly understood. Of primary significance, hypothesized effects of PR to global biogeochemistry, such as light stimulation of growth and carbon yield remain controversial, since experiments with different strains are non-concordant. So far, light stimulation of growth and yields under favorable conditions has only been shown for the flavobacterial strain Dokdonia sp. MED134 (Gomez-Consarnau et al 2010, Gonzalez et al 2011, Kimura et al 2011), and this strain appears to represent the exception, since in all other strains tested so far, either light stimulation on growth was not observed [e.g., SAR11 (Giovannoni et al 2005), SAR92 (Stingl et al 2007b), Polaribacter sp. MED152 (Gonzalez et al 2008) and Dokdonia sp. PRO95 (Riedel et al 2010, Riedel et al 2013)], or effects of light exposure were only observed under unfavorable conditions, such as an enhanced survival after prolonged nutrient limitation in Vibrio sp. AND4 (Gomez-Consarnau et al 2010), respiratory stress in Vibrio campbellii BAA-1116 (Wang et al 2012) or under ionic stress in *Psychroflexus torquis* (Feng et al 2013). However it is worth to note that all these experiments were performed in batch cultures.

Combined, these studies led Feng and coworkers (Feng et al 2013) to hypothesize that "PR may be an important provider of light-derived energy under stress conditions" and to suggest that "PR may have a broader effect when marine prokaryotes encounter pH, temperature or other kinds of stress conditions" due to a "diversion of energy from growth and biosynthesis to maintenance and survival functions." In support of this hypotheses we report in this study that increases in carbon yields by the PR-containing bacterium *P*. *angustum* S14 grown in chemostats under light-dark cycles were observed at conditions leading to higher maintenance energy levels, possibly caused by low pH. Since the experiments were performed in chemostats we were able to estimate maintenance energy levels and apply a theoretical framework to parameterize these unfavorable conditions. These results suggest that rather than responding to substrate limitation (or availability) or to specific "stress" factors, PR-containing organisms might respond to the energetic balance of the cells.

Materials and methods

Bacterial strain and growth conditions

The PR-containing strain *Photobacterium angustum* S14 (formerly *Vibrio* sp. S14) was isolated in June 1981 from surface waters (1 m depth) of Botany Bay, New South Wales, Australia (Humphrey et al 1983). Its genome has been sequenced (Lauro et al 2009) and contains the entire PR-opsin and retinal biosynthetic pathway. This strain has been widely used as a model marine bacterium, as a copiotroph (Lauro et al 2009, Williams et al 2009) and as a model for UV resistance studies (Matallana-Surget et al 2009).

Prior to all inoculations, the strain was pre-cultured in the dark at 25°C and 110 rpm in 50 ml of same medium as that used for chemostat growth. Inoculation of the chemostats occurred at approximately after 8 hours, when pre-cultures reached an optical density at 620 nm (OD_{620nm}) of about 0.7 ("high" substrate condition) and 0.4 ("low" substrate condition), measured with a model 1200 spectrophotometer (Fisher Bioblock, France).

Chemostat Experiments

Changes in Y (ratio of POC l^{-1} / C in glucose l^{-1} in the inflow medium) of *P. angustum* S14 were tested at two substrate concentrations. "High" substrate medium was prepared in artificial seawater (ASW, Eguchi et al 1996) using glucose (3 mM) as the sole carbon source, and NH₄Cl (9.35 mM) and NaH₂PO₄ (0.33 mM) as sources of N and P yielding a final molar C:N:P ratio of 54:28:1 to assure stoichiometric carbon limitation. For the "low" substrate

medium, glucose, NH₄Cl and NaH₂PO₄ were diluted 5-fold. All chemostat experiments were performed in Labfors Lux 3 photobioreactors (Infors HT, Switzerland). Inflow was controlled with an external peristaltic pump (Masterflex, USA) to provide fresh media. Outflow was controlled by the bioreactor's peristaltic pump and placing the outflow at a height to keep the chemostat at a constant 1 liter volume. Temperature of the bioreactor was set to 25°C, aeration was provided by a vacuum pump/compressor (KNF Neuberger, Germany) with a rate of 250 ml per minute and was set at 300 rpm with a mechanical stirrer, leading to oxygen saturation above 90% in all vessels. Fluorescent bulbs (14 W Grolux, F8WT5-GRO, Sylvania, UK) were used as light sources giving a light intensity (Photosynthetic Active Radiation) of 406.7 μ E • m⁻² • s⁻¹ measured in the media prior to inoculation with a model QSL irradiance meter (Biospherical Instrument Inc., USA).

Based on preliminary experiments that showed P. angustum S14 was inhibited by continuous illumination under certain media formulations, we measured carbon yields in duplicate vessels using 12 h light: 12 h dark cycles and comparing yields in a single control run in continuous darkness. 10 ml of the pre-culture were transferred into the bioreactor and the strain was grown in batch mode to an OD_{620nm} of about 0.4 ("high" substrate condition) and to an OD_{620nm} of about 0.15 ("low" substrate condition) measured as described above, at which time the feed and outflow pumps were started. For all experiments the target dilution rate was of 0.1 l • h^{-1} corresponding to about a quarter of the maximum growth rate of *P*. angustum S14 in the "high" substrate medium. Oxygen saturation, temperature and pH were followed using built-in sensors of the bioreactor (Infors HT, Switzerland). Once OD_{620nm} was stabilized (c.a. between 90 and 110 h), triplicate samples for particulate organic carbon (POC), particulate organic nitrogen (PON) and cell counts were collected (these samples were considered as equivalent to those in the dark control), and at this stage the light was turned on. For the following six 12 h light : 12 h dark cycles, triplicate samples for OD_{620nm} and cell counts were taken about every 4 h and samples for POC every 12 h (near the end of the light or dark phases). Sampling was stopped for the following five cycles and sampling was restarted at the same regime from cycles 12 and 13. OD_{620nm}, cell counts and POC sampling for the dark only controls were taken at times equivalent to those taken in the treatments. Actual dilution rates were estimated by measuring the volume of outflow integrated over about 24 h.

Batch Experiments

In order to obtain growth characteristics of *P. angustum* S14 in batch and in conditions equivalent to those used in the chemostat experiment, we performed duplicate growth curves in the light (407 μ E • m⁻² • s⁻¹) and in the dark using the "high" substrate medium and the same parameters used in the chemostat experiments. Growth was estimated from OD_{620nm} measurements as above.

The optimum pH for growth was tested in duplicate using the "high" substrate medium to which buffers MES (Sigma-Aldrich; for pH 5.5-6.5), HEPES (Sigma-Aldrich; for pH 7.0-8.0) or AMPSO (Sigma-Aldrich; for pH 8.5-10.0) were added at 2.0 mg/ml. pH was adjusted to a 5.5-10.0 range using 25% (v/v) concentrated HCl or 1 N NaOH. Growth was followed in 24 well plates (Evergreen Scientific, USA) incubated at 25°C in the dark at 100 rpm. OD_{620nm} measurements were obtained using a ParadigmTM Multi-mode Detection Platform (Molecular Devices, USA).

POC and PON measurements

Particular organic carbon (POC) and particular organic nitrogen (PON) were measured from triplicate samples taken as follows: a volume of 5 ml ("high" substrate experiments) and 10 ml ("low" substrate experiments) were filtered through glass fiber filters (GF/F, Whatman, UK), which were finally placed in glass vials, dried for 8 h, and acidified with concentrated HCl for at least 8 h and dried. All used filters as well as glass vials had been pre-combusted at 450°C for at least 12 h. The CHN content was measured with a Series II 2400 CHNS/O Analyzer (Perkin-Elmer, USA) using a modification of the Dumas method (Jacobs 1965). Final POC and PON values were subject to an outlier analysis where any of the triplicate samples whose value was higher than 2-fold or lower than ½ of the standard deviation of the analysis.
FACS and optical density measurements

Triplicate 2 ml samples were fixed with 1% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, USA), flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For cell counting samples were diluted 100 fold and stained for 15 min with a 1:400 dilution of SYBR green I (Molecular Probes, USA). Cell counts were measured in triplicate by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) equipped with an air-cooled argon laser (488nm, 15nM) as previously described (Van Wambeke et al 2011).

Final OD_{620nm} measurements (shown in all figures, except for Figure 1) were taken in triplicate in 96 well microplates from the same fixed samples using a ParadigmTM Multi-mode Detection Platform (Molecular Devices).

Glucose measurements

Residual glucose in the medium was measured in triplicate filtrate samples (of the filters used for POC) using a Glucose Assay kit (Sigma-Aldrich) adapted to a 48 well-microplate format with OD_{540nm} measured using a ParadigmTM Multi-mode Platform (Molecular Devices). Since, as expected, all measurements from experimental Vessels H1 were in the micromolar range, thus negligible compared to the concentration of the inflow medium, a subset of samples were measured in triplicate (dark and light samples in cycle 13, and the last sample for the controls) for the remaining experiments.

Data analyses

Statistical analyses were performed using the R (http://www.r-project.org) software environment. Estimation of values of the maintenance coefficient, as well as the modeling used to evaluate quasi steady state conditions was scripted and ran using scilab (https://www.scilab.org/). Details of these analyses are presented in the supplementary methods.

Results

Theoretical Framework

The experimental design was based on relatively simple arguments and theoretical framework. The idea was that in the exponential phase of batch cultures, when growth rates (μ) are estimated, substrate concentrations are not in limiting supply thus less likely to elicit light responses by PR-containing bacteria. In addition, when estimating the significance of PR-containing bacteria to carbon biogeochemistry, measurements of carbon yield (Y) rather than growth rates might represent a more relevant measure. Therefore, we studied carbon yields of strain P. angustum S14, using carbon-limiting media in photobioreactors set in chemostat mode at specific dilution rates (D) and compared dark conditions and illuminated conditions. According to the classic chemostat equations (Monod 1950), at steady state, and if the concentration of the limiting substrate in the vessel is negligible in comparison to the concentration in the inflow, the cellular biomass in the chemostat is expected to be a product of the concentration in the inflow medium and the yield (Y) on the limiting substrate. Thus to a certain extent, biomass is independent of changes in D. Thus we hypothesized that when the chemostat was illuminated some ATP could to be supplied to cells by PR-based phototrophy, leading to less respiration and to more carbon available for biosynthesis. In this case Y should increase and the expectation would be that under illuminated conditions more biomass would be present in the chemostat.

Batch experiments

In order to evaluate the effect of light on growth of *P. angustum* S14 in batch and estimate growth parameters in the media to be used in chemostats, batch experiments were run in photobioreactors with the same medium, substrate, agitation and aeration as those used in chemostat experiments at "high" (i.e. 3 mM glucose) substrate levels. In these conditions *P. angustum* S14 grew at a rate of approximately 0.4 h⁻¹ and the growth rates were not significantly different (ANCOVA p =0.71) between illuminated (0.442± 0.047) and dark (0.468±0.047) conditions (Figure 1).



Figure 1: Growth in batch of P. angustum S14 in photobioreactor experiments using "high" substrate additions. Duplicates growth in dark (black curves) and in the light (406 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot sec^{-1}$, grey curves).

Chemostat experiments: "high" substrate levels

The first set of chemostats were run on what we called "high" substrate levels. The progression of biomass in two replicate chemostats (Vessel H1 and Vessel H2) under 12 h light and 12 h dark cycles, and in a control chemostat kept in the dark (Control H), is shown in Figure 2. We observed that after about 80 h, the OD_{620nm} and cell counts (Supp. Fig. S1) were relatively stable (within \pm 0.5X of average values) except in Vessel H1 where OD_{620nm} and cell counts increased with a corresponding decrease in pH at ca. 140 h, a time corresponding to a new batch of medium being used (Supp. Fig. S1; arrow). The pH was low in all vessels (c.a. 5.0-6.0) when compared to the optimum pH for growth of *P. angustum* S14 (pH 8.0-9.0; data not shown) reflecting the relatively high cell counts (ca. 0.5-1.0 $\cdot 10^9$ cells \cdot ml⁻¹). Throughout 13 light-dark cycles all parameters were relatively stable in both replicates as well as in the control. We observed nonetheless a slight increase in particulate organic carbon (POC) throughout the entire experiment for Vessel H1, as well as more marked increases after 12 h illumination, particularly during cycles 12 and 13 in Vessel H1 and during early cycles in Vessel H2 (Figure 2).



Figure 2: Effect of cyclic 12 h illumination and 12 h darkness the biomass of P. angustum S14 grown in chemostats under "high" substrate conditions. Grey and white vertical bars represent dark and light periods respectively for treatment chemostats, onto which data from the dark-only control were plotted based on sampling time. White squares, grey squares and black squares represent OD_{620nm} values for Vessel H1, Vessel H2 and Control H respectively. Open circles with dotted lines, grey circles with grey lines and black circles with black lines represent POC values for Vessel H1, Vessel H2 and Control H, respectively.

Clear decreases on C:N ratios after 12 h of illumination – driven by larger increases in PON relative to increases in POC (Supp. Figure S2 – were observed in both vessels, and these variations were not observed in the control chemostat (Figure 3). Assuming each light-dark cycle as a replicate measure, after cycle 4 this decrease was very significant (ANOVA p <0.001) for Vessel H1 and significant (p=0.022) for Vessel H2. Glucose concentrations in all measured samples were in the micromolar range (about 1:1000 than that of the inflow media), and thus it was assumed to be zero in subsequent calculations.

One remarkable observation was that the average POC values, and thus Y (expressed in % hereafter), were significantly higher (ANOVA p<0.001) in the dark control (121.26±4.84 mg \cdot l⁻¹), than either of the treatment Vessels [101.07±0.62 (H1) and 104.15±3.34 (H2) mg \cdot l⁻¹] and this difference existed even when only comparing values prior to the start of light-dark cycles (Figure 2). Apart from the obvious difference in light regimes between the treatment vessels and the control, we observed during experiments that the dilution rates could not have been maintained perfectly constant (Supp. Figure S3). Variations in dilution led the chemostat to a sequence of quasi-steady states that allowed measurements under different dilutions. Under Monod's model (Monod 1950) the higher dilution rate in the control should not have led to a higher Y (we recall in the Supplementary Methods that Monod's model predicts that POC values at equilibrium should decrease with an increase in dilution rates, which was not observed, likely invalidating the use of the classical Monod's model to explain our results). On the other hand, an increase in Y with μ is expected under the alternative Pirt Model. This model is a slight extension of the Monod-s model, simply adding a maintenance term (maintenance coefficient, m; Pirt 1965). For large values of the dilution rate, the maintenance consumption is negligible compared to the total growth, which explains why Monod's model is often used in biotechnology or industrial microbiology without this maintenance term. In our study it appears that dilution rate was sufficiently small so that the maintenance has to be considered. Pirt's model has been part of a recent review on microbial energetics (Hoehler and Jorgensen 2013) and the choice of this model appeared as a good alternative to Monod's model, to explain our results.



Figure 3: Effect of cyclic 12 h illumination and 12 h darkness on the C:N ratio of P. angustum S14 cells grown in chemostats under "high" substrate conditions. Vertical bars are as in Figure 2. White circles, grey circles and black circles represent C:N ratios for Vessel H1, Vessel H2 and Control H, respectively.

We used Pirt's theoretical framework (Supplementary Methods) and estimated m values from a regression line between 1/Y and 1/ μ , assuming the system was at steady state (i.e. μ =D). To evaluate the maintenance coefficient under different conditions, regressions parameters were calculated for Y values measured in continuous darkness (in both replicates and in the control; R_{DD}), Y values measured after 12 h illumination (R_{LC}) and Y values measured after 12 h darkness (R_{DC}). Since D was measured at different times at a lower frequency than Y, three regressions lines were calculated using three different values of D [prior (R_{DD-P}, R_{LC-P}, R_{LC-P}), after the Y measurement (R_{DD-A}, R_{LC-A}, R_{LC-A}), and using interpolated D values (R_{DD-I}, R_{LC-I}, R_{LC-I})]. The results (Figure 4) show that m was higher (0.142±0.020 h⁻¹) when Y was measured in continuous darkness (Figure 4A) than both when Y was measured after 12 h illumination (m=0,005±0.036 h⁻¹; Figure 4B) or after 12 h darkness (m=0.007±0.040 h⁻¹; Figure 4C), suggesting that light dark cycles might have led to a decrease of the maintenance coefficient of *P. angustum* S14.

While the observed variations in dilution rates allowed us to compare values of Y for different values of D at the different times in a single experiment, the chemostats had to be in steady state or quasi-steady state at each of the measurement points in order for this strategy to be valid to estimate parameters of Pirt's model. The assumption that the chemostats were at quasi steady state was confirmed by a goodness of fit of measured values to a numerical integration of the Pirt model, using parameters measured either in the chemostats or in batch experiments (Supp. Methods).

Since we observed an effect of varying dilution on yields, in order to test whether light-dark cycles led to differences in carbon yields without the confounding effect of varying dilution rates, we estimated expected yields (Y_{EST}) from interpolated D values using regression R_{DD-I} (black diamonds in Figure 4A). These values were then subtracted from the measured Y values (Y_{OBS}) yielding an anomaly (Y_{OBS} - Y_{EST}) that allowed a comparison of yields under light and dark conditions, again independent of variations in D (Figure 5). It is clear that this anomaly was significantly lower for samples taken in continuous darkness (0.23±3.71) than for samples taken after 12 h illumination or after 12 h darkness (ANOVA; post hoc Tukey's test; p<0.001). Y_{OBS} - Y_{EST} was not significantly different between samples taken after 12 h of illumination and those taken after 12 h of darkness based on the ANOVA post-hoc Tukey test (p=0.10), but a pairwise t-test found that the mean for samples taken after



12 h of illumination (6.91 ± 4.21) was significantly higher (p=0.043) than for those taken after 12 h of darkness (5.05 ± 3.14).

Figure 4: Relationship between carbon yields (Y) and growth rate of P. angustum S14 grown in chemostats under "high" substrate conditions used to estimate Pirt's maintenance coefficient. Growth rates were estimates from integrated dilution rates measured prior (grey diamonds, grey regression lines) or after (open diamonds, dotted regression lines) Y samples were taken, or using interpolated values (black diamonds, black regression lines). A) Cells kept in continuous darkness until sampling. B) Cells sampled after 12 h of illumination (406 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot \sec^{-1}$). C) Cells sampled after 12 h darkness.

Finally photoinhibition such as that observed in *V. campellii* BAA-1116 (Wang et al 2012) could be suggested as an alternative explanation to the observed lower values of yields in illuminated chemostats compared to those in the control, but this seems unlikely since 1) lower POC (thus Y) were observed previous to the first cycle, 2) POC (thus Y) increased or stayed relatively stable after 13 cycles, while a decrease would be expected under photoinhibition 3) the anomaly Y_{OBS} - Y_{EST} was always higher in illuminated chemostats when compared to the control and 4) inhibition of growth rates would have led to relatively higher residual substrate at steady state than we observed.



Figure 5: Effect of cyclic 12 h illumination (406 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot sec^{-1}$) and 12 h darkness on the carbon yield of P. angustum S14 grown in chemostats under "high" substrate conditions. The Y_{OBS}-Y_{EST} anomaly corresponds to Y values corrected for the effect on Y of varying dilution rates. Dark bars: Cells kept in continuous darkness until sampling. Light bars: Cells sampled after 12 h of illumination. Grey Bars: Cells sampled after 12 h darkness. The asterisk corresponds samples from Vessel H1 and Vessel H2, prior to the start of light dark cycles.

Chemostat experiments: "low" substrate levels

A second set of experiments were run at what we called "low" substrate levels (600 µM glucose, same C:N:P ratio). As for the "high" substrate levels experiments, two replicate chemostats under 12-12 cycles (Vessel L1 and Vessel L2) and a dark control chemostat (Vessel L) were performed. Contrary to our expectation, we did not observe the same effects of light on carbon yields and stoichiometry of P. angustum S14 under a lower level of substrate addition. OD_{620nm} values were more scattered compared to the "high" substrate, particularly for the illuminated bioreactors, but this was the case even before the light was turned on at (Supp. Figure S4) and throughout the cycles a very slight decrease in OD_{620nm} , also reflected in a decrease POC values was observed. C:N ratios showed a steady decrease after illumination arriving at a value of about 3.4 in illuminated bioreactors, but there were no clear light-dark variations as those observed in the "high" substrate experiments (Supp. Fig S5). pH levels were much higher (Supp. Fig S6) than those in "high" substrate experiments (Supp Fig S1), very likely due to the lower cells numbers (Supp. Fig S6). Lower cell numbers and higher pH might partly explain the significantly higher Y values in the "low" substrate experiments (mean of controls and treatments 62.01±2.73) compared to "high" substrate experiments (mean of controls and treatments 49.96±5.02; ANOVA p<0.001).

We calculated the maintenance coefficient in the same way as in the "high" substrate experiments (Supp. Figure S7), and m values were low, as Y appears to be nearly independent of μ for the dark samples (m=0.019±0.007 h⁻¹) as well as samples collected after 12 h illumination (m=0.011±0.001 h⁻¹) or after 12 h darkness (m=-0.018±0.008 h⁻¹). For comparison sake we calculated the anomaly (Y_{OBS}-Y_{EST}) shown in Figure 6. Except for one value, all values from Vessels L1 and L2 were negative and Y_{OBS}-Y_{EST} calculated from Vessels L1 and L2 were significantly different to those in Control L shown by an ANOVA (p<0.001) and a pairwise t-test (p=<0.001).



Figure 6: Effect of cyclic 12 h illumination and 12 h darkness on the carbon yield of P. angustum S14 grown in chémostats under "low" substrate conditions. The Y_{OBS}-Y_{EST} anomaly corresponds to Y values corrected for the effects of dilution rates on Y. Back bars: Cells kept in continuous darkness until sampling. White bars: Cells sampled after 12 h of illumination. Grey Bars: Cells sampled after 12 h darkness. The asterisk corresponds samples from Vessel L1 and Vessel L2, prior to the start of light dark cycles.

Discussion

As previously shown for the other members of the family *Vibrionaceae* (Akram et al 2013, Gomez-Consarnau et al 2010, Wang et al 2012), *P. angustum* S14 shows no responses to light under "normal" batch growth, and this is becoming the norm for these organisms, whereas the picture is more complicated for the *Flavobacteriaceae* even when the same genus is considered (Gomez-Consarnau et al 2007b, Riedel et al 2013). The reasons for this discrepancy remain elusive and thus the examination of another strain with a sequenced genome such as *P. angustum* S14 will provide additional data to studies of comparative genomics targeting this question.

In addition, our initial working model assumed that *P. angustum* S14 cells would respond to substrate limitation in chemostats and modify their metabolism to use light as a supplementary energy source. This assumption did not appear to hold for this PCP. This is in contrast to recent studies that measured carbon yields of the anoxygenic aerobic photoheterotroph *Erythrobacter* sp. NAP1 using chemostats (Hauruseu and Koblizek 2012) which observed quite large differences in yield under illuminated conditions (dark and light cycles). It appears that, at least for *P. angustum* S14, responses in Y to light are not solely dependent on carbon limitation. While it might be argued that the 3 mM of glucose is a high concentration relative to environmental conditions, the fact that residual glucose in the bioreactors were measured in micromolar concentrations, and that the C:N ratios were low, indicates that these cells were very likely carbon limited.

A number of responses to light (or to dark-light cycling) were observed in the "high" substrate bioreactor experiments that either did not occur, or were different to the "low" substrate bioreactor experiments. First we observed significant increases of the Y_{OBS} - Y_{EST} anomaly (c.a. 6.0 %) after light-dark cycles compared to full darkness, which were not observed in the "low" substrate experiments. This anomaly represents an increase in yield of about 15% relative to the Y_{EST} values calculated from dilution rates. However, since dilutions and yields were clearly higher in dark controls, and the slopes of the regression in Figure 4A were strongly influenced by pre-cycle values of Vessels H1 and H2, these values should be viewed conservatively. Second, in several cycles, we observed higher Y_{OBS} - Y_{EST} after 12 h of illumination compared to the previous or subsequent 12 h in darkness, and the differences between Y_{OBS} - Y_{EST} after 12 h illumination or after 12 h darkness were significant, albeit only for the t-test. Again these differences were not observed in the "low" substrate experiment. Third, the very clear and significant decreases in C:N with illumination indicates a change in the physiology of *P. angustum* S14 with light, possibly leading to an increase in protein content relative to other cellular biomolecules with light.

It is clear that most of *P. angustum* S14 responses to light or light-dark cycles happened only under higher substrate levels that yielded higher biomass and led to lower pH levels. While we cannot unequivocally attribute these responses to pH or any specific factor, both the higher Y values in "high" substrate bioreactor experiments, as well as estimates of m from dark controls and pre-cycle samples, point to a higher cost of maintenance in these

bioreactors compared to those in the "low" substrate additions, and in agreement with the suggestions by Feng and coworkers based on an analysis of several previous studies, that PR (thus light) can have an effect in conditions leading to "diversion of energy from growth and biosynthesis to maintenance and survival functions" (Feng et al 2013).

We did not directly measure the expression of the PR-opsin or of genes involved in the retinal biosynthetic pathway and thus we cannot assign these effects to PR proton pumping, but this remains as one of the most parsimonious explanations. The light levels used in our experiments were high compared to most of the previous experiments (Akram et al 2013, Feng et al 2013, Giovannoni et al 2005, Gomez-Consarnau et al 2007a, Gomez-Consarnau et al 2010, Kimura et al 2011, Riedel et al 2013, Wang et al 2012), and were chosen based on preliminary experiments (albeit with a different media and continuous light) showing that lower light levels (224 μ mol of photons • m⁻² • s⁻¹) did not elicit responses that were observed at 406.7 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Assuming that PR activity is mediating the observed light responses by P. angustum S14, a bacterium isolated from surface waters, responses under these light levels is not unexpected. Based on the presence of a glutamine at spectral tuning position 105 (EBAC31A08 numbering) in the PR-encoding sequence of P. angustum S14, it is predicted to be mainly a blue-absorbing PR. Blue-absorbing PRs retrieved from the Ocean surface were shown to have faster photocycles indicative of adaptation to higher irradiances (Sabehi et al 2005), even though this is not true for blue-absorbing PRs retrieved from deeper in the water column (e.g. Beja et al 2001, Wang et al 2003).

If confirmed in other PCPs, the relationship between the maintenance coefficient and light responses by *P. angustum* S14 could be used to evaluate whether light is actually playing a role in PCP metabolism in the environment, based on measurements of the maintenance coefficient of naturally occurring bacterioplankton under different light conditions. To date, few studies have attempted to estimate maintenance costs of bacterioplankton assemblages (Cajal-Medrano and Maske 1999, Cajal-Medrano and Maske 2005). In these studies measurements were made for entire communities, using much lower dilution rates and levels of carbon addition complicating comparisons to our data. In the latter study (Cajal-Medrano and Maske 2005) measured m values (0.33) were higher than those we measured for *P. angustum* S14 and assuming these values are the same for PCPs and non-PCPs, light-driven metabolism could contribute to fulfill maintenance requirements of PCPs

in the environment. The combination of molecular identification using probes and possible single cell estimates of respiration in dark versus light conditions could provide better estimates of the contribution of light specifically to PCP metabolism in the future.

Finally our results suggest that responses to light by *P. angustum* S14 do not appear to depend on substrate levels, but rather on the overall energetic balance of the cells, and thus again assuming these responses are caused by PR activity, biochemical mechanisms sensing energy levels rather than substrate levels might be involved in the regulation of production and/or activity of PR-opsin together with its cofactor retinal. Future transcriptomic or proteomic studies with *P. angustum* S14 should lead to a better understanding of this regulation.

Acknowledgements

This work was supported by the French ANR project RHOMEO (ProteoRHOdopsincontaining prokaryotes in Marine EnvirOnments) and a doctoral fellowship from the UPMC ED392 to Alicia Courties. We thank Maria Papadatou and Marie Olloix for assistance with chemostat experiments. We also thank Ingrid Obernosterer and Stéphane Blain for fruitful discussions, and members of the MODEMIC team (Jerome Harmand, Fabien Campillo, Claude Lobry and Tewif Sari) for discussions regarding chemostat theory and modeling.

The authors declare that there are no competing commercial interests in relation to the submitted work.

Supplementary information is available at ISME Journal's website.

Supplementary methods

Chemostat modeling and numerical simulation.

The classical chemostat model (1) describes the time evolution of a population of microorganisms and of a single limiting resource in continuous culture or in the so-called "chémostat" experimental device:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = \mu(s)x - Dx\\ \frac{ds}{dt} = -\frac{\mu(s)x}{Y} + D(s_{in} - s) \end{cases}$$

where x and s describe respectively the concentrations of biomass and of the limiting substrate. D is the dilution rate and s_{in} the input concentration of substrate. The strain is characterized by its specific growth rate $\mu(.)$ and the yield coefficient Y. Monod has proposed to use the Michaelis-Menten growth function for $\mu(.)$:

$$\mu(s) = \frac{\mu_{max}s}{K_s + s}$$

where μ_{max} is the maximal growth rate and K_s the affinity constant. The mathematical analysis of this model predicts that for a dilution rate *D* less than $\mu(s_{in})$, the system reaches asymptotically a steady-state (x^* , s^*) given by the following equations:

$$\mu(s^*) = D$$
$$x^* = Y(s_{in} - s^*)$$

(For dilution rates *D* larger than $\mu(s_{in})$, the system goes to the wash-out of the biomass). One can immediately deduce from these equations that s^* is increasing with *D*, which implies that x^* has to decrease with *D*.

Pirt (2) proposed to extend the Monod model adding a maintenance term mx that is subtracted from the substrate compartment:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = \mu(s)x - Dx\\ \frac{ds}{dt} = -\frac{\mu(s)x}{Y} + D(s_{in} - s) - mx \end{cases}$$

where *m* is a maintenance parameter. One can notice that steady states (x^*, s^*) are still defined by the equation $\mu(s^*) = D$ for the substrate concentration at steady state, but now x^* is given by a different equation:

$$x^* = Y \frac{s_{in} - s^*}{1 + m \frac{Y}{D}}$$

As already noticed by Pirt, x^* is no longer a monotonic function of *D*:

- for small values of D, one has $x^* \cong D \frac{s_{in}}{v}$, which is increasing with respect to D,
- for large values of *D* (provided that *D* less than $\mu(s_{in})$), one has $x^* \cong Y(s_{in} s^*)$, as in the Monod model, that is x^* is decreasing with respect to *D*.

The ability of this model to describe a biomass at steady state x^* that increases with the dilution rate has led test the adequacy of the model to our dataset by using the variations in dilution rate and measured POC. We have first assumed that s^* is negligible compared to s_{in} (assumption that has was validated with all measurements of s), which implies that one can write:

$$\frac{x^*}{s_{in}} \cong \frac{m}{D} + \frac{1}{Y}$$

from which parameters m and $\frac{1}{Y}$ have been estimated with a linear regression between the inverse of the carbon yield $\frac{s_{in}}{x(t_i)}$ and the inverse of the dilution rate $D(t_i)$, observed at various times t_i . Notice that one can write equivalently:

$$D\frac{x^*}{s_{in}}\approx \frac{D}{Y}+m$$

which amounts to have a linear regression between the consumption $D(t_i)\frac{x(t_i)}{s_{in}}$ and the dilution rate $D(t_i)$ at various times t_i . In practice, these two regressions are not equivalent in the determination of the parameters m and Y, because of noise and imperfection, and we have chosen the one that provided the smallest residue of the least square adjustment.

Nevertheless, some precautions have been necessary to justify the consideration of the model at steady state:

- In the chémostat experiments, the time varying feature of the dilution rate did not fulfill the hypothesis of the classical chémostat, for which D is constant trough the experiment. Consequently, we have checked that these variations were sufficiently slow to validate a quasi steady state approximation of the model (this amounts to consider that at each time t_i of measurement of the biomass, the system is really about a steady state).
- The measurement of the time varying dilution rate was not available on line, but between successive times \tilde{t}_{j-1} , \tilde{t}_j , the exact volume $\Delta V(\tilde{t}_{j-1}, \tilde{t}_j)$ extracted from the chémostat has been measured, providing an estimation of the dilution rate at time \tilde{t}_j :

$$D_{estim}(\tilde{t}_j) = \frac{\Delta V(\tilde{t}_{j-1}, \tilde{t}_j)}{\tilde{t}_j - \tilde{t}_{j-1}}$$

Notice that the times \tilde{t}_j were different from the measurement times t_i . So one has also to estimate *D* at times t_i .

The assumption of quasi-state has been checked through numerical simulations: provided a time history of the dilution rate D(.), we have checked on the simulations of the model that $\mu(s(t_i)) \cong D(t_i)$ and $x(t_i) \cong x^*(t_i)$ at each measurement time t_i . Prior knowledge of the function $\mu(.)$ and of the parameters of the model was thus necessary:

- the parameters μ_{max} and K_s of the function $\mu(.)$ were estimated from experiments in batch culture,
- the value of s_{in} was known,
- the parameter Y and m have been estimated under the steady state and the linear regressions described previously,
- the initial condition (x(0), s(0)) was known.

We have also checked that the choice of estimators of the dilution rate for any time (that is necessary for running the model simulations) does not impact significantly the results. For any time t, we first find the index j such that $\tilde{t}_{j-1} \leq t < \tilde{t}_j$, and consider the three possible estimations:

$$- D_{estim}(t) = D(\tilde{t}_{j-1}) + \frac{D(\tilde{t}_{j}) - D(\tilde{t}_{j-1})}{\tilde{t}_{j} - \tilde{t}_{j-1}} (t - \tilde{t}_{j-1})$$

or

$$- D_{estim}(t) = min\left(D(\tilde{t}_{j-1}), D(\tilde{t}_j)\right)$$

or

$$- D_{estim}(t) = max\left(D(\tilde{t}_{j-1}), D(\tilde{t}_j)\right)$$

References

1. Monod J (1950) La technique de culture continue: Théorie et applications. Ann. Inst. Pasteur 79:390-410.

2. **Pirt SJ** (1965) The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proc R Soc Lond B Biol Sci 163(991):224-231.

Supplementary figures



Figure S1. Effect of cyclic 12 h illumination and 12 h darkness on the cell numbers of P. angustum S14, and vessel pH in chémostats under "high" substrate conditions. Grey and white vertical bars represent dark and light periods respectively for treatment chémostats, onto which data from the dark-only control were plotted based on sampling times. White diamonds, grey diamonds and black diamonds represent cell counts values for Vessel H1, Vessel H2 and Control H respectively. Light grey, dark grey and black lines represent pH values for Vessel H1, Vessel H2 and Control H2 and Control H, respectively. The arrow indicates a time when a new batch of medium was used.



Figure S2. Growth of *P. angustum at different pH levels in the "high" substrate medium. The multimodal response is likely a response to the different buffers used for 5.5-6.5, 7.0-8.0 and 8.5-10.0 ranges.*



Figure S3. Effect of cyclic 12 h illumination and 12 h darkness on POC and PON in P. angustum S14 cultures grown in chemostats under "high" substrate conditions. Verticals bars are as in Figure S1. White circles, grey circles and black circles represent POC values for Vessel H1, Vessel H2 and control H respectively. White triangles, grey triangles and black triangles represent PON values for Vessel H1, Vessel H2 and control H, respectively.



Figure S4. Measured flow rates of chemostats. Vertical bars are as in Figure S1. A) "high" substrate conditions. B) "low" substrate conditions.



Figure S5. Effect of cyclic 12 h illumination and 12 h darkness on the biomass of P. angustum S14 grown in chémostats under "low" substrate conditions. Vertical bars are as in Figure S1. White squares, grey squares and black squares represent OD620nm values for Vessel L1, Vessel L2 and Control H respectively. White circles, grey circles and black circles represent POC values for Vessel L1, Vessel L2 and Control H, respectively.



Figure S6. Effect of cyclic 12 h illumination and 12 h darkness on the C:N ratio of P. angustum cells S14 grown in chémostats under "low" substrate conditions. Vertical bars are as in Figure S1. White circles, grey circles and black circles represent C:N ratios for Vessel L1, Vessel L2 and Control L, respectively.



Figure S7. Effect of cyclic 12 h illumination and 12 h darkness on the cell numbers of P. angustum S14 and vessel pH in chémostats with "low" substrate conditions. Vertical bars are as in Figure S1. White diamonds, grey diamonds and black diamonds represent cell counts values for Vessel L1, Vessel L2 and Control H respectively. Light grey, dark grey and black lines represent pH values for Vessel L1, Vessel L2 and Control L, respectively.



Figure S8: Relationship between carbon yields (Y) and growth rate of P. angustum S14 grown in chémostats under "low" substrate conditions used to estimate Pirt's maintenance coefficient. Growth rates were estimates from integrated dilution rates measured prior (grey diamonds, grey regression lines) or after (open diamonds, dotted regression lines) Y samples were taken, or using interpolated values (black diamonds, black regression lines). A) Cells kept in continuous darkness until sampling. B) Cells sampled after 12 h of illumination. C) Cells sampled after 12 h darkness.

References

Akram N, Palovaara J, Forsberg J, Lindh MV, Milton DL, Luo H *et al* (2013). Regulation of proteorhodopsin gene expression by nutrient limitation in the marine bacterium Vibrio sp. AND4. *Environ Microbiol* **15**: 1400-1415.

Beja O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP *et al* (2000). Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**: 1902-1906.

Beja O, Spudich EN, Spudich JL, Leclerc M, DeLong EF (2001). Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* 411: 786-789.

Cajal-Medrano Rn, Maske H (1999). Growth efficiency, growth rate and the remineralization of organic substrate by bacterioplankton: revisiting the Pirt model. *Aquatic microbial ecology* **19**: 119-128.

Cajal-Medrano Rn, Maske H (2005). Growth efficiency and respiration at different growth rates in glucose-limited chemostats with natural marine bacteria populations. *Aquatic microbial ecology* **38**: 125-133.

Campbell BJ, Waidner LA, Cottrell MT, Kirchman DL (2008). Abundant proteorhodopsin genes in the North Atlantic Ocean. *Environ Microbiol* 10: 99-109.

De la Torre JR, Christianson LM, Beja O, Suzuki MT, Karl DM, Heidelberg J *et al* (2003). Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12830-12835.

Eguchi M, Nishikawa T, Macdonald K, Cavicchioli R, Gottschal JC, Kjelleberg S (1996). Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium Sphingomonas sp. Strain RB2256. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1287-1294.

Feng S, Powell SM, Wilson R, Bowman JP (2013). Light-stimulated growth of proteorhodopsin-bearing sea-ice psychrophile Psychroflexus torquis is salinity dependent. *ISME J*.

Frigaard NU, Martinez A, Mincer TJ, DeLong EF (2006). Proteorhodopsin lateral gene transfer between marine planktonic Bacteria and Archaea. *Nature* **439**: 847-850.

Fuhrman JA, Schwalbach MS, Stingl U (2008). Proteorhodopsins: an array of physiological roles? *Nat Rev Microbiol* 6: 488-494.

Ghai R, Mizuno CM, Picazo A, Camacho A, Rodriguez-Valera F (2013). Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. *Sci Rep* **3**: 2471.

Giovannoni SJ, Bibbs L, Cho JC, Stapels MD, Desiderio R, Vergin KL *et al* (2005). Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. *Nature* **438**: 82-85.

Gomez-Consarnau L, Gonzales JM, Coll-Llado M, Gourdon P, Pascher T, Neutze R *et al* (2007a). Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine Flavobacteria. *Nature* 445: 210-213.

Gomez-Consarnau L, Gonzalez JM, Coll-Llado M, Gourdon P, Pascher T, Neutze R *et al* (2007b). Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine Flavobacteria. *Nature* 445: 210-213.

Gomez-Consarnau L, Akram N, Lindell K, Pedersen A, Neutze R, Milton DL *et al* (2010). Proteorhodopsin phototrophy promotes survival of marine bacteria during starvation. *PLoS Biol* 8: e1000358.

Gonzalez JM, Fernandez-Gomez B, Fernandez-Guerra A, Gomez-Consarnau L, Sanchez O, Coll-Llado M *et al* (2008). Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium Polaribacter sp. MED152 (Flavobacteria). *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8724-8729.

Gonzalez JM, Pinhassi J, Fernandez-Gomez B, Coll-Llado M, Gonzalez-Velazquez M, Puigbo P *et al* (2011). Genomics of the proteorhodopsin-containing marine flavobacterium Dokdonia sp. strain MED134. *Appl Environ Microbiol* 77: 8676-8686.

Hauruseu D, Koblizek M (2012). Influence of light on carbon utilization in aerobic anoxygenic phototrophs. *Appl Environ Microbiol* **78**: 7414-7419.

Hoehler TM, Jorgensen BB (2013). Microbial life under extreme energy limitation. *Nat Rev Microbiol* 11: 83-94.

Humphrey B, Kjelleberg S, Marshall KC (1983). Responses of marine bacteria under starvation conditions at a solid-water interface. *Appl Environ Microbiol* **45**: 43-47.

Jacobs S (1965). The Determination of Nitrogen in Biological Materials. *Methods of Biochemical Analysis*. John Wiley & Sons, Inc. pp 241-263.

Kimura H, Young CR, Martinez A, Delong EF (2011). Light-induced transcriptional responses associated with proteorhodopsin-enhanced growth in a marine flavobacterium. *ISME J* **5**: 1641-1651.

Lami R, Cottrell MT, Campbell BJ, Kirchman DL (2009). Light-dependent growth and proteorhodopsin expression by Flavobacteria and SAR11 in experiments with Delaware coastal waters. *Environ Microbiol* **11**: 3201-3209.

Lauro FM, McDougald D, Thomas T, Williams TJ, Egan S, Rice S *et al* (2009). The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15527-15533.

Martinez A, Bradley AS, Waldbauer JR, Summons RE, DeLong EF (2007). Proteorhodopsin photosystem gene expression enables photophosphorylation in a heterologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 5590-5595. Matallana-Surget S, Douki T, Cavicchioli R, Joux F (2009). Remarkable resistance to UVB of the marine bacterium Photobacterium angustum explained by an unexpected role of photolyase. *Photochem Photobiol Sci* 8: 1313-1320.

Monod J (1950). La technique de culture continue: Théorie et applications. *Ann Inst Pasteur* 79: 390-410.

Oh HM, Kwon KK, Kang I, Kang SG, Lee JH, Kim SJ et al (2010). Complete genome sequence of "Candidatus Puniceispirillum marinum" IMCC1322, a representative of the SAR116 clade in the Alphaproteobacteria. *J Bacteriol* **192:** 3240-3241.

Pirt SJ (1965). The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **163:** 224-231.

Riedel T, Tomasch J, Buchholz I, Jacobs J, Kollenberg M, Gerdts G *et al* (2010). Constitutive expression of the proteorhodopsin gene by a flavobacterium strain representative of the proteorhodopsin-producing microbial community in the North Sea. *Appl Environ Microbiol* **76:** 3187-3197.

Riedel T, Gomez-Consarnau L, Tomasch J, Martin M, Jarek M, Gonzalez JM *et al* (2013). Genomics and physiology of a marine flavobacterium encoding a proteorhodopsin and a xanthorhodopsin-like protein. *PLoS One* 8: e57487.

Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, Yooseph S *et al* (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol* **5**: e77.

Sabehi G, Beja O, Suzuki MT, Preston CM, DeLong EF (2004). Different SAR86 subgroups harbour divergent proteorhodopsins. *Environmental Microbiology* 6: 903-910.

Sabehi G, Loy A, Jung KH, Partha R, Spudich JL, Isaacson T *et al* (2005). New insights into metabolic properties of marine bacteria encoding proteorhodopsins. *PLoS Biol* **3**: e273.

Steindler L, Schwalbach MS, Smith DP, Chan F, Giovannoni SJ (2011). Energy starved Candidatus Pelagibacter ubique substitutes light-mediated ATP production for endogenous carbon respiration. *PLoS One* 6: e19725.

Stingl U, Desiderio RA, Cho JC, Vergin KL, Giovannoni SJ (2007a). The SAR92 clade: an abundant coastal clade of culturable marine bacteria possessing proteorhodopsin. *Appl Environ Microbiol* 73: 2290-2296.

Stingl U, Tripp HJ, Giovannoni SJ (2007b). Improvements of high-throughput culturing yielded novel SAR11 strains and other abundant marine bacteria from the Oregon coast and the Bermuda Atlantic Time Series study site. *ISME J* **1:** 361-371.

Van Wambeke F, Catala P, Pujo-Pay M, Lebaron P (2011). Vertical and longitudinal gradients in HNA-LNA cell abundances and cytometric characteristics in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 8: 1853-1863.

Walter JM, Greenfield D, Bustamante C, Liphardt J (2007). Light-powering Escherichia coli with proteorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2408-2412.

Wang W-W, Sineshchekov OA, Spudich EN, Spudich JL (2003). Spectroscopic and Photochemical Characterization of a Deep Ocean Proteorhodopsin. *Journal of Biological Chemistry* 278: 33985-33991.

Wang Z, O'Shaughnessy TJ, Soto CM, Rahbar AM, Robertson KL, Lebedev N *et al* (2012). Function and regulation of Vibrio campbellii proteorhodopsin: acquired phototrophy in a classical organoheterotroph. *PLoS One* 7: e38749.

Williams TJ, Ertan H, Ting L, Cavicchioli R (2009). Carbon and nitrogen substrate utilization in the marine bacterium Sphingopyxis alaskensis strain RB2256. *ISME J* 3: 1036-1052.

CHAPITRE V

Description de nouveaux

génomes

CHAPITRE V : DESCRIPTION DE NOUVEAUX GENOMES

1. Introduction

Les résultats précédemment obtenus avec *P. angustum* S14 nous ont permis de formuler l'hypothèse que les PCPs utiliseraient la protéorhodopsine dans des conditions de stress durant lesquelles le taux de maintenance énergétique (estimée par le modèle de Pirt, 1975) est important. Mais, dans les mêmes conditions de culture, lorsque des cycles lumièreobscurité ont été appliqués, la maintenance énergétique a été significativement moins importante, suggérant que la lumière serait un facteur favorable pour aider à supporter le stress imposé. De plus, le rendement de croissance serait plus efficace à la lumière et également dans des conditions de culture plus optimales. Cette démarche permettant de « quantifier » le stress pourrait être un élément clé pour comprendre le métabolisme photohétérotrophe. Pour généraliser ces observations à d'autres PCPs, il est primordial de mener le même type d'étude sur d'autres espèces d'intérêt écologique. Certaines souches de la collection MOLA (Microbial Observatory Laboratoire Arago, Figure 27) ont été présélectionnées pour les prochaines études. Ainsi, après un criblage du gène codant pour la protéorhodopsine et un séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et du gène d'intérêt, plusieurs souches candidates ont été identifiées.



Figure 27 : Le site d'observation du laboratoire ARAGO et ses trois stations de prélèvements (SOLA, POLA et MOLA).

Dans ce chapitre, il est présenté deux souches candidates pour répondre à ces attentes, MOLA 455 et MOLA 814. MOLA 455 est une SAR92 (groupe phylogénétique de bactéries marines oligotrophes) appartenant au grand groupe *des Gammaprotéobactéries*, un des groupes les plus communs du plancton marin et comprenant le plus grand nombre de représentants cultivés. Elle a été isolée des eaux de surface de la baie de Banyuls (Méditerranée, France). MOLA 814 est une bactérie psychrophile qui appartient au groupe des *Betaprotéobactéries*, un large groupe très hétérogène (environ 75 genres) présent en majorité dans les estuaires mais également dans les océans. Ce groupe taxonomique est moins bien connu dans les écosystèmes marins. Elle a été isolée au large de la mer de Beaufort (Figure 28) à 3 mètres de profondeur (latitude : 71°40,294 et longitude : 130°43,674, Projet MALINA, 2009). Leurs génomes ont été entièrement séquencés et des tests de croissance préliminaires ont été réalisés afin d'entreprendre des expérimentations en culture continue.



Figure 28 : Station de prélèvements du projet MALINA, la souche MOLA 814 a été prélevée sur la station 240.

2. Criblage de souches de la collection MOLA

2.1 Matériels et méthodes

Extraction des ADNs.

Quarante neuf souches bactériennes issues de la collection MOLA ont été cultivées dans du Marine Broth (DifcoTM Marine Broth 2216, Becton Dickinson and Company) à 25°C sous une agitation de 110 rpm (Infors shaker, Infors HT, Botmingen, Switzerland). Les culots bactériens issus de 8 ml de culture ont été obtenus par centrifugation pendant 15 minutes à 5000 g (Sigma 2-16KC, Fisher Bioblock Scientific). Les ADNs totaux de ces 49 souches bactériennes (Tableau 5) ont été extraits avec un kit commercialisé selon les recommandations du fournisseur (DNeasy Blood & Tissues kit, QIAGEN). La quantité d'ADN extrait a été mesurée en µg.ml⁻¹ à l'aide d'un spectrophotomètre (NanovueTM UV/Visible Spectrophotometers, Version 4.0, GE Healthcare). Les ADNs ont été conservés à -20°C.

Amplification par PCR.

Le gène codant pour l'ARNr 16S (utilisé ici pour confirmer l'identification des souches) a été amplifié par le couple d'amorces 1492R et 27F (Lane et al. 1991) (Tableau 3) dans une solution réactionnelle contenant 0,4 μ l de chacune des amorces à 10 μ M, 1 μ L de tampon, 1 μ l de MgCl₂ à 25 mM, 0,4 μ l de dNTP (Eurogentec) à 20 μ M et 0,05 μ l d'enzyme Platinium taq DNA polymerase (Fisher Scientific) dans un volume de 10 μ l final. Les conditions d'amplification sont décrites dans le Tableau 4. Les produits de PCR obtenus ont été visualisés sur gel d'agarose 1 % (masse/volume) dans du tampon TAE (Tris-Acétate 2 mM, EDTA 100 mM) 0,75 % (Pronadisa). Les échantillons ont été déposés en présence d'un tampon de charge (glycérol 30 %, bleu de bromophénol 0,25 %). Un marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec) a été déposé pour déterminer la taille des produits de PCR. La migration (100 Volts, 30 minutes) s'est faite en présence de Bet (Bromure d'éthydium) à 0,5 μ g.ml⁻¹ dans le gel afin de visualiser les produits de PCR sous lumière UV.

Amorces	Séquence (5'-3')	Gène cible	Т°С	Référence
			d'hybridation	
1492R	ACCTTGTTACGACTT	16S	50	Lane et al. 1991
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S	50	Lane et al. 1991
GWAIYP-M13F	GTAAAACGACGGCCAGGGR	PR 52		Modifié d'Atamna-
rev	TADATNGCCCANCC			Ismaeel et al. 2009
RYIDWL fwd	MGNTAYATHGAYTGGYT	PR	52	Atamna-Ismaeel et
				al. 2009
RYIDWL-M13F	GTAAAACGACGGCCAGM	PR	52	Modifié d'Atamna-
fwd	GNTAYATHGAYTGGYT			Ismaeel et al. 2009
GWAIYP rev	GGRTADATNGCCCANCC	PR	52	Atamna-Ismaeel et
				al. 2009
SAR92 RP fwd	TTGAASGCGATCKTGT	PR des	56	Cette étude
		SAR92		
SAR92 PR rev	AGCTACTGTTGCTGCC	PR des	56	Cette étude
		SAR92		

 Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour cette étude.

Le gène codant pour la protéorhodopsine (PR) a été amplifié avec plusieurs couples d'amorces (GWAIYP-M13F rev / RYIDWL fwd et GWAIYP rev / RYIDWL-M13F fwd). Chaque couple comprenait une amorce avec une étiquette M13 à son extrémité (Tableau 4) nécessaire pour les réactions de séquençage. L'amplification a été réalisée dans une solution réactionnelle contenant 0,4 µl de chacune des amorces à 10 µM, 1 µL de tampon, 1 µl de MgCl₂ à 25 mM, 0,4 µl de dNTP (Eurogentec) à 20 µM et 0,05 µl d'enzyme Platinium taq DNA polymerase (Fisher Scientific) dans un volume de 10 µl final. Pour MOLA 455, un autre couple d'amorce (SAR92 PR / RP) a été utilisé pour amplifier plus spécifiquement le gène appartenant à ce groupe (Tableau 4). Ces amorces ont été dessinées par alignement de l'ensemble des séquences du gène présent chez les SAR92 connu jusqu'à 2011. La solution réactionnelle utilisée a été la même (à l'exception des amorces) que celle décrite ci-dessus. Les conditions d'amplification sont décrites dans le Tableau 4. Les produits de PCR obtenus ont été visualisés sur gel d'agarose 2 % (masse/volume) dans du tampon TAE modifié (Tris 2 mM, Acétate 0,9 mM, EDTA 1,25 mM) 0,75 %. Les échantillons ont été déposés en présence d'un tampon de charge (glycérol 30 %, bleu de bromophénol 0,25 %). Un marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec) a été déposé pour déterminer la taille des produits de PCR. La migration (100 Volts, 45 minutes) s'est faite en présence de Bet (Bromure d'éthydium) à 0,5

 μ g.ml⁻¹ dans le gel afin de visualiser les produits de PCR sous lumière UV. Les bandes visibles entre 300 et 350 paires de bases ont été coupées afin d'être purifiées et séquencées.

Etape	ARNr 16S	PR (M13F sur rev)	PR (M13F sur fwd)	PR (SAR92)
Dénaturation initiale	3 min à 94°C	4 min à 94°C	4 min à 94°C	4 min à 94°C
Cycles	<u>35 cycles</u>	40 cycles	40 cycles	40 cycles
d'amplification	30 sec à 94°C	1 min à 92°C	1 min à 92°C	1 min à 92°C
	30 sec à 50°C	1 min à 52°C	1 min à 52°C	1 min à 56°C
	2 min à 72°C	1 min à 72°C	1 min à 72°C	1 min à 72°C
Elongation finale	10 min à 72°C	10 min à 72°C	10 min à 72°C	10 min à 72°C

 Tableau 4 : Conditions de PCR appliquées selon le gène à amplifier.

Séquençage et identification.

Après purification (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen), les produits obtenus par les réactions de PCR (gène codant pour l'ARNr 16S et/ou gène codant pour la protéorhodopsine) ont été préparés pour le séquençage avec un kit commercial (Agencourt[®] CleanSEQ, Agencourt Bioscience Corporation). La réaction de PCR pour le séquençage a été réalisée avec 1 µl de produit de PCR à tester dans un volume final réactionnel de 10 µl contenant 1,75 µl de Big Dye Terminator 5X sequencing buffer, 0,5 µl de BDT (enzyme et **ddNTPs** les fluorochromes) et 1 μl d'amorce (907 5'avec reverse CCGTCAATTCCTTTGAGTTT - 3', (Muyzer and Smalla, 1998), pour le gène codant pour l'ARNr16S et M13F forward 5' - GTAAAACGACGGCCAG - 3' pour le gène codant pour la protéorhodopsine). Quarante cycles de séquençage (10 secondes à 95°C, 5 secondes à 50°C et 2-3 minutes à 55°C) ont été réalisés sur les échantillons. La lecture de séquences a été réalisée à l'aide du 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, HITACHI).

Les séquences obtenues ont été éditées visuellement à l'aide du logiciel gap4 de Staden (Bonfield et al., 1995). Les séquences d'ARNr 16S ont été identifiées par comparaison avec la base *nt* de Genbank en utilisant le program blastn en ligne du site NCBI (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast</u>). Les séquences provenant des amplifications avec des amorces spécifique du gène codant pour la protéorhodopsine ont été identifiées par comparaison avec la base *nr* de Genbank en utilisant le program blastx en ligne du site NCBI (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast</u>).

2.2 Résultats

Sur l'ensemble des souches testées, 4 n'ont pas pu être amplifiées par PCR et ont été exclues de la suite de l'étude. Sur les 45 restantes, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S a permis de confirmer l'identité de 34 souches (Tableau 5).

Lors du criblage du gène codant pour la protéorhodopsine, 15 souches sur 21 testées ont révélées une ou plusieurs bandes se situant à la bonne longueur de fragment sur gel d'agarose (Figure 29). Toutes les bandes coupées ont été séquencées et seulement une (MOLA 455) a exprimé le gène codant pour la protéorhodopsine (Tableau 5).

Lors d'une étude précédente, le même protocole a été réalisé sur un ensemble de 84 souches isolées d'une même campagne (MALINA). Les résultats obtenus ont permis de trouver le gène codant pour la protéorhodopsine dans deux des souches testées (MOLA 814 et MOLA 815) (données non montrées, Kerdraon, stage de Master 2, 2010).



Figure 29 : Exemple d'un gel d'agarose après migration électrophorétique des produits de PCR ciblant le gène codant pour la protéorhodopsine obtenus pour quatre souches MOLA. Les souches écrites en jaune ont été testées avec le couples d'amorces possédant l'étiquette M13F en forward et les souches écrites en vert avec le couple d'amorces possédant l'étiquette M13F en reverse. S.L. signifie Smart Ladder (marqueur de taille) ; C- et C+ les témoins négatif et positif. Les marques rouges sont positionnées au niveau des bandes à séquencer.
Nom	Quantité d'ADN µg/ml	PCR 16S	Confirmation Identité	PCR PR	Séquençage PR
MOLA 7	108	+++	Oui	3	-
MOLA 85	65,5	++	Oui	2	-
MOLA 97	98,5	++	Oui	2	
MOLA 99	155	+	Oui	0	
MOLA 104	53	++	Oui	0	
MOLA 108	143,5	+++	Oui	2	-
MOLA 118	369	+	Oui	1	
MOLA 130	139	+	Oui	3	-
MOLA 132	60	++	Oui	-	
MOLA 141	30	+	Oui	1	
MOLA 143	80	+	Oui	0	
MOLA 145	74	+	Oui	1	NT
MOLA 146	200	+	Non	NT	NT
MOLA 225	92.5	+	Oui	2	-
MOLA 256	149	++	Oui	1	NT
MOLA 286	124,5	++	Oui	2	-
MOLA 288	29.5	++	Oui	3	-
MOLA 302	120.5	+++	Non	NT	NT
MOLA 327	90.5	+	Non	NT	NT
MOLA 394	41.5	+++	Oui	0	
MOLA 397	48	-		NT	NT
MOLA 411	144.5	+++	Non	NT	NT
MOLA 453	76	++	Qui	2	-
MOLA 454	226	-		NT	NT
MOLA 455	105	++	Oui	1	+
MOLA 500	551.5	++	Non	NT	NT
MOLA 501	390.5	++	Oui	NT	NT
MOLA 502	409.5	++	Oui	NT	NT
MOLA 503	2384	++	Oui	NT	NT
MOLA 504	297.5	+		NT	NT
MOLA 505	418	++	Non	NT	NT
MOLA 506	289.5	++	Oui	NT	NT
MOLA 507	124	-		NT	NT
MOLA 508	846	++	Oui	NT	NT
MOLA 511	163.5	+	Non	NT	NT
MOLA 512	175,5	+	Non	NT	NT
MOLA 513	321	++	Oui	NT	NT
MOLA 515	249.5	++	Oui	NT	NT
MOLA 540	141,5	++	Non	NT	NT
MOLA 541	56.5	-		NT	NT
MOLA 845	93	+	Oui	NT	NT
MOLA 862 G08	82.5	+	Oui	NT	NT
MOLA 880_A11	50.5	++	Oui	NT	NT
MOLA 888_A12	118,5	+	Oui	NT	NT
 E2M+119	551	++	Oui	NT	NT
EB -3 14-907R	151.5	+++	Oui	0	
EF313b-907 R	94.5	+++	Oui	2	-
EM-3 17	31	+++	Oui	0	
LMdA(-2)6	33	+++	Non	NT	NT

Tableau 5: Liste des souches bactériennes testées. Les quantités d'ADN extraites ainsi que les résultats de PCR et de séquençage sont répertoriés dans ce tableau. Les signes +, ++ ou +++ représentent l'intensité de la bande visible sur gel d'agarose après amplification du gène codant pour l'ARNr16S. La couleur verte est utilisée pour signaler les échantillons ayant subit une dilution au 100^{ème}. Les numéros dans la colonne « PCR PR » représentent le nombre de bandes coupées et purifiées sur le gel pour le séquençage. Le sigle NT signifie « Non Testée », le signe – que le gène de la protéorhodopsine n'est pas présent. Les cases grisées représentent une absence de résultat.

2.3 Conclusion

Plus d'une centaine de souches bactériennes ont été testées lors de cette étude. Parmi elles, le gène codant pour la protéorhodopsine a été détecté seulement sur trois souches : MOLA 455, MOLA 814 et MOLA 815. Deux d'entre elles ont été sélectionnées pour valider l'hypothèse posée dans le chapitre précédent. Les souches MOLA 814 et 815 étant très proches phylogénétiquement, seule la souche MOLA 814 a été retenue. Pour réaliser des expériences en chemostats et tester leur potentiel photohétérotrophe, il est nécessaire d'obtenir des informations plus précises sur les souches étudiées. Les génomes de ces deux souches ont donc été séquencés. Cette étape a permis de vérifier quel type de protéorhodopsine était présent dans le génome et si la voie métabolique nécessaire à la phototrophie via la protéorhodopsine était complète et donc possible (Figure 30).



Figure 30 : Exemple de la voie métabolique complète pour la phototrophie via la protéorhodopsine de P. angustum S14 en comparaison à celle de Photobacterium sp. SKA34, une Gammaprotéobactérie (Gomez-Consarnau et al. 2007, informations supplémentaires).

De plus, le taux de croissance maximal des souches doit être déterminé afin de choisir le taux de dilution adéquat pour conserver la population en culture continue. Les courbes de croissance doivent donc être réalisées en batch à la lumière et à l'obscurité dans un milieu de culture adapté. Cette information permet de savoir si la lumière a un effet sur le taux de croissance de la souche et/ou sur la biomasse produite.

3. Description de génomes

Dans ce paragraphe, les génomes des deux souches sélectionnées, MOLA 455 et MOLA 814, sont décrits dans deux articles indépendants publiés dans Genome Announcement :

ARTICLE 2:

Draft genome sequence of the gammaproteobacterial strain MOLA455 a representative of a ubiquitous proteorhodopsin-producing group in the ocean.

Genome Announcement, 2013 (Proof en fin de section)

ARTICLE 3:

Genome sequence of strain MOLA814, a proteorhodopsin-containing representative of the *Betaproteobacteria* common in the Ocean.

Genome Announcement, 2013

Draft genome sequence of the gammaproteobacterial strain MOLA455 a representative of a ubiquitous proteorhodopsin-producing group in the ocean.

Alicia Courties^{1,2}, Thomas Riedel^{1,2}, Michael Jarek³, Maria Papadatou^{1,2}, Laurent Intertaglia^{1,2}, Philippe Lebaron^{1,2}, Marcelino T. Suzuki^{1,2*}

¹ UPMC Université Paris 6, UMR 7621, Observatoire Océanologique, Avenue du Fontaulé, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

² CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Avenue du Fontaulé, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

³ Helmholtz-Centre for Infection Research, Research Group Genomic Analytics, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Germany

Running Title: Genome sequence of MOLA455

Corresponding author: Marcelino T. Suzuki, UPMC Université Paris 6, CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Avenue du Fontaulé, 66650 Banyuls-sur-Mer, France; Phone: +33 (0)430192401; E-mail: suzuki@obs-banyuls.fr.

Genome Announcement

Abstract

Strain MOLA455 is a marine gammaproteobacterium isolated from the bay of Banyuls-sur-Mer, France. Here we present its genome sequence and annotation. Genome analysis revealed the presence of genes associated to a possibly photoheterotrophic lifestyle that uses a proteorhodopsin protein.

Main Text

Strain MOLA455 was isolated from a coastal water sample taken from a depth of 3 m at station SOLA located 0.5 miles offshore in the bay of Banyuls-sur-Mer, France (42°29.300'N, 3°08.700'E). This strain belongs to the ubiquitous gammaproteobacterial SAR92 group. Its 16S rRNA was found to be 99% identical to an OTU shown to be very abundant among surface ocean water around the world (1).

For whole genome sequencing the strain was cultivated in Marine Broth 2216 medium (BD, Difco, Sparks, MD) at 25°C for 2 weeks. A previous published was used for genomic DNA isolation (2), except that all used volumes were divided by two. The library for whole genome sequencing was prepared using the TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) with 550 bp insert sizes following the manufacturer's protocol. The genomic DNA was fragmented using the nebulization technique and the Covaris S2 system (Covaris, Woburn, MA). Overhangs were converted into blunt ends. Additionally A-bases were added to the 3'-end of the blunt phosphorylated DNA fragments, followed by purification and multiple indexed adapter ligation. The quality of the prepared library was checked by using qPCR (Kapa library quantification kit, Kapa Biosystems, Woburn, MA) as well as on an Agilent Bioanalyzer high-sensitivity (HS) chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) performed according to the manufacturer's instructions. For paired-end genome sequencing a MiSeq System (Illumina) was used resulting in 2,640,464 reads, whereas 2,365,483 of them were finally converted to fastq format and *de novo* assembled with Velvet

1.2.07 (3). The fastq-mcf tool of ea-utils (http://code.google.com/p/ea-utils) was used to control the sequencing data for general quality features. The resulting 4 scaffolds of the genome with a 161x average coverage were annotated by using Prokka 1.7 (4). The sequenced draft genome of strain MOLA455 consists of 4 contigs, totaling 2,605,026 bp in size and has a GC content of 50.02 %. It was found to encode 2,331 coding sequences, 3 rRNAs and 35 tRNAs.

Genome analysis revealed the presence of a green-light-absorbing proteorhodopsinencoding sequence (PR) of 229 amino acid residues (5,6,7). It shows sequence features suggestive of proton pump activity from the inside to the outside of the bacterial cell leading to a proton motive force (*pmf*) across the cell membrane (5,7,8). In addition all genes associated to a retinal-producing pathway were detected (8,9,10).

BLAST analysis (11) showed highest PR protein sequence identity to the PR sequence of the marine gammaproteobacterium HTCC2207, which was reported to reach up to 10% of the total bacterioplankton in surface waters close to the coast of Oregon, USA (12). The presence of a PR gene sequence together with gene sequences putatively associated in the retinal biosynthetic pathway in the genome sequence of strain MOLA455 suggests a putative photoheterotrophic lifestyle by generating energy from light.

Nucleotide sequence accession number(s)

The Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank unter the accession AZIN00000000. The version described in this paper is version AZIN01000000.

Acknowledgements

This work was supported by the French ANR (project RHOMEO). Growth and DNA extraction were performed using instruments and facilities of the Marine Biodiversity and Biotechnology (Bio2Mar) platform of the OOB.

We sincerely thank the Genome Analytics staff (Helmholtz-Centre for Infection Research) for rapidly and efficiently sequencing the genome.

References

- Yooseph S, Nealson KH, Rusch DB, McCrow JP, Dupont CL, Kim M, Johnson J, Montgomery R, Ferriera S, Beeson K, Williamson SJ, Tovchigrechko A, Allen AE, Zeigler LA, Sutton G, Eisenstadt E, Rogers YH, Friedman R, Frazier M, Venter JC. 2010. Genomic and functional adaption in surface ocean planktonic prokaryotes. Nature 468:60-66.
- Ausubel FM, Brent R. Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, Struhl K. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York, NY.
- 3. **Zerbino DR, Birney E.** 2008. Velvet: algorithms for the *de novo* short read assembly using the Brujin graphs. Genome Res. **18**:821-829.
- Victorian Bioinformatics Consortium. 2013. Prokka 1.7. Victorian Bioinformatics Consortium, Clayton, Victoria, Australia. See http://www.vicbioinformatics.com/ software.prokka.shtml.
- Béjà O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP, Jovanovich SB, Gates GM, Feldman RA, Spudich JL, Spudich EN, DeLong EF. 2000. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. Science 289:1902-1906.
- Man D, Wang W, Sabehi G, Aravind L, Post AF, Massana R, Spudich EN, Spudich JL, Béjà O. 2003. Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. EMBO J. 22:1725-1731.
- 7. Fuhrman JA, Schwalbach MS, Stingl U. 2008. Proteorhodopsins: an array of physiological roles? Nat. Rev. Microbiol. 6:488-494.
- Gómez-Consarnau L, González JM, Coll-Lladó M, Gourdon P, Pascher T, Neutze R, Pedrós-Alió C, Pinhassi J. 2007. Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine *Flavobacteria*. Nature 445:210-213.

- 9. **Kimura H, Young CR, Martinez A, DeLong EF.** 2011. Light-induced transcriptional responses associated with proteorhodopsin-enhanced in a marine Flavobacterium. ISME J. 5:1641-1651.
- Riedel T, Gómez-Consarnau L, Tomasch J, Martin M, Jarek M, González JM, Spring S, Rohlfs M, Brinkhoff T, Cypionka H, Göker M, Fiebig A, Klein J, Goesmann A, Fuhrman JA, Wagner-Döbler I. 2013. Genomics and physiology of a marine flavobacterium encoding a proteorhodopsin and a xanthorhodopsin-like protein. PloS One 8(3):e57487.
- 11. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Stingl U, Desiderio RA, Cho JC, Vergin KL, Giovannoni SJ. 2007. The SAR92 clade: an abundant coastal clade of culturable marine bacteria possessing proteorhodopsin. Appl. Environ. Microbiol. 73:2290-2296.

Article en correction :



Genome sequence of strain MOLA814, a proteorhodopsin-containing representative of the *Betaproteobacteria* common in the Ocean.

Alicia Courties^{1, 2}, Thomas Riedel^{1, 2}, Laurent Intertaglia^{1, 2}, Michael Jarek³, Philippe Lebaron^{1, 2}, Marcelino T. Suzuki^{1, 2*}

¹ UPMC Université Paris 6, UMR 7621, Observatoire Océanologique, Avenue du Fontaulé, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

² CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Avenue du Fontaulé, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

³ Helmholtz-Centre for Infection Research, Research Group Genomic Analytics, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Germany

Corresponding author: Marcelino T. Suzuki, UPMC Université Paris 6, CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Avenue du Fontaulé, 66650 Banyuls-sur-Mer, France; Phone: +33 (0)430192401; E-mail: suzuki@obs-banyuls.fr.



Genome Sequence of Strain MOLA814, a Proteorhodopsin-Containing Representative of the Betaproteobacteria Common in the Ocean

Alicia Courties,^{a,b} Thomas Riedel,^{a,b} Michael Jarek,^c Laurent Intertaglia,^{a,b} Philippe Lebaron,^{a,b} Marcelino T. Suzuki^{a,b}

UPMC Université Paris 6, UMR 7621, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, Francea; CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, Franceb; Helmholtz-Centre for Infection Research, Research Group Genomic Analytics, Braunschweig, Germanys

Strain MOLA814 is a marine betaproteobacterium that was isolated from seawater in the Beaufort Sea. Here, we present its genome sequence and annotation. Genome analysis revealed the presence of a proteorhodopsin-encoding sequence together with its retinal-producing pathway, indicating that this strain might generate energy by using light.

Received 8 November 2013 Accepted 15 November 2013 Published 19 December 2013

Citation Courties A, Riedel T, Jarek M, Intertaglia L, Lebaron P, Suzuki MT. 2013. Genome sequence of strain MOLA814, a proteorhodopsin-containing representative of the Betaproteobacteria common in the ocean. Genome Announc. 1(6):e01062-13. doi:10.1128/genomeA.01062-13.

Copyright © 2013 Courties et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported license

Address correspondence to Marcelino T. Suzuki, suzuki@obs-banyuls.fr.

Arine strain MOLA814 was isolated from a depth of 3 m in the Canadian Beaufort Sea (71°40.294'N, 130°43.674'W). This strain belongs to the Betaproteobacteria, and its 16S rRNA sequence is 98% identical to that of strain OTU126, which is described as the 40th most abundant operational taxonomic unit (OTU) among >45,000 sequences from surface ocean planktonic prokaryotes (1).

The genomic DNA of strain MOLA814 was extracted using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol (2). Library preparation for whole-genome sequencing was performed using the TruSeq DNA PCR-free sample preparation kit (Illumina, San Diego, CA) with 550-bp insert sizes, according to the manufacturer's protocol. Genomic DNA was shared using a Covaris S2 system (Covaris, Woburn, MA) and subjected to end repair, purification, and ligation of the fragments with multiple indexed adapters for library preparation. Quality control of the prepared library was validated using quantitative PCR (qPCR) (Kapa library quantification kit; Kapa Biosystems, Woburn, MA) and an Agilent Bioanalyzer high-sensitivity (HS) chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) according to the manufacturers' instructions. Genome sequencing was performed to 250 cycles in both directions in a MiSeq system (Ilumina), which generated 2,446,022 total reads (611.5 Mbp). DNA-Seq reads were converted to Fastq format and de novo assembled with Velvet 1.2.07 (3). The sequencing data were controlled for general quality features using the FastqMcf tool of ea-utils (http://code.google.com/p/ea-utils). The resulting 3 scaffolds with 87× average coverage of the genome were annotated using Prokka 1.7 (4).

The draft genome sequence of strain MOLA814 is 2,859,706 bp in size, contains 2,683 coding sequences, 3 rRNAs, and 39 tRNAs, and has a G+C content of 53.6%

Interestingly, the genome analysis of strain MOLA814 revealed the presence of a proteorhodopsin-encoding gene sequence (PR) and a putative retinal-producing biosynthetic pathway (5-7). The PR-encoding sequence codes for a green light-absorbing PRopsin (8, 9) of 263 amino acid residues with the typical features necessary for proton pump activity, like Asp97 and Glu108 resi-

November/December 2013 Volume 1 Issue 6 e01062-13

dues (eBAC31A08 numbering). These act as proton acceptor and donor in the retinylidene Schiff base transfer during the PR photocycle. BLAST analysis (10) revealed high PR protein sequence identities to the PR sequences of representatives belonging to the alphaproteobacterial SAR116 clade, like "Candidatus Puniceispirillum marinum" IMCC1322 (11).

The presence of a PR-encoding sequence together with its retinal-producing pathway in the genome sequence indicates a putative photoheterotrophic lifestyle. In addition, the genome sequence of strain MOLA814 provides a good opportunity for studying the physiological and ecological functions of a commonly occurring marine betaproteobacterium living in ocean wa-

Nucleotide sequence accession numbers. The whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. AYMW00000000. The version described in this paper is version AYMW01000000.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French ANR (project RHOMEO). Growth and DNA extraction were performed using the Marine Biodiver-sity and Biotechnology (Bio2Mar) platform of the OOB.

We sincerely thank the Genome Analytics staff (Helmholtz-Centre for Infection Research) for rapidly and efficiently sequencing the genome.

REFERENCES

- 1. Yooseph S, Nealson KH, Rusch DB, McCrow JP, Dupont CL, Kim M, Johnson J, Montgomery R, Ferriera S, Beeson K, Williamson SJ, Tovchigrechko A, Allen AE, Zeigler LA, Sutton G, Eisenstadt E, Rogers YH, Friedman R, Frazier M, Venter JC. 2010. Genomic and functional adaptation in surface ocean planktonic prokaryotes. Nature 468:60–66.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, Struhl K. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York, NY.
- 3. Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for the de novo short read
- Assembly using the Brujin graphs. Genome Res. 18:821–829.
 Victorian Bioinformatics Consortium. 2013. Prokka 1.7. Victorian Bioinformatics Consortium, Clayton, Victoria, Australia. http://www .vicbioinformatics.com/software.prokka.shtml.
- 5. Béjà O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP,

Genome Announcements

genomea.asm.org 1

Courties et al.

Jovanovich SB, Gates CM, Feldman RA, Spudich JL, Spudich EN, DeLong EF. 2000. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. Science 289:1902–1906.
Gómez-Consarnau L, González JM, Coll-Lladó M, Gourdon P, Pascher T, Neutze R, Pedrós-Alió C, Pinhassi J. 2007. Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine *Flavobacteria*. Nature 445:210–213.
Kimura H, Young CR, Martinez A, DeLong EF. 2011. Light-induced transcriptional responses associated with proteorhodopsin-enhanced growth in a marine *Flavobacterium*. ISME J. 5:1641–1651.
Man D, Wang W, Sabehi G, Aravind L, Post AF. Massana R. Spudich

- 8. Man D, Wang W, Sabehi G, Aravind L, Post AF, Massana R, Spudich

EN, Spudich JL, Béjà O. 2003. Diversification and spectral tuning in

- Beya O. 2005. Diversification and spectral turing in marine proteorhodopsins. EMBO J. 22:1725–1731.
 Fuhrman JA, Schwalbach MS, Stingl U. 2008. Proteorhodopsins: an array of physiological roles? Nat. Rev. Microbiol. 6:488–494.
 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local
- Algenta SF, Olsh W, Miler W, Myels EW, Liphian DJ. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403–410.
 Oh HM, Kwon KK, Kang I, Kang SG, Lee JH, Kim SJ, Cho HC. 2010. Complete genome sequence of "*Candidatus* Puniceispirillum marinum" IMCC 1322, a representative of the SAR116 clade in the *Alphaproteobac*-tion of the second secon teria. J. Bacteriol. 192:3240-3241.

4. Courbes de croissance

4.1 Matériels et Méthodes

Souches bactériennes

MOLA 455 est une *Gammaprotéobactérie* à protéorhodopsine verte dont le génome a été entièrement séquencé (Courties et al. 2013 (article 2), in prep). Elle a été isolée à la station MOLA (Mer méditerranée, Banyuls-sur-mer, France). MOLA 814 est une *Betaprotéobactérie* à protéorhodopsine verte dont le génome a été entièrement séquencé (Courties et al. 2013 (article 3), in prep). Elle a été isolée au large de la mer de Beaufort (projet MALINA).

Milieux de culture et conditions de culture

La croissance a été testée sur différents milieux de culture (Tableau 7) pour déterminer le plus adapté pour réaliser les courbes de croissance :

 le milieu Marine Broth (DifcoTM Marine Broth 2216, Becton Dickinson and Company) qui est un milieu riche composé de multiples sources de carbone. Ce même milieu a également été préparé à 10 % de marine broth final ;

- le milieu R₂B à 10 % contenant, pour 1 litre final (250 ml d'eau ultra pure et 750 ml d'eau de mer filtrée sur 0,2 μ m), 0,05 g d'extrait de levure (Sigma-aldrich), 0,05 g de bacto Peptone (Becton, Dickinson and company), 0,05 g d'acide casamine (Becton, Dickinson and company), 0,05 g de glucose (Sigma-aldrich), 0,05 g d'amidon (Sigma-aldrich), 0,03 g de sodium pyruvate (Sigma-aldrich), 0,03 g de potassium diphosphate (Sigma-aldrich), 0,05 g de sulfate de magnésium (Sigma-aldrich) ;

- une eau de mer artificielle additionnée de 3mM glucose comme seule source de carbone (Eguchi et al., 1996) ;

- deux eaux de mer artificielles (Eguchi et al., 1996) modifiées. Les sels sont utilisés et additionnés de (1) 1% de Marine Broth (DifcoTM Marine Broth 2216, Becton Dickinson and Company) pour la première. Une salinité de 35 a été mesurée à l'aide d'un réfractomètre (HAND Refractometer S/Mill, ATAGO). Pour la deuxième eau de mer artificielle (2), les mêmes sels sont additionnés de 10% de Marine Broth (DifcoTM Marine Broth 2216, Becton Dickinson and Company). Le milieu est ensuite dilué à 87,5% pour obtenir une salinité de 35.

8 ml de chaque milieu décrit ci-dessus ont été inoculés avec un clone (issus d'une gélose de Marine Agar) de MOLA 455 et MOLA 814 et incubé à 25°C sous agitation à 110 rpm pour MOLA 455 (Infors shaker, Infors HT, Botmingen, Switzerland) et à 15°C dans une armoire thermorégulatrice (AQUA LYTIC) en statique pour MOLA 814 et à l'obscurité.

Conditions de croissance

Les courbes de croissance de chaque souche ont été réalisées dans de l'eau de mer artificielle modifiée (2) et également dans de l'eau de mer artificielle (Eguchi et al., 1996) avec 3mM de glucose comme seule source de carbone pour MOLA 814. Les conditions de culture sont exposées dans le tableau 6. Des intensités de lumière différentes ont été utilisées pour les deux souches puisque les étuves permettant les températures de croissance ne disposaient pas des mêmes néons lumineux. La croissance a été estimée par suivi de l'abondance bactérienne en cytométrie en flux.

	MOLA 455	MOLA 814
Température °C	25	15
Intensité de lumière µE	44,82	182,6
Obscurité	Oui	Oui
Agitation	Non	Non
Sels + 8,75% MB (2)	Oui	Oui
Eau de mer (Eguchi et al., 1996)	Non	Oui

Tableau 6 : Conditions de croissance des deux souches étudiées pour la réalisation des courbes de croissance.

Cytométrie en flux

Le nombre de cellules a été évalué par cytométrie en flux avec un cytomètre FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) équipé d'un laser Argon refroidit par air (488nm, 15nM). Les échantillons sont conservés à -80°C après fixation avec une solution de glutaraldéhyde (Grade II, 25% Sigma-aldrich) à une concentration finale de 1%. Après fixation, ils sont congelés immédiatement dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Les

cellules contenues dans 1ml d'échantillon sont marquées pendant 15 minutes par du SYBR green I (1:4000 concentration finale), marqueur de l'ADN et de l'ARN (Molecular Probes) puis incubées à température ambiante et à l'obscurité totale (Lebaron et al., 1998).

4.2 Résultats

Des tests de croissance préliminaires ont été réalisés sur différents milieux de cultures (Tableau 7) afin de trouver un milieu permettant une croissance optimale des souches et qui soit facilement utilisable pour des expériences en culture continue. Les deux souches se sont rapidement développées sur Marine Broth. Cependant ce milieu est très riche et peu adapté à la réalisation de chémostats car il contient de multiples sources de carbone rendant les interprétations plus complexes. MOLA 455 a montré une croissance uniquement dans l'eau de mer modifiée (2) avec une production de biomasse très faible (Tableau 7). C'est donc sur ce milieu de culture que la courbe de croissance a été réalisée (Figure 31A).

	MOLA 455	MOLA 814	
Marine Agar	petites colonies beiges	petites colonies roses	
Marine Agai	brillantes et plates	brillantes et bombées	
Marine Broth	+++ (6jours)	+++ (6jours)	
Marino Broth 10%	_	+/- (15 jours) Formation	
	-	de filaments	
R2B 10%	-	-	
	_	+ (20 jours) Formation	
Lau de mer + glucose (Eguchi et al. 1996)	-	de filaments	
Sels eau de mer + 1% MB (1)	-	-	
Sels eau de mer + 8,75% MB (2)	+/- (9 jours)	+/- (9 jours)	

Tableau 7 : Les différents milieux de culture testés et les temps de croissance de chaque souche. Les signes + représentent l'intensité du trouble observé et les signes – représentent les milieux pour lesquels aucune croissance n'a pu être observée.



Figure 31 : Courbe de croissance à l'obscurité (ronds noirs reliés par une courbe noire) et à la lumière (ronds blancs reliés par une courbe en pointillés) de MOLA 455 sur l'eau de mer modifiée (2) (A) et détermination des taux maximaux de croissance à l'obscurité (losanges noirs) et à la lumière (losanges blancs) (B). Les équations des droites de régression des LN du nombre de cellules par ml obtenus en phase exponentielle de croissance y = 0,0166x + 14,735 (obscurité) et y = 0,0184x + 14,344 (lumière) ont permis de les déterminer.

Aucune différence n'a été observée entre les deux conditions testées ni en terme de biomasse ni en terme de taux de croissance maximal ni sur la phase de latence mais l'intensité de la lumière était très faible (44,82 μ mol de photons. m⁻². sec⁻¹). Les taux maximaux de croissance de MOLA 455 sur ce milieu de culture sont 0,0166 h⁻¹ soit 0,398 jour⁻¹ à l'obscurité contre 0,0184 h⁻¹ soit 0,4416 jour⁻¹ à la lumière (Figure 31B).

La couleur des colonies formées par MOLA 814 sur Marine Agar suggère la présence d'un pigment. MOLA 814, bien qu'entrainant des contraintes de température pour sa croissance a été plus facilement cultivable que MOLA 455. Une croissance avec une production de biomasse plus ou moins importante, selon les milieux de culture, a été observée sur plusieurs des milieux testés (Tableau 5). Deux courbes de croissance ont donc été réalisées à la lumière et à l'obscurité sur l'eau de mer additionnée de glucose comme seule source de carbone (Eguchi et al., 1996) et sur l'eau de mer modifiée (2) (Figure 32A et 33A).



Figure 32 : Courbe de croissance à l'obscurité (ronds noirs reliés par une courbe noire) et à la lumière (ronds blancs reliés par une courbe en pointillés) de MOLA 814 sur l'eau de mer d'Eguchi et al. (1996) (A) et détermination des taux maximaux de croissance à l'obscurité (losanges noirs) et à la lumière (losanges blancs) (B). Les équations des droites de régression des LN du nombre de cellules par ml obtenus en phase exponentielle de croissance y = 0,009x + 16,323 (obscurité) et y = 0,0088x + 16,69 (lumière) ont permis de les déterminer.



Figure 33 : Courbe de croissance à l'obscurité (ronds noirs reliés par une courbe noire) et à la lumière (ronds blancs reliés par une courbe en pointillés) de MOLA 814 sur l'eau de mer modifiée (2) (A) et détermination des taux maximaux de croissance à l'obscurité (losanges noirs) et à la lumière (losanges blancs) (B). Les équations des droites de régression des LN du nombre de cellules par ml obtenus en phase exponentielle de croissance y =0,018x + 16,316 (obscurité) et y = 0,0205x + 15,86 (lumière) ont permis de les déterminer.

Les courbes de croissance de MOLA 814 à l'obscurité et à la lumière n'ont pas montré de différence significative sur les deux milieux de culture testés à l'exception d'une abondance cellulaire légèrement plus importante à la lumière durant la phase stationnaire sur l'eau de mer modifiée (2) (Figure 32A et 33A). Les taux de croissance maximaux ont été beaucoup plus faibles sur le milieu de culture contenant uniquement du glucose comme source de carbone (Eguchi et al., 1996) avec des valeurs de 0,009 h⁻¹ soit 0,216 jour⁻¹ (obscurité) et 0,0088 h⁻¹ soit 0,2112 jour⁻¹ (lumière) contre 0,018 h⁻¹ soit 0,432 jour⁻¹ (obscurité) et 0,0205 h⁻¹ soit 0,492 jour⁻¹ (lumière) sur l'eau de mer modifiée (2) (Figure 32B et 33B). Sur ce dernier milieu de culture, bien que le milieu Marine Broth soit très dilué, les sources de carbone disponibles sont diverses et nombreuses, ce qui pourrait expliquer les différences observées sur les taux de croissance. Par contre la phase de latence a été plus longue avec de l'eau de mer modifiée (2).

Il faut donc environ 12 jours aux deux souches MOLA 455 et MOLA 814 pour atteindre la phase stationnaire. Ces courbes de croissance sont des tests préliminaires et il sera important une fois le milieu sélectionné de réaliser les courbes de croissance en batch mais dans la chambre interne des chémostats dans les mêmes conditions que les expériences en culture continue à réaliser (agitation, aération, température, lumière).

5. Conclusion

Dans ce chapitre, deux souches appartenant à la collection MOLA ont été sélectionnées après le criblage du gène codant pour la protéorhodopsine chez un grand nombre de souches afin d'évaluer leur potentiel phototrophe. Le séquençage complet de leur génome a permis de montrer qu'elles possédaient toutes les deux des protéorhodopsines vertes. Cependant ces deux souches sont issues d'environnements différents. MOLA 814 provient des eaux de surface de la mer de Beaufort qui est une partie de l'océan Arctique. Elle a été isolée à partir de prélèvements issus de la campagne MALINA (2009). Durant cette période, le site d'étude comportait une haute concentration de glace, la température moyenne était de 2,6 °C, la salinité de 26,3 et la concentration en carbone organique dissout (DOC) de 86,7 μ M (Ortega-Retuerta et al., 2013). MOLA 455 est issus de la mer Méditerranée pour laquelle la température et la salinité moyenne sont beaucoup plus importantes. Les intérêts d'étudier comparativement les rendements en carbone à l'obscurité et la lumière de ces deux

souches lors d'expériences de culture en continue sont: (1) d'élargir à des taxons écologiquement très significatifs l'hypothèse formulée suite aux expériences réalisées sur *P. angustum* S14, et (2) de savoir si des souches codant pour le même type de protéorhodopsine (verte) mais issues d'environnements marins différents réagissent à la lumière de la même façon ou pas lorsqu'elles sont cultivés dans un même milieu de culture. L'enjeu sous-jacent est d'obtenir des informations d'aspect qualitatif sur les rôles de la protéorhodopsine, sont-ils prédéfinis par la séquence et l'histoire environnementale de la souche bactérienne ? En d'autres termes, les avantages apportés par la présence de la protéorhodopsine sont-ils différents selon l'environnement dans lequel les PCPs évoluent ? Les conditions imposées en laboratoire dirigent-elles totalement les réponses à la lumière ? Des différents ?

CHAPITRE VI Discussions générales et perspectives

CHAPITRE VI : DISCUSSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

En raison de leur importance en terme d'abondance, de diversité taxonomique et de dispersion globale, les bactéries marines contenant la protéorhodopsine ont pris une place importante dans l'étude des microorganismes marins. Ce métabolisme photohétérotrophe leur permet d'utiliser le carbone organique disponible mais également la lumière comme source d'énergie. En théorie, cette compétence pourrait apporter à ces micro-organismes un avantage en matière de croissance et une meilleure compétitivité vis-à-vis des bactéries hétérotrophes strictes qui vivent souvent dans des environnements pauvres en nutriments. L'implication de ce large groupe de micro-organismes au sein des flux de carbone et d'énergie dans l'océan est de plus en plus considérée. Cependant, les rôles attribués à la protéorhodopsine sont toujours très controversés et à ce jour, une seule souche cultivable contenant la protéine a montré un avantage de croissance à la lumière par rapport à l'obscurité (Gómez-Consarnau et al. 2007). D'autres fonctions (Tableau 8) ont été attribuées à la protéorhodopsine (Walter et al. 2007; Lami et al. 2009; Gómez-Consarnau et al. 2010; Kimura et al. 2011; Steindler et al. 2011; Z. Wang et al. 2012; Feng et al. 2013; Akram et al. 2013) mais son rôle dans le métabolisme et l'efficacité d'utilisation du carbone, bien que sous-entendu dans les hypothèses émises dans la littérature, reste mal compris et a priori spécifique aux souches étudiées et aux conditions de culture.

Dans ce travail de thèse, nous avons essayé d'apporter des éléments de réponses au paradoxe des effets de la lumière sur l'efficacité d'utilisation du carbone d'une *Gammaproteobactérie* contenant la protéorhodopsine (*Photobacterium angustum* S14). La réponse attendue à cette question n'est pas seulement d'ordre physiologique mais elle a également une portée écologique. Toutefois, il n'était pas possible d'aborder cette question sans régler au préalable quelques difficultés méthodologiques puisque la mise en culture de ce type de bactéries induit souvent des conditions difficiles à maitriser en laboratoire. Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons mis au point une technique de culture continue permettant d'étudier, sur une échelle de temps plus importante, le comportement d'une population bactérienne stable en condition d'éclairement. Cette technique de culture, relativement ancienne, permet de s'affranchir des inconvénients des techniques de culture en systèmes fermés. La théorie des chémostats est classiquement régit par le modèle de Monod (Monod 1950). Ce modèle simple a été complété par d'autres paramètres primordiaux à

considérer dans la croissance bactérienne comme la maintenance énergétique (Pirt 1965). Après avoir déterminé les optimums de croissance de la souche bactérienne, nous l'avons cultivé dans des conditions mal adaptées à sa croissance afin de laisser émerger plus facilement les avantages que la lumière pourrait apporter à la population. Cette technique de culture couplée à l'analyse de paramètres évaluant l'utilisation du carbone (POC), l'expression du gène codant pour la protéorhodopsine (PCR quantitative) et l'abondance bactérienne (cytométrie en flux) doit favoriser l'étude du rôle de la protéorhodopsine dans l'utilisation du carbone disponible et des avantages qu'elles devraient apporter aux microorganismes.

Dans la deuxième partie de ces travaux, le modèle de Pirt (1975) a été associé aux résultats obtenus avec des populations microbiennes soumises à deux conditions de culture en chémostat engendrant des conditions de stress différentes (pH acide et pH neutre, forte et faible densité cellulaire). L'objectif était d'apporter de nouvelles connaissances sur le métabolisme photohétérotrophe en déterminant les rendements en carbone dans deux conditions expérimentales et en les comparant aux rendements théoriques obtenus en simulant le modèle de Pirt, tout en prenant en compte le taux de maintenance énergétique de la souche. Cette approche a donné de nouvelles informations quant aux effets de la lumière sur ces populations bactériennes. Estimer ce paramètre de maintenance est de toute évidence une étape essentielle pour mieux comprendre les stratégies de survie employées par les communautés bactériennes dans l'environnement naturel. Pour élargir ces nouvelles découvertes, d'autres souches de plus grande importance écologique (une SAR92 et une *Betaprotéobactérie*) ont été sélectionnées et testées préliminairement pour de futures expériences en culture continues.

Dans ce contexte écologique, l'objectif de cette discussion est de montrer les éléments de réponses que ce travail de thèse apporte à ces problématiques. Le fil conducteur de cette discussion sera construit autour des deux questions formulées dans ce manuscrit : (1) De nouvelles connaissances sur le métabolisme photohétérotrophe peuvent-elles émerger grâce à une approche méthodologique originale ? (2) Quelles conditions environnementales régulent le comportement phototrophes des PCPs ?

Date	Auteurs	Souche	Lumière	Source de carbone Milieu de culture	Résultats principaux
2000	Béjà et al.	Gammaprotéobactérie non cultivée (SAR 86)	Jaune		Découverte de la PR Mise en évidence de la translocation de protons par un suivi de pH
2001	Béjà et al.	Communautés des eaux de surface de la baie de Monterey, de l'Antarctique, de la station HOT et SAR 86			0,35 g PR par litre d'eau de mer 2,4.10 ⁴ molécules de PR par cellule de SAR 86 Rôle <i>in situ</i> de la PR significatif Deux heres de PR : los PR blouce (400m) en prefendeur et les PR vortes (525m) en surface
2002	Eriedrich et al	Hôte E coli			Båle crucial de l'acide aminé Ass 97 dans la direction du transport de protons
2002	Dioumaev et al.	Hôte E. coli			L'Accepteur et le donneur de protons sont l'Asp 97 et le Glu 108 respectivement
2003	Man et al.	Hôte <i>E. coli</i> Communautés de la mer Méditerranée et de la mer Rouge			Deux formes de PR : une alcaline pour laquelle l'Asp 97 n'est pas protonnée une acide pour laquelle l'Asp 97 n'est pas protonnée Le résidu d'aa à la position 105 est responsable du tunning spectral
2003	de la Torre et al.	Communautés de la baie de Montery Communautés de l'Antarctique Communautés du Pacifique Nord			Haute conservation du gène Ubiquité et abondance du gène Présent dans une variété de divers taxa bactériens marins dont les <i>Alpha</i> et les <i>Bétaprotéobactéries</i>
2004	Bielawski et al.	75 séquences de PR provenant de: Pacifique Nord Centre et Est, Océans du Sud, Mer Méditerranée Mer Rouge			Adaptation à différentes intensités de lumière dans l'environnement marin par un processus d'évolution Darwinienne Les propriétés de sensibilité à la lumière des PR dérivent d'un attachement covalent du rétinal à une lysine (232)
2004	Venter et al.	Séquençage Shotgun mer de Sargasse			743 séquence de type PR et 1164 séquence d'ARNr ont été détectés. Plus de 782 nouveaux photorecepteurs de types rhodopsines ont été identifiés
2005	Giovannoni et al.	SAR 11 HTCC1062	14 h lumière à 24, 250 et 680 μE + 10 h obscurité	LNHM + 1 µM rétine Eau de mer filtrée (large de Newport, Oregon)	Aucune différence dans le taux de croissance ou le rendement cellulaire de cultures qui avaient crû à la lumière ou à l'obscurité
2006	Frigaard et al.	Échantillons eau de mer au nord de Oahu, Hawaii	To H obsculle	(large de Newport, Oregon)	Transfert latéral du gène probable entre bactéries planctoniques et Euryarchaota
2006	Jiao et al.				Rappel sur la classification des rhodopsines et la découverte de la PR Distribution naturelle et diversité génétique de la PR dans la mer
2007	Martinez et al.	Banque fosmide HOT_10m (ALOHA station, Océan d'Hawaii) Hôte <i>E. coli</i>	500-650 µE	Agar LB + L-arabinose (0,02%)	Expression hétérologue de six gènes seulement qui génère un photosystème PR complètement fonctionnel engendrant une photophosphorylation chez des <i>E.coli</i> recombinant exposé à la lumière L'illumination des cellules PR+ génère une pmf qui conduit à la synthèse d'ATP cellulaire
2007	Gómez-Consarnau et al.	Flavobactéries (<i>Dokdonia sp.</i> MED134, <i>Polaribacter sp.</i> MED 152 <i>L. blandensis</i> MED217)	180 µE	Eau de mer du Nord mélangée à de l'eau de mer vieillie de l' Atlantique Nord ASW + peptone + extrait de levure	Croissance de <i>Dokdonia sp.</i> MED134 stimulée par la lumière verte > bleue > rouge Surexpression des ARNm de <i>Dokdonia sp.</i> MED134 à la lumière
2007	Walter et al.	Hôte <i>E. coli</i> avec PR d'une SAR 86	lumière rouge 0,09 mW/cm ²	LB et TB + kanamycine	L'illumination de ces cellules crée une pmf qui fait fonctionner le moteur flagellaire. Si la lumière est coupée, les cellules PR+ ralentissent considérablement allant parfois jusqu'à un arrêt total.
2007	Stingl et al.	SAR 92	12 h lumière à 140 μE 12 h obscurité	LNHM	La lumière n'améliore ni le rendement de croissance ni le taux de croissance de la souche testée Hypothèse : Bien qu'aucun supplément de carbone n'a été ajouté dans le milieu, les cellules ont déjà crû à leur µ _{max} et donc l'effet de la PR n'est pas visible
2007	Sabehi et al.	Communautés de la mer de Sargasse Communautés de la mer Méditerranée			En mer Méditerranée, les pigments verts ont été retrouvés à la surface et le pourcentage des bleus augmente avec la profondeur En mer de Sargasse, toutes les PRs étaient bleues Présence également d'un pattern saisonnier
2007	McCarren et al.	16 fragments de génomes contenant la PR			Coévolution et transfert latéral du gène probable
2008	Atamna-Ismaeel et al.	Echantillons naturels			PR existe dans différents environnements aquatiques distincts allant des lacs d'eau claire aux tourbières et à la mer Baltique Ces gènes sont dispersés mondialement et peuvent codés pour des capacités fonctionnelles uniques capable de compétition positive dans une large gamme d'environnements d'eau douce
2008	Béjà & Suzuki	SAR 86 et SAR 11			Maximum d'expression de la PR de SAR86 en profondeur Variation de l'expression PR de SAR11 en fonction de la profondeur et le cycle jour- nuit.
2009	Lami et al.	Communautés des eaux cotières du Delaware SAR 11, Flavobactéries	830 μE Lumière continue Cycles 12 h-12 h	Eau de mer	Forte surexpression du gène de la PR à une exposition lumineuse chez les deux populations bactériennes, plus marquée en cycle Corrélation avec l'abondance du gène, ce qui indique une nette croissance des deux souches étudiées dans cette condition

 Tableau 8 : Tableau récapitulatif des études réalisées en lien avec la protéorhodopsine.



Date	Auteurs	Souche	Lumière	Source de carbone Milieu de culture	Résultats principaux
		Echantillon mer Chukchi			L'abondance de la PR diminue en hiver
2009	Cottrell & Kirchman	Echantillon mer de Beaufort			Pas de shift de communautés hiver/été
2000		Eté et hiver			Gènes trouvés en Arctique sont différents de ceux trouvés à des latitudes plus basses
					Les PCPs sont de bons compétiteurs avec les hétérotrophes stricts en hiver mais ils ne sont pas "meilleurs" en été
		Vibrio sp. AND4	133 - 150 µE	Zobell (peptone et	La PR peut augmenter la survie durant des périodes de famine en eau de mer. Ceci est la conséquence directe d'acquérir de
2010	Gomez-Consarnau et al.	Hote E. coli	Continue ou cycles 16h -8h	extrait de levure)	l'energie lumineuse captee potentiellement par la PR
		Communautés de la mer Poss		Eau de mer Skagerrak	Utilisation d'un mutant knowckout de PK
2010	Koh et al	(Antarctique)			Les sequences on cle generes à partir de cendies metaboliquement actives et suggerent que le gene de la Fix est fonctionner
2010	rion et al.	(/ marcaque)			PR hleus et vertes ont été détectées
		Échantillons du Pacifique			Comparaison de séquences avec la GDDP (Global Distribution Database of Proteorhodopsin)
2010	Wei et al.	Échantillons de l'Atlantique			Les microorganismes contenant la PR peuvent être groupés en deux types : généralisés et spécifiques du lieu
		Échantillons de l'Océan Indien			La communauté PR se regroupe selon la situation géographique et non selon la profondeur
					Schéma du circuit énergétique potentiel de la PR
2010	DeLong & Béjà				Bénéfice de la PR : produire de l'ATP à partir d'un gradient de protons généré par la lumière, mobilité flagellaire, transport de
					solutés à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule peut être fait par la pmf
				ASW filtrée + peptone ou	Le photosystème global PR de cette bactérie est surexprimé en présence de lumière
2011	Kimura et al.	Flavobactérie Dokdonia sp. MED134	150 µE	extrait de levure	Surexpression de certains genes codant pour des transporteurs
				DOC : 0,14 ou 0,39 mM de C	induction de genes codant pour des voies metaboliques comme la glycolyse, le cycle du Phosphate et le cycle de Krebbs
					la lumière a causé des changements importants dans la physiologie et l'expression du gène de Candidetus P ubique qui cont
		Candidatus Pelacihacter ubique	250-300 UE (respiration) cycles	ASW filtrée + pyruvate	Les names en carbone en ais fournit neu ou nas d'avantance dans la phase active de croissence sur des eubertet de carbone organique
2011	Steindler et al	(SAR 11)	70 UE (mesure ATP) shift 5 min	ovaloacétate taurine betaine	la PR everce son impact seulement dans des conditions de limitation en carbone
2011	otenidier et di.	(0/1(11)	80 µE (assimilation sucres)	glycine, méthionine	PR aurait donc une fonction et un rôle dans la résistance aux stress largement commun aux océans limités en carbone
				3.)	
					Surexpression du gène de la PR en présence de lumière et photophosphorylation conduit par la PR dans les cellules sauvages
2012	Wang et al.	Vibrio Campbellii	42 µE	milieu ATCC	qui résulte en l'amélioration de la survie cellulaire durant le stress respiratoire
		Echantillons des Andes			Similarité des séquences étudiées avec les séquences de PR marines et des eaux douces
2012	Bohorquez et al.	(zone chaude et acide)			Contiennent des résidus indicatifs d'une activité de pompe à protons et de protéines qui absorbent la lumière verte
		Éspantillana des lass Mandata			PR pourrait contribuer au metabolisme cellulaire dans ces nabitats
2012	Martinez-Garcia et al.	Demaricacetta, Sparkling, trout Pag			Au moins 10-23% du bacteriopialición de aux douces sont des priotoineterorrophies parmi resqueis les PCP sont la fraction dominante
		Damanscotta, Sparking, trout bog			les APS dagnent plus d'énergie par la phototrophie que le font les bactéries à PR
					Les bactéries à PR ont besoins d'un haut nombre de molécules de PR par cellule et d'une forte intensité de lumière (>700µE) pour
2012	Kirchman				que l'énergie fournit dépasse le cout de « maintenance »
					Le gène de la PR est ubiquiste et abondant probablement parce que seulement deux gènes sont nécessaires pour cette forme de
					phototrophie
		Polaribacter sp. MED152 (PR+),			Les bactéroidetes contenant la PR partagent deux caractéristiques : un petit génome et un grand nombre de gènes impliqués dans
		Dokdonia sp. MED134 (PR+),			la fixation du CO2
2013	Fernandez-Gomez et al.	L. blandensis MED217 (PR-),			Il n' y a pas de differences significative dans le nombre de domaines sensibles à la lumière entre les PR+ et les PR- mais differents
		G. TOPSETII KT0803 (PR-)			partern emmergent
					Diminution du pH externe lors d'une exosition lumineuse
				MB avec sels : 17.5: 35:	L'abondance bactérienne est directement influencée par la salinité et par l'exposition lumineuse
2013	Feng et al.	Psychroflexus torquis	3,7 et 27,7 µE	52.5 et 70 g/l	L'expression du gène codant pour la PR est pas influencée ni par la lumière ni par la concentration en sels
				, , , , , , , j	Conclusion : La lumière fournit une source d'énergie pour les PCP dans des conditions de stress autre que la famine
				Zobell (peptone et extrait	L'expression du gène montre un pic à l'intersection de la phase exponentielle avec la phase stationnaire de croissance
2013	Akram et al.	Vibrio sp. AND4	157 µE	de levure)	La phototrophie apporte un avantage de survie aux cellules en phase stationnaire de croissance seulement (expliqué par la
				Zobtel dilué 1X, 30X et 100X	surexpression juste avant cette phase)
					La souche exprime les gènes codant pour la PR et pour une xanthorhodopsine
				MB pur ou dilué (concentration	Imise en evidence d'une translocation de protons induit par la lumière mais pas d'avantage de croissance
2013	Riedel et al.	Dokdonia sp. PRO95	95 µE cycle naturel	de seis conserves)	myportiese : le contexte genomique des differentes bacteries pourrait avoir un role important dans la définition des consequences
				Eau de mer artificielle ± 0.14 mM de C	prissionogiques de la priodorioprité par la PK. Las conditions de strass ou de famine pourgient être nécessaires pour observer les effets physiologiques de l'acquisition d'énergie
				+ 0, 14 min de C	Les conditions de areas ou de familie pour alem energies pour observer les eners physiologiques de l'acquisition d'energie induite par la lumière
		Echantillons des eaux cotières			L'expression du géne codant pour la PR des SAR 11 était 2.5 fois plus haute la journée mais le gène codant pour l'ARNr 16S restait
0040	Lami & Kirchman	du Delaware			constant. DONC : la croissance n'est pas affectée par la lumière du soleil
2013	(Submitted)	printemps/été/automne			Hypothèse : la lumière affecte l'expression du gène de la PR mais il n'y a pas assez d'énergie fournit pour avantager la croissance
	. ,	SAR 11			bactérienne dans les eaux marines

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des études réalisées en lien avec la protéorhodopsine.



1. De nouvelles connaissances sur le métabolisme photohétérotrophe peuvent-elles émerger grâce à une approche méthodologique originale ?

Nos résultats semblent confirmer de nombreuses autres études sur les PCPs (Giovannoni et al. 2005; Stingl et al. 2007; Steindler et al. 2011; Riedel et al. 2013) pour lesquelles les courbes de croissance (biomasse et taux de croissance) en batch et en milieu riche, à la lumière et à l'obscurité, n'ont pas montré de différence significative. Malgré cela, il est pourtant évident que la protéorhodopsine est active à la lumière. Cette activité se traduit essentiellement par une translocation de protons à la lumière ou la surexpression du gène codant pour la protéine (Giovannoni et al. 2005; Stingl et al. 2007; Riedel et al. 2013). Il est bien établit que le carbone fourni à la bactérie lui permet de produire de la biomasse. Les résultats obtenus ici et ceux décrit dans la littérature montrent que malgré la présence d'une source d'énergie supplémentaire et utilisable (la lumière) par la bactérie, la biomasse finale n'est pas plus importante. La technique de culture utilisée et/ou les conditions de croissance testées ne semblent toutefois pas être adaptées pour renseigner sur la fonction de la protéorhodopsine durant son activité. En effet, dans un milieu pauvre et en période de famine importante, lors de la phase stationnaire de croissance, la survie de Vibrio sp. AND4 a été largement avantagée par la lumière. L'abondance cellulaire s'est révélée être bien plus forte qu'à l'obscurité alors qu'en milieu riche, aucune différence de densité optique n'a été observée (Akram et al. 2013). Durant le processus de croissance, une bactérie passe par de nombreux états physiologiques différents. Il est difficile, sinon impossible, de s'affranchir de ces effets lors de culture en système fermé et de savoir si le résultat observé est dû au paramètre modifié ou à l'état physiologique dans lequel se trouve la bactérie. La culture continue est une technique très performante pour réaliser des études physiologiques. Elle permet de maintenir l'ensemble des paramètres physico-chimiques constants et de contrôler les variations physiologiques de la souche en stabilisant la densité de la population bactérienne. La limitation en substrat est imposée non plus en phase stationnaire de croissance seule mais lors d'une « phase active et durable de croissance ». Si les expériences réalisées par Akram et al. (2013) avaient été effectuées en « phase active et durable de croissance » dans des chemostats fortement limités en carbone, les résultats obtenus auraient-ils été différents ? Ou est-ce que réellement les effets de la lumière ne sont visibles que dans cet état physiologique? Lors d'une étude sur des SAR92 contenant la

protéorhodopsine, des cultures en batch et à la lumière ont été réalisées (Stingl et al. 2007), mais aucun avantage de croissance n'a, une fois de plus, pû être démontré. L'hypothèse que les cellules atteignent rapidement leur taux maximal de croissance, masquant les effets possibles de la protéorhodopsine sur la croissance à la lumière a été formulée par les auteurs (Tableau 8). Une même expérience réalisée en culture continue aurait pû révéler des résultats différents et modifier l'hypothèse formulée par Stingl et al. (2007) puisque à l'inverse des cultures en système fermé, en culture continue, **le taux de croissance est imposé à la population bactérienne**. En effet, cette technique de culture permet de conserver un taux de croissance choisi tout au long de l'expérience grâce à un taux de dilution stable et continu dans la chambre interne du chémostat.

D'après les résultats obtenus par Akram (2013) et par Steindler (2011) les effets de la lumière sur la survie des populations bactériennes sont avantageux et uniquement visibles en phase stationnaire de croissance, ce qui signifie en période de carence nutritive et en présence d'une importante densité bactérienne. Il nous a semblé nécéssaire, avant d'initier des expériences cherchant à comprendre le rôle de la protéorhodospine, de déterminer les optimums de croissance de la souche d'intérêt afin de mieux induire une carence nutritive. La croissance de P. angustum S14 sur un milieu riche et la détermination de la concentration idéale en substrat (à l'obscurité et à la lumière) ont permis de révéler un taux maximal de croissance (0,46 h⁻¹ avec 500 mg.l⁻¹ de glucose) qui n'était pas modifié par la présence d'une source de lumière. Cette information permet de savoir que les effets observés, lors des expérimentations en chémostats, sont dus à une modification physiologique et non à un changement du taux de croissance. Les premières expériences en chémostats limitaient la souche en carbone et le milieu de culture utilisé contenait du nitrate, une source d'azote difficilement assimilable (Berges et al. 2001). Les résultats ont montré une augmentation de l'abondance bactérienne après un court temps d'exposition à une lumière de forte et de moyenne intensité. En utilisant par la suite un milieu contenant de l'ammonium (Eguchi et al. 1996), une source d'azote plus facilement assimilable par la bactérie, l'effet avantageux sur l'abondance bactérienne à la lumière n'a plus été observé. Ces résultats suggèrent qu'imposer une carence en carbone à la population microbienne semble être un paramètre primordial mais insuffisant pour observer une amélioration dans le rendement de croissance. C'est probablement la raison pour laquelle les études réalisées sur des cultures de Dokdonia sp. PRO95 dans une eau de mer artificielle pauvre en nutriments (Riedel et al. 2013) et des

cultures de *Vibrio campbellii* dans un milieu minimum (Wang et al. 2012) n'ont pas montré d'avantage de croissance à la lumière par rapport à l'obscurité.

L'utilisation de la culture continue a donc permis de démontrer les avantages potentiels de la photohétérotrophie en phase active de croissance, ce qui n'avait pas été le cas avec les techniques utilisées jusqu'à ce jour, à l'exception de la souche *Dokdonia sp.* MED 134 (Gómez-Consarnau et al. 2007; Kimura et al. 2011). Utiliser cet outil semble être une voie intéressante pour percer les énigmes persistant sur le rôle, les fonctions et la place que prennent les micro-organismes possédant la protéorhodopsine dans l'environnement naturel et en particulier dans les flux de carbone et d'énergie. Il semblerait qu'en utilisant une approche expérimentale différente (Figure 33), la capacité phototrophe des PCPs pourrait être étudiée plus facilement. Elle permettrait d'apporter des informations supplémentaires et plus réalistes sur les avantages que ce groupe de micro-organismes possède en présence de lumière.

2. Quelles conditions environnementales régulent le comportement phototrophe des PCPs ?

Comme le souligne Feng et al. (2013) dans son étude, le stress par carence nutritive n'est pas le seul moyen d'étudier le rôle de la protéorhodopsine et de déterminer quels sont les effets de la lumière sur les PCPs. En effet, des cellules de *Psychroflexus torquis* répondent plus intensément à la lumière sous pression osmotique. Ces résultats et ceux obtenus lors de ce travail de thèse suggèrent qu'il est important d'étudier l'importance et les effets conjugués des conditions et de l'environnement de culture pour mieux comprendre l'activité et le rôle de la protéorhodopsine. D'un point de vue plus écologique, les conditions environnementales dirigent-elles le comportement phototrophe des PCPs ?

Dans les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse, le rendement en carbone était plus important lorsque la croissance bactérienne était seulement limitée par le carbone. Mais ce rendement n'a pas été augmenté en présence de lumière. Par contre, dès qu'un stress pH a été ajouté, les cycles lumière-obscurité ont induit une forte augmentation du rendement en carbone par rapport au rendement obtenu à l'obscurité totale et continue. Cette observation permet de confirmer l'hypothèse formulée par Feng et al. (2013). Une carence nutritive seule ne permet pas de révéler les effets positifs de la lumière. La bascule métabolique *via* un métabolisme phototrophe pourrait être induite en cultivant la souche dans des conditions

cumulant au moins deux stress (limitation en carbone et pH défavorable ou limitation en carbone et stress osmotique par exemple). Dans de telles conditions de culture, les souches étudiées par Giovannoni et al. (2005) ou encore par Stingl et al. (2007) auraient peut être laissé apparaître plus aisément leur potentiel phototrophe en terme de rendement.



Figure 34 : Proposition de protocole expérimental pour évaluer les rendements en carbone d'une souche bactérienne cultivable contenant la protéorhodopsine.

De plus, la technique de culture continue permettant de maintenir la population de P. angustum S14 en état de quasi-équilibre et le modèle de Pirt ont permis de « quantifier » cet état de stress en déterminant pour la première fois le taux de maintenance énergétique. Lorsque la souche est dans une situation nécessitant une grande part d'énergie pour survivre, appliquer une source lumineuse lui permet de réduire considérablement son taux de maintenance et également d'améliorer son rendement en carbone pendant le période de cycles lumière-obscurité par rapport à l'obscurité totale et ceci également durant les 12 heures de lumière au sein même des cycles. Finalement, la capacité phototrophe d'une souche semble être utile dans des moments très défavorables à la croissance bactérienne. Ce métabolisme paraît être davantage régulé par la balance énergétique que par les concentrations en carbone organique. L'hypothèse que la phototrophie ne fournirait pas assez d'énergie pour assurer la maintenance énergétique des PCPs a été récemment formulée (Kirchman & Hanson 2013). Les résultats obtenus ici semblent suggérer le contraire. Bien que la phototrophie fournisse un bénéfice énergétique 30 fois plus faible aux PCPs qu'à leurs homologues photohétrotrophes, les PAAs (Kirchman & Hanson 2013), nos résultats montrent que l'énergie synthétisée via la protéorhodopsine permet à la cellule d'améliorer son rendement en carbone en réduisant considérablement les coûts de maintenance en présence de lumière et dans les conditions de stress testées. Finalement, l'hypothèse la plus probable serait que le budget énergétique nécessaire au fonctionement de la protéorhodopsine soit trop important dans les conditions de culture testées jusqu'ici en laboratoire, et non que l'énergie fournit par la phototrophie via la protéorhodopsine est trop faible pour apporter des avantages de croissance.

Dans un contexte plus écologique, il est également intéressant de se demander si en milieu naturel les PCPs sont suffisamment « stressés » pour utiliser et tirer avantage de leur capacité phototrophe. En dehors de la limitation par le carbone présente dans de nombreuses régions océaniques, les PCPs sont confrontés à la présence des autres groupes microbiens et particulièrement aux hétérotrophes strictes. Si nous considérons que la compétition est une source de stress supplémentaire, il est probable que dans l'environnement, l'activité de la protéorhodopsine soit un avantage de survie mais également énergétique non négligeable. Lami et al. (2013, *submitted*) partage l'opinion de Kirchman & Hanson (2013) et avance l'hypothèse que la lumière affecte l'expression du gène codant pour la protéorhodopsine de la communauté de SAR 11 étudiée mais que l'énergie fournit est insuffisante pour avantager la croissance bactérienne dans les eaux marines. Cette étude a été menée en utilisant la

technique de PCRq sur divers échantillons environnementaux issus des eaux côtières du Delaware. Afin de confirmer cette hypothèse, des études de cultures continues dans l'eau de mer environnante contenant les communautés naturelles devraient être réalisées. Ce type d'expérience permettrait de comprendre pourquoi ces micro-organismes surexpriment le gène codant pour la protéorhodopsine à la lumière. L'expression plus intense d'un gène dans une condition (lumière) par rapport à une autre (obscurité) n'est probablement pas le fait du hasard et les micro-organismes y trouvent inévitablement un intérêt. Lami et al. (2009) suggèrent également que les PCPs expriment le gène codant pour la protéorhodopsine différemment selon les conditions environnementales et probablement selon leur statut physiologique et la disponibilité des nutriments. Bien que les résultats et les hypothèses avancées par ces études semblent défendre l'incapacité des PCPs à améliorer leur croissance en milieu naturel grâce à leur capacité phototrophe, les résultats obtenus durant ce travail de thèse suggèrent plutôt qu'ils l'utilisent et en tirent un avantage dans certaines conditions. Le taux de maintenance in situ n'est un paramètre mesurable actuellement mais prendre en compte l'ensemble des paramètres physico-chimiques caractérisant l'environnement des communautés étudiées permettrait d'appréhender une part des stress auxquels les microorganismes doivent faire face. Comparer différents écosystèmes marins, leurs communautés bactériennes et estimer par la suite les taux de maintenance énergétique par des expérimentations en chémostats permettrait peut-être de répondre plus précisément à cette problématique. Cela permettrait finalement de savoir si les conditions dans lesquelles évoluent les communautés sont à l'origine de l'utilisation par les PCPs de leur capacité phototrophe en parallèle de leur métabolisme hétérotrophe.

3. Perspectives

L'intérêt pour le métabolisme photohétérotrophe dans les écosystèmes marins a considérablement augmenté depuis une quinzaine d'années, date à laquelle la présence de photo-protéines chez les bactéries a été détectée (Béjà et al. 2000). Cependant, les énigmes et les incompréhensions concernant les avantages d'un tel métabolisme et le rôle de la protéorhodopsine dans les flux de carbone et d'énergie persistent. Les résultats obtenus en laboratoire demeurent variés et controversés. Le rôle de la protéorhodopsine semble être souche et milieu dépendants. Bien que nous apportons un élément clé à la compréhension du métabolisme photohétérotrophe dans ce travail et des informations importantes sur les effets

de la lumière sur le métabolisme du carbone des bactéries marines contenant la protéorhodopsine, de nombreuses voies restent encore à explorer :

1. La priorité serait de réaliser exactement les mêmes expériences en cultures continues que celles précédemment effectuées (Chapitre IV) mais cette fois avec un mutant de *P. angustum* S14 knock-out protéorhodopsine ΔPr . Si le mutant ne montre pas les mêmes avantages que ceux constatés chez la souche sauvage, ceci permettrait de confirmer l'effet positif de la protéorhodopsine.

2. Utiliser une source de carbone plus complexe et impliquant l'intervention de transporteurs pourrait apporter des éléments de réponses quant aux conditions de stress nécessaires pour révéler les avantages de la capacité phototrophe des PCPs. En effet, si le carbone est limitant et oblige la souche bactérienne à dépenser une part d'énergie importante pour produire sa biomasse à cause des difficultés à assimiler le sucre, la lumière pourrait certainement avantager les micro-organismes photohétérotrophes sans qu'un autre stress physico-chimique, comme une acidification du milieu ou une importante salinité, soit ajouté.

3. Réaliser des expériences en culture continue avec *P. angustum* S14 et une souche hétérotrophe stricte mettrait les deux micro-organismes en compétition pour la source de carbone disponible. La lumière apporterait certainement un avantage pour la survie et le maintien de *P. angustum* S14. Elle pourrait nécessiter de moins de carbone avec la source d'énergie supplémentaire qu'elle seule serait capable d'utiliser. Cette approche permettrait de tester l'hypothèse du « stress par la compétition » discutée plus haut.

4. Une voie qui n'a pas été explorée au cours de ces travaux de thèse est d'utiliser des méthodes de protéomique et de métagénomique. Ces approches permettraient d'apporter de nouvelles informations sur le métabolisme photohétérotrophe en analysant les autres gènes potentiellement impliqués dans le fonctionnement de la protéorhodopsine et de déterminer dans quelle proportion la protéine est surexprimée à la lumière. Cibler d'autres protéines candidates qui pourraient être associées apporterait également un aperçu plus large sur la voie phototrophe conduite par la protéorhodopsine. Cette approche semble être très intéressante puisque il a été admis que les analyses de transcriptomique n'étaient pas le reflet exact des analyses de protéomique (Hegde et al. 2003). Des prélèvements réguliers sur des cultures en

chémostats dans des phases d'obscurité et de lumière permettraient une analyse différentielle au niveau des gènes et des protéines.

5. Finalement, après les tests préliminaires de croissance réalisés sur deux souches photohétérotrophes contenant la protéorhodopsine (Chapitre V), il serait intéressant de réaliser des expériences en chémostats avec et sans stress supplémentaire à celui de la limitation en carbone. L'intérêt de ces expériences serait d'élargir à des groupes taxonomiques écologiquement significatifs l'hypothèse émise suite aux résultats obtenus avec *P. angustum* S14. Les courbes de croissance devront avant tout être de nouveau réalisées dans la chambre interne des photobioréacteurs dans les conditions de lumière, agitation, aération, température identiques à celles qui seront utilisées pour les expériences de culture continue. Cela permettra de s'assurer que la lumière n'affecte pas le taux de croissance et de conclure, après les expériences en chémostats, à un changement dans le rendement en carbone et non à un changement du taux de croissance.

ANNEXES

Annexe A : La loi de Contois (Chapitre II)

Annexe B : La loi d'Haldane (Chapitre II)

Annexe C : Effet de la lumière sur le métabolisme du carbone et sur l'abondance bactérienne d'une population de *P. angustum* S14 avec une exposition lumineuse continue de 406 μ E (Chapitre III).

Annexe D : Effet de la lumière sur le métabolisme du carbone et sur la densité optique d'une population de *P. angustum* S14 avec une exposition lumineuse en cycle 12h-12h (406 μ E) lors d'un ajustement de pH par une solution de soude (Chapitre IV).

Annexe E : Vérification de l'état de quasi-équilibre dans les chémostats (Chapitre IV).
Annexe A : LA LOI DE CONTOIS (1959)

Dans son article « Kinetics of bacterial growth : relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures » Contois (1959) montre, par une série d'expériences en culture continue de *Aerobacter aerogenes*, que le taux spécifique de croissance μ ne dépend pas que de la concentration en substrat limitant S mais aussi de la densité de population **P**. Plus la densité de la population augmente, plus l'accès au substrat est limité. La croissance est alors ralentie et le taux de croissance diminue (Figure a).



Figure a : Relation entre le taux spécifique de croissance et la densité de la population d'une culture en continue d' Aerobacter aerogenes à l'équilibre en limitation de carbone (ronds noirs) et en limitation d'azote (ronds blancs) (Contois, 1959).

Le modèle de Contois est donc dérivé comme suit :

$$\mu(\mathbf{S},\mathbf{P}) = \frac{\mu_{\max}\mathbf{S}}{\mathbf{K}\mathbf{P} + \mathbf{S}}$$

 $O\dot{u}$: μ_{max} et K sont des paramètres de croissance constants dans des conditions définies.

Dans le modèle de Monod l'affinité Ks est constante. Contois explique que cette affinité devrait dépendre de la densité de la population : Ks=Ks (P) et il propose la dépendance la plus simple. Une relation linéaire Ks (P) = KP. Donc K est homogène à un rapport de concentration.

La fonction de croissance spécifique est aussi un cas de ratio-dépendance car on peut l'écrire comme fonction du ratio S/P :

$$\left(\frac{\mathbf{S}}{\mathbf{P}}\right) = \frac{\mu_{\max}}{\mathbf{K}\left(\frac{\mathbf{S}}{\mathbf{P}}\right)^{-1} + 1} = \frac{\mu_{\max}\left(\frac{\mathbf{S}}{\mathbf{P}}\right)}{\mathbf{K} + \left(\frac{\mathbf{S}}{\mathbf{P}}\right)}$$

Le graphique reliant les points de $1/\mu$ en fonction des ratios $\frac{P_e}{S_e}$ (la densité de population à l'équilibre *vs* la concentration de substrat limitant à l'équilibre) atteste de cette relation (Figure b).



Figure b : Relation entre les réciproques des taux spécifiques de croissance $(1/\mu)$ et les ratios de la densité de population et de la concentration du substrat limitant ${P_e}/{S_e}$ (Glucose pour les ronds noirs et ammonium pour les ronds blancs) de cultures en continue d'Aerobacter aerogenes à l'équilibre (Contois, 1959).

Annexe B : LA LOI D'HALDANE (1968)

Le modèle classique de Monod ne peut pas être valide pour certains substrats avec lesquels la croissance est limitée à faible concentration et du fait qu'ils sont inhibiteurs pour l'organisme à haute concentration. Dans son article « A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates », Andrews (1968) propose un nouveau modèle dont la particularité est d'utiliser une fonction d'inhibition relative à la concentration en substrat et au taux spécifique de croissance (Haldane, 1930). Cette fonction d'inhibition peut s'exprimer comme suit (Figure c) :

$$\mu \left(\mathbf{S} \right) = \frac{\mu_{\max} \, \mathbf{S}}{\mathbf{K}\mathbf{s} + \mathbf{S} + \frac{\mathbf{S}^2}{\mathbf{K}_i}}$$

Où :

- μ est le taux spécifique de croissance,
- μ_{max} est le taux maximal de croissance en absence d'inhibition,
- S est la concentration en substrat limitant,
- Ks est la constante d'affinité
- K_i est la constante d'inhibition, numériquement égale à la concentration de substrat la plus haute pour laquelle le taux de croissance spécifique (μ) est égale à la moitié du taux maximal de croissance en absence d'inhibition (μ_{max}).

La vitesse de croissance chute pour les grandes concentrations de substrat. De plus, plusieurs équilibres sont possibles et il y a par conséquent des instabilités (Figure d).

Bien que ce modèle soit plus fréquemment utilisé dans l'industrie pour le traitement de certains déchets industriels par exemple, il peut être utilisé dans certaines expériences plus fondamentales puisque même le glucose peut inhiber la croissance si il est présent à des concentrations suffisamment hautes.



Figure c : Représentation de la fonction d'inhibition d'Haldane (en rouge) par rapport au modèle de Monod (en bleu).



Figure d : Représentation de courbe de croissance selon la fonction d'inhibition d'Haladane (courbe rouge) selon le taux de dilution D choisi (ligne bleue). Les points d'équilibres sont entourés d'un cercle vert.

<u>Annexe C</u> : Effet de la lumière sur le métabolisme du carbone et sur l'abondance bactérienne d'une population de *P. angustum* S14 avec une exposition lumineuse continue de 406 µE.

Après les expériences réalisées avec une eau de mer artificielle additionnée de glucose (3mM) peu appropriée à la croissance bactérienne (Berges et al., 2001) des duplicats de cycles en chémostat ont été réalisés avec une eau de mer plus adaptée (Eguchi et al., 1996). Des mesures de densité cellulaire (OD_{620nm}) et de POC ont été effectuées à l'obscurité (pour le POC, seulement une fois que la population était stabilisée) et comparées à celles effectuées durant la période d'exposition lumineuse. L'état stationnaire est obtenu au bout de 80 heures (près de 8 renouvellements en milieu de culture de la chambre interne du chémostat). Ni la densité cellulaire ni la concentration en POC n'ont montrées d'augmentation significative en période d'exposition à la lumière. La densité optique est restée stable tout au long du cycle et l'efficacité d'utilisation du carbone n'a pas été améliorée dans ces conditions expérimentales, il semblerait même que la lumière ait eu un effet négatif sur elle pour l'un des deux répliqua (Figure e).



Figure e : Evolution de la densité optique (OD_{620nm}) , et du POC $(\mu g.ml^{-1})$ en fonction du temps lors d'une exposition à une intensité de lumière moyenne (406 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 115 heures. Les losanges blancs et noirs représentent les points de densité optique pour les réplicat 1 et 2 respectivement, les ronds blancs et noirs, les mesures de POC pour les réplicat 1 et 2 respectivement.

L'évolution du pH au cours du cycle expérimental (Figure f) se stabilise durant la période à l'obscurité après une forte acidification due à la croissance cellulaire. Cependant il reste acide malgré un milieu de culture tamponné. Cela est probablement dû à la forte concentration cellulaire dans la culture. Après une courte période d'illumination, le pH a légèrement baissé (\sim -0,2). L'hypothèse formulée a été que la protéorhodopsine, sous l'effet de la lumière, a engendré la libération de protons dans le milieu extracellulaire mais que ses effets n'ont pas été remarqués sur les analyses réalisées. Deux raisons peuvent expliquer cette observation :

- la protéine ne permet pas d'améliorer l'efficacité d'utilisation du carbone,
- la technique utilisée possède des biais de mesures plus importants que le changement physiologique et métabolique existant.



Figure f : Evolution du pH au cours du temps pour les répliquas de cycles en chémostat.

<u>Annexe D</u> : Effet de la lumière sur le métabolisme du carbone et sur la densité optique d'une population de *P. angustum* S14 avec une exposition lumineuse en cycle 12h-12h (406 μE) lors d'un ajustement de pH par une solution de soude.

L'article numéro 1 (Chapitre IV) a été produit avec deux grands jeux d'expériences : (1) des cycles en chémostat avec un « haut niveau » de substrat et donc une biomasse importante engendrant un pH acide et (2) des cycles en chémostat avec un « faible niveau » de substrat et une biomasse moins dense conservant un pH neutre. Initialement, des expériences en chémostat, avec un ajustement de pH grâce à une solution de soude, ont été réalisées pour obtenir un pH neutre. Ainsi, en conservant une même biomasse, un pH neutre a pu être obtenu. Une expérience préliminaire a tout d'abord été entreprise afin d'évaluer la quantité de soude nécessaire pour conserver le pH désiré et de choisir une solution suffisamment concentrée pour que le volume de soude ajouté soit négligeable par rapport au volume de milieu frais distribué (Figure g). Une solution de NaOH à 0,25 M a été testée pour que le pH soit ajusté automatiquement à 8. En moyenne, 11 ml.h⁻¹ de solution de NaOH ont été utilisés pour ajuster convenablement le pH. Ce volume étant négligeable par rapport au débit d'entrée du milieu de culture, ce dispositif d'ajustement a été conservé pour l'expérience suivante.



Figure g : Evolution du pH ajusté avec une solution de soude à 0,25 M en fonction du temps lors d'une exposition continue à l'obscurité.

L'expérience incluant l'exposition cyclique à la lumière a été réalisée en dupliquas dans les mêmes conditions que les expériences avec un « haut niveau » de substrat (Chapitre IV). Comme précédemment, la densité optique s'est stabilisée après environ 120 heures d'exposition à l'obscurité (Figure h). Les cycles 12h lumière – 12h obscurité ont alors été enclenchés. Un des répliqua a révélé une biomasse toujours plus importante que celle observée pour le second. Cette différence a pu être expliquée par la différence de débit entre les deux chémostats avec une moyenne de $101,09 \pm 7,17$ ml.h⁻¹ pour le premier et une de seulement 88,67 ± 5,05 ml.h⁻¹ pour le second.



Figure h : Evolution de la densité optique (OD_{620nm}) et du POC $(\mu gC/ml)$ en fonction du temps lors d'une exposition cyclique à une intensité de lumière moyenne (406 µmol photon.m⁻ ².s⁻¹) après une phase d'obscurité (rectangle gris) de 120 heures en présence d'un ajustement de pH par une solution de soude. Les losanges noirs et blancs représentent les points de densité optique pour les réplicats 1 et 2 respectivement, les ronds noirs et blancs, les mesures de POC pour les réplicats 1 et 2 respectivement.

A la différence des expériences réalisées dans les mêmes conditions mais à pH acide, aucun pattern n'a pu être déduit des mesures de POC effectuées au cours du temps (Figure h). Ces résultats ont permis de se poser une nouvelle question : est-ce réellement le pH ou simplement la façon dont le pH est ajusté qui inhibe les effets observés auparavant ? En d'autres termes, l'ajout régulier d'une solution de soude modifie t-il le métabolisme de la souche et empêche t-il la protéorhodopsine de fonctionner ? Il a donc été décidé de réaliser une nouvelle fois ces expériences en diminuant la quantité de carbone distribuée (de 3 à 0,6 M de glucose). Le pH a ainsi pu être ajusté sans ajout supplémentaire d'une solution car le tampon du milieu utilisé



était suffisamment efficace pour une quantité de biomasse bien moins importante. Ces dernières expériences ont constituées la deuxième partie de l'article numéro 1 (Chapitre IV).

Figure i : Evolution du débit en $ml.h^{-1}$ en fonction du temps en heures pour les répliquas 1 (courbe noire) et 2 (courbe en pointillés).

Annexe E : Vérification de l'état de quasi-équilibre dans les chémostats.

Les débits des expériences en chémostat n'ont pas été stables durant les cycles mais après simulation du modèle de Pirt (1975) sur nos données (logiciel Scilab, version 5.4.1), nous avons pu comparer les résultats obtenus en simulation et ceux obtenus en expériences. Les courbes obtenues (Figures j, k et l pour les expériences en haute concentration de carbone et Figures m, n, o pour les expériences en faible concentration de carbone), nous ont permis de confirmer l'hypothèse de l'état quasi stationnaire du modèle tout au long des diverses expériences.

Les courbes représentées sur l'ensemble des panneaux A des 6 figures comparent l'évolution des taux de dilution mesurés (courbes bleues) durant les expériences avec les taux de croissance simulés (courbes rouges). Les deux courbes se superposent pratiquement parfaitement, démontrant l'état de quasi équilibre pour la variable de concentration en substrat. L'unique moment pour lequel il y a une frappante différence entre les deux courbes est lorsque la lumière est allumée pour la première fois après un long moment d'obscurité dans les traitements avec une forte concentration de glucose (traduisant un changement brutal dans les conditions ayant une conséquence théorique sur le taux de croissance de la souche bactérienne) mais très rapidement, la courbe des taux de croissance simulée se réajuste sur l'autre.

Sur les panneaux B des 6 figures, nous pouvons observés que les POC mesurés sont toujours très proches des points de POC à l'équilibre simulés par le modèle de Pirt, confirmant une nouvelle fois l'état quasi stationnaire des chémostats étudiés pour la variable de concentration en biomasse.

Finalement, les panneaux C des 6 figures représentent l'évolution du substrat résiduel restant dans les chémostats, totalement négligeable par rapport au substrat d'entrée (216 μ g.ml⁻¹ et 43 μ g.ml⁻¹ pour les chémostats à forte et faible concentration de substrat respectivement). Cette information nous permet de valider l'utilisation du modèle de Pirt sur les données expérimentales obtenues dans le chapitre IV de ce travail de thèse, où nous négligeons la concentration en substrat résiduel devant la concentration en entrée.



Figure j: Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat H1. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps.



Figure k : Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat H2. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps.



Figure 1: Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat contrôle H. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps.



Figure m: Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat L1. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps.



Figure n : Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat L2. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps.



Figure o: Graphiques confirmant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au sein du chémostat contrôle L. (A) Courbes de l'évolution du taux de dilution (bleue) et du taux de croissance μ simulé (rouge) en fonction du temps. (B) Représentation des points de POC à l'équilibre (rond noirs) suivant la simulation de l'évolution de la biomasse (courbe noire) et des points de POC expérimentaux (ronds bleus). (C) Courbe de l'évolution du substrat résiduel dans les chémostats en fonction du temps

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hors article et Tableau 8 :

A

Agogue, H., Joux, F., Obernosterer, I., Lebaron, P., 2005. Resistance of Marine Bacterioneuston to Solar Radiation. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5282–5289.

Akram, N., Palovaara, J., Forsberg, J., Lindh, M.V., Milton, D.L., Luo, H., González, J.M., Pinhassi, J., 2013. Regulation of proteorhodopsin gene expression by nutrient limitation in the marine bacterium *Vibrio* sp. AND4. Environ. Microbiol. 15, 1400–1415.

Alonso-Saez, L., Gasol, J.M., Lefort, T., Hofer, J., Sommaruga, R., 2006. Effect of Natural Sunlight on Bacterial Activity and Differential Sensitivity of Natural Bacterioplankton Groups in Northwestern Mediterranean Coastal Waters. Appl. Environ. Microbiol. 72, 5806–5813.

Andrews, J.F., 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. Biotechnol. Bioeng. 10, 707–723.

Arditi, R., Saïah, H., 1992. Empirical Evidence of the Role of Heterogeneity in Ratio-Dependent Consumption. Ecology 73, 1544–1551.

Arino, J., Pilyugin, S.S., Wolkowicz, G.S., 2003. Considerations on yield, nutrient uptake, cellular growth, and competition in chemostat models. Can. Appl. Math. Q. 11, 107–142.

Arrieta, J.M., Weinbauer, M.G., Herndl, G.J., 2000. Interspecific Variability in Sensitivity to UV Radiation and Subsequent Recovery in Selected Isolates of Marine Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1468–1473.

Atamna-Ismaeel, N., Sabehi, G., Sharon, I., Witzel, K.-P., Labrenz, M., Jürgens, K., Barkay, T., Stomp, M., Huisman, J., Beja, O., 2008. Widespread distribution of proteorhodopsins in freshwater and brackish ecosystems. ISME J. 2, 656–662.

Azam, Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., Thingstad, F., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 10, 257–263.

В

Bailey, C.A., Neihof, R.A., Tabor, P.S., 1983. Inhibitory effect of solar radiation on amino acid uptake in Chesapeake Bay bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 46, 44–49.

Béjà, O., Aravind, L., Koonin, E.V., Suzuki, M.T., Hadd, A., Nguyen, L.P., Jovanovich,
S.B., Gates, C.M., Feldman, R.A., Spudich, J.L., Spudich, E.N., DeLong, E.F., 2000.
Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. Science 289, 1902–1906.

Béjà, O., Spudich, E.N., Spudich, J.L., Leclerc, M., DeLong, E.F., 2001. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. Tectonophysics 291, 161–171.

Béjà, O., Suzuki, M.T., 2008. Photoheterotrophic marine prokaryotes. Microb. Ecol. Oceans 131–157.

Berges, J.A., Franklin, D.J., Harrison, P.J., 2001. Evolution of an Artificial Seawater Medium: Improvements in Enriched Seawater, Artificial Water Over the Last Two Decades. J. Phycol. 37, 1138–1145.

Bo, W., 2010. Diversity and distribution of proteorhodopsin-containing microorganisms in marine environments. Front. Environ. Sci. Eng. China.

Bohorquez, L.C., Ruiz-Perez, C.A., Zambrano, M.M., 2012. Proteorhodopsin-Like Genes Present in Thermoacidophilic High-Mountain Microbial Communities. Appl. Environ. Microbiol. 78, 7813–7817. **Bonfield, J.K., Smith, K.F., Staden, R.,** 1995. A new DNA sequence assembly program. Nucleic Acids Res. 23, 4992–4999.

Booth, M.G., Hutchinson, L., Brumsted, M., Aas, P., Coffin, R.B., Jr, R.C.D., Kelley, C.A., Lyons, M.M., Pakulski, J.D., Sandvik, S.L.H., Jeffrey, W.H., Miller, R.V., 2001. Quantification of recA gene expression as an indicator of repair potential in marine bacterioplankton communities of Antarctica. Aquat. Microb. Ecol. 24, 51–59.

C - **D**

Campbell, B.J., Waidner, L.A., Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., 2007. Abundant proteorhodopsin genes in the North Atlantic Ocean. Environ. Microbiol. 0, 070908085526001–???

Chen, T.-H., Chen, T.-L., Hung, L.-M., Huang, T.-C., 1991. Circadian Rhythm in Amino Acid Uptake by Synechococcus RF-1. Plant Physiol. 97, 55–59.

Cho, J.-C., Giovannoni, S.J., 2004. Cultivation and Growth Characteristics of a Diverse Group of Oligotrophic Marine Gammaproteobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70, 432–440.

Cole, J.J., Findlay, S., Pace, M.L., 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. Mar. Ecol. Prog. Ser. Oldendorf 43, 1–10.

Contois, D., 1959. Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. J. Gen. Microbiol. 21, 40.

Daran-Lapujade, P., Jansen, M.L.A., Daran, J.-M., Gulik, W. van, Winde, J.H. de, Pronk, J.T., 2004. Role of Transcriptional Regulation in Controlling Fluxes in Central Carbon Metabolism of Saccharomyces cerevisiae A CHEMOSTAT CULTURE STUDY. J. Biol. Chem. 279, 9125–9138.

De La Torre, J.R., Christianson, L.M., Béja, O., Suzuki, M.T., Karl, D.M., Heidelberg, J., DeLong, E.F., 2003. Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine

bacterial taxa. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 12830-12835.

DeLong, E.F., Béjà, O., 2010. The light-driven proton pump proteorhodopsin enhances bacterial survival during tough times. PLoS Biol. 8, e1000359.

Dikla Man, Weiwu Wang, Sabehi, G., Aravind, L., Post, A.F., Massana, R., Spudich, E.N., Spudich, J.L., Béjà, O., 2003. Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. EMBO J. 22, 1725–1731.

Dioumaev, A.K., Brown, L.S., Shih, J., Spudich, E.N., Spudich, J.L., Lanyi, J.K., 2002. Proton transfers in the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin. Biochemistry (Mosc.) 41, 5348–5358.

Ducklow, H., 2000. Bacterial production and biomass in the oceans. Microb. Ecol. Oceans 1, 85–120.

E - F

Eguchi, M., Nishikawa, T., MacDonald, K., Cavicchioli, R., Gottschal, J.C., Kjelleberg, S., 1996. Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium Sphingomonas sp. Strain RB2256. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1287–1294.

Eiler, A., 2006. Evidence for the Ubiquity of Mixotrophic Bacteria in the Upper Ocean: Implications and Consequences. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7431–7437.

Falkowski, P., 2000. The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System. Science 290, 291–296.

Feely, R.A., Doney, S.C., Cooley, S.R., 2009. Ocean acidification: present conditions and future changes in a high-CO2 world.

Feng, S., Powell, S.M., Wilson, R., Bowman, J.P., 2013. Light-stimulated growth of proteorhodopsin-bearing sea-ice psychrophile Psychroflexus torquis is salinity dependent.

ISME J.

Freedman, H.I., Yuantong, X., 1993. Models of competition in the chemostat with instantaneous and delayed nutrient recycling. J. Math. Biol. 31, 513–527.

Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizhov, I., Ataka, K., Heberle, J., Engelhard, M., Bamberg, E., 2002. Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality. J. Mol. Biol. 321, 821–838.

Frigaard, N.-U., Martinez, A., Mincer, T.J., DeLong, E.F., 2006. Proteorhodopsin lateral gene transfer between marine planktonic Bacteria and Archaea. Nature 439, 847–850.

Furgal, J.A., Smith, R.E.H., 1997. Ultraviolet radiation and photosynthesis by Georgian Bay phytoplankton of varying nutrient and photoadaptive status. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54, 1659–1667.

Futcher, B., Latter, G.I., Monardo, P., McLaughlin, C.S., Garrels, J.I., 1999. A sampling of the yeast proteome. Mol. Cell. Biol. 19, 7357–7368.

G

Gala, W.R., Giesy, J.P., 1991. Effects of ultraviolet radiation on the primary production of natural phytoplankton assemblages in Lake Michigan. Ecotoxicol. Environ. Saf. 22, 345–361.

Gasol, J.M., Doval, M.D., Pinhassi, J., Calderón-Paz, J.I., Guixa-Boixareu, N., Vaqué, D., Pedrós-Alió, C., 1998. Diel variations in bacterial heterotrophic activity and growth in the northwestern Mediterranean Sea.

Giovannoni, S.J., Bibbs, L., Cho, J.-C., Stapels, M.D., Desiderio, R., Vergin, K.L., Rappé, M.S., Laney, S., Wilhelm, L.J., Tripp, H.J., Mathur, E.J., Barofsky, D.F., 2005. Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. Nature 438, 82–85.

Goldman, J.C., Dennett, M.R., 2000. Growth of Marine Bacteria in Batch and Continuous

Culture under Carbon and Nitrogen Limitation. Limnol. Ocean. 45, 789-800.

Gómez-Consarnau, L., Akram, N., Lindell, K., Pedersen, A., Neutze, R., Milton, D.L., González, J.M., Pinhassi, J., 2010. Proteorhodopsin Phototrophy Promotes Survival of Marine Bacteria during Starvation. PLoS Biol. 8, e1000358.

Gómez-Consarnau, L., González, J.M., Coll-Lladó, M., Gourdon, P., Pascher, T., Neutze, R., Pedrós-Alió, C., Pinhassi, J., 2007. Light stimulates growth of proteorhodopsincontaining marine Flavobacteria. Nature 445, 210–213.

Gonzalez, J.M., Pinhassi, J., Fernandez-Gomez, B., Coll-Llado, M., Gonzalez-Velazquez,
M., Puigbo, P., Jaenicke, S., Gomez-Consarnau, L., Fernandez-Guerra, A., Goesmann,
A., Pedros-Alio, C., 2011. Genomics of the Proteorhodopsin-Containing Marine
Flavobacterium Dokdonia sp. Strain MED134. Appl. Environ. Microbiol. 77, 8676–8686.

Grivet, J.-P., 2001. Nonlinear population dynamics in the chemostat. Comput. Sci. Eng. 3, 48–55.

Η

Haldane, J.B.S., 1930. A mathematical theory of natural and artificial selection. (Part VI, Isolation.). Math. Proc. Camb. Philos. Soc. 26, 220–230.

Hardin, G., 1960. The Competitive Exclusion Principle. Science 131, 1292–1297. Hargreaves, B.R., 2003. Water column optics and penetration of UVR. http://www.lehigh.edu/~brh0/research/BRH_Chapter3_UVAqEcosys_300dpi.pdf.

Hegde, P.S., White, I.R., Debouck, C., 2003. Interplay of transcriptomics and proteomics. Curr. Opin. Biotechnol. 14, 647–651.

Hempfling, W.P., Mainzer, S.E., 1975. Effects of varying the carbon source limiting growth on yield and maintenance characteristics of Escherichia coli in continuous culture. J. Bacteriol. 123, 1076–1087.

Herbert, D., Elsworth, R., Telling, R., 1956. The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. J. Gen. Microbiol. 14, 601.

Hernández-León, S., Portillo-Hahnefeld, A., Almeida, C., Bécognée, P., Moreno, I., 2001. Diel feeding behaviour of krill in the Gerlache Strait, Antarctica. Mar. Ecol. Prog. Ser. 223, 235–242.

Herndl, G.J., Müller-Niklas, G., Frick, J., 1993. Major role of ultraviolet-B in controlling bacterioplankton growth in the surface layer of the ocean. Nature 361, 717–719.

Herz, J., Verhoefen, M.-K., Weber, I., Bamann, C., Glaubitz, C., Wachtveitl, J., 2012. Critical Role of Asp227 in the Photocycle of Proteorhodopsin. Biochemistry (Mosc.) 51, 5589–5600.

Hobson, L.A., Hartley, F.A., 1983. Ultraviolet irradiance and primary production in a Vancouver Island fjord, British Columbia, Canada. J. Plankton Res. 5, 325–331.

Hoskisson, P.A., 2005. Continuous culture - making a comeback? Microbiology 151, 3153–3159.

Houghton, J.T., Meiro Filho, L.G., Callander, B.A., Harris, N., Kattenburg, A., Maskell,K., 1996. Climate Change 1995: The Science of Climate Change.

Humphrey, B., Kjelleberg, S., Marshall, K.C., 1983. Responses of marine bacteria under starvation conditions at a solid-water interface. Appl. Environ. Microbiol. 45, 43.

J

Jacobs, S., 2006. The Determination of Nitrogen in Biological Materials, in: Glick, D. (Ed.), Methods of Biochemical Analysis. John Wiley & Sons, Inc., pp. 241–263.
Jiao, N., Feng, F., Wei, B., 2006. Proteorhodopsin—A new path for biological utilization of

light energy in the sea. Chin. Sci. Bull. 51, 889-896.

Jiao, Azam and Sanders (2010). Microbial carbon pimp in the oceans. Science/AAAS. Business Office.

Johannessen, O.M., 1999. Satellite Evidence for an Arctic Sea Ice Cover in Transformation. Science 286, 1937–1939.

Jones, A.E., Shanklin, J.D., 1995. Continued decline of total ozone over Halley, Antarctica, since 1985. Nature 376, 409–411.

Joos, F., 1999. Global Warming and Marine Carbon Cycle Feedbacks on Future Atmospheric CO2. Science 284, 464–467.

Joux, F., Jeffrey, W.H., Lebaron, P., Mitchell, D.L., 1999. Marine Bacterial Isolates Display Diverse Responses to UV-B Radiation. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3820–3827.

Κ

Karl, T.R., 2003. Modern Global Climate Change. Science 302, 1719–1723.

Kataoka, T., Hodoki, Y., Suzuki, K., Saito, H., Higashi, S., 2009. Detection of UVBRsensitive and -tolerant bacteria in surface waters of the western North Pacific. J. Photochem. Photobiol. B 95, 108–116.

Kim, J.Y., Jo, B.H., Jo, Y., Cha, H.J., 2012. Improved production of biohydrogen in lightpowered Escherichia coli by co-expression of proteorhodopsin and heterologous hydrogenase. Microb. Cell Factories 11, 2.

Kimura, H., Young, C.R., Martinez, A., DeLong, E.F., 2011. Light-induced transcriptional responses associated with proteorhodopsin-enhanced growth in a marine flavobacterium. ISME J. 5, 1641–1651.

Kirchman, D.L., Hanson, T.E., 2013. Bioenergetics of photoheterotrophic bacteria in the oceans. Environ. Microbiol. Reports 5, 188–199.

Kirchman, D.L., Rich, J.H., Barber, R.T., 1995. Biomass and biomass production of heterotrophic bacteria along 140 W in the equatorial Pacific: Effect of temperature on the microbial loop. Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Ocean. 42, 603–619.

Kleypas, J.A., Buddemeier, R.W., Archer, D., Gattuso, J.-P., Langdon, C., Opdyke,
B.N., 1999. Geochemical Consequences of Increased Atmospheric Carbon Dioxide on Coral Reefs. Science 284, 118–120.

Koblížek, M., Mašín, M., Ras, J., Poulton, A.J., Prášil, O., 2007. Rapid growth rates of aerobic anoxygenic phototrophs in the ocean. Environ. Microbiol. 9, 2401–2406.

Koh, E.Y., Atamna-Ismaeel, N., Martin, A., Cowie, R.O.M., Beja, O., Davy, S.K., Maas,
E.W., Ryan, K.G., 2010. Proteorhodopsin-Bearing Bacteria in Antarctic Sea Ice. Appl.
Environ. Microbiol. 76, 5918–5925.

Kolber, Z.S., Gerald, F., Lang, A.S., Beatty, J.T., Blankenship, R.E., VanDover, C.L., Vetriani, C., Koblizek, M., Rathgeber, C., Falkowski, P.G., others, 2001. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. Science 292, 2492.

Kolkman, A., Olsthoorn, M.M.A., Heeremans, C.E.M., Heck, A.J.R., Slijper, M., 2005. Comparative proteome analysis of Saccharomyces cerevisiae grown in chemostat cultures limited for glucose or ethanol. Mol. Cell. Proteomics 4, 1–11.

L

Lami, R., Cottrell, M.T., Campbell, B.J., Kirchman, D.L., 2009. Light-dependent growth and proteorhodopsin expression by Flavobacteria and SAR11 in experiments with Delaware coastal waters. Environ. Microbiol. 11, 3201–3209.

Lami, R., and Kirchman, D.L., 2013. Light-dependent proteorhododpsin expression by SAR11 in Delaware coastal waters. Submitted in Isme Journal.

Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.), pp. 115–147. John Wiley and Sons, Chichester.

Lauro, F.M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T.J., Egan, S., Rice, S., DeMaere, M.Z., Ting, L., Ertan, H., Johnson, J., Ferriera, S., Lapidus, A., Anderson, I., Kyrpides, N., Munk, A.C., Detter, C., Han, C.S., Brown, M.V., Robb, F.T., Kjelleberg, S., Cavicchioli, R., 2009. The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 15527–15533.

Laws, E.A., 2000. Aquatic Pollution: An Introductory Text. John Wiley & Sons.

Lebaron, P., Parthuisot, N., Catala, P., 1998. Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1725–1730.

Lemesle, V., Gouzé, J.L., 2007. A Simple Unforced Oscillatory Growth Model in the Chemostat. Bull. Math. Biol. 70, 344–357.

Levitus, S., 2000. Warming of the World Ocean. Science 287, 2225–2229.

Lobry, C., Rapaport, A., Mazenc, F., 2006. Sur un modèle densité-dépendant de compétition pour une ressource. C. R. Biol. 329, 63–70.

Lotka, **A.J.**, 1978. The growth of mixed populations: Two species competing for a common food supply, in: The Golden Age of Theoretical Ecology: 1923–1940, Lecture Notes in Biomathematics. Springer Berlin Heidelberg, pp. 274–286.

Μ

Maier-Reimer, E., Hasselmann, K., 1987. Transport and storage of CO2 in the ocean—an inorganic ocean-circulation carbon cycle model. Clim. Dyn. 2, 63–90.

Maiti, T.K., Yamada, K., Inoue, K., Kandori, H., 2012. L105K Mutant of Proteorhodopsin. Biochemistry (Mosc.) 51, 3198–3204.

Malmstrom, R.R., Kiene, R.P., Vila, M., Kirchman, D.L., 2005. Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) Assimilation by Synechococcus in the Gulf of Mexico and Northwest Atlantic Ocean. Limnol. Ocean. 50, 1924–1931.

Marouga, R., Kjelleberg, S., 1996. Synthesis of immediate upshift (Iup) proteins during recovery of marine Vibrio sp. strain S14 subjected to long-term carbon starvation. J. Bacteriol. 178, 817.

Martinez, A., Bradley, A., Waldbauer, J., Summons, R., DeLong, E., 2007. Proteorhodopsin photosystem gene expression enables photophosphorylation in a heterologous host. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 5590.

Martinez, J., Azam, F., 1993. Aminopeptidase Activity in Marine Chroococcoid Cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3701–3707.

Matallana-Surget, S., Douki, T., Cavicchioli, R., Joux, F., 2009. Remarkable resistance to UVB of the marine bacterium Photobacterium angustum explained by an unexpected role of photolyase. Photochem. Photobiol. Sci. 8, 1313.

Matallana-Surget S., **Manuscrit de thèse**, 2009. Physiological and molecular responses of the marine oligotrophic ultramicrobacterium Sphingopyxis alaskensis RB2256 to visible light and ultraviolet radiation. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI).

Monod, J., 1950. Selected Papers in Molecular Biology by Jacques Monod - Google Livres. http://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=TchQ6gPzO_4C&oi=fnd&pg=PA184&dq=Mon od+1950&ots=ojC_eosHhK&sig=9CITtjUSxVSPV_pAWJxmn7UzDWE#v=onepage&q=Mo nod%201950&f=false.

Moran, M.A., Miller, W.L., 2007. Resourceful heterotrophs make the most of light in the coastal ocean. Nat. Rev. Microbiol. 5, 792–800.

Müller, R., Crutzen, P.J., Grooβ, J.-U., Bürhl, C., Russell, J.M., Gernandt, H., McKenna, D.S., Tuck, A.F., 1997. Severe chemical ozone loss in the Arctic during the winter of 1995–96. Nature 389, 709–712.

Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek 73, 127–141.

N - O - P

Neijssel, O.M., Tempest, D.W., 1976. Bioenergetic aspects of aerobic growth of Klebsiella aerogenes NCTC 418 in carbon-limited and carbon-sufficient chemostat culture. Arch. Microbiol. 107, 215–221.

Novick, A., Szilard, L., 1950. Description of the Chemostat. Science 112, 715–716.

Oesterhelt, D., Stoeckenius, W., 1971. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium halobium. Nature 233, 149–152.

Ortega-Retuerta, E., Joux, F., Jeffrey, W.H., Ghiglione, J.F., 2013. Spatial variability of particle-attached and free-living bacterial diversity in surface waters from the Mackenzie River to the Beaufort Sea (Canadian Arctic). Biogeosciences 10, 2747–2759.

Ostling, J., Flärdh, K., Kjelleberg, S., 1995. Isolation of a carbon starvation regulatory mutant in a marine Vibrio strain. J. Bacteriol. 177, 6978–6982.

Ostling, J., Holmquist, L., Kjelleberg, S., 1996. Global analysis of the carbon starvation response of a marine Vibrio species with disruptions in genes homologous to relA and spoT. J. Bacteriol. 178, 4901.

Paerl, H.W., 1991. Ecophysiological and Trophic Implications of Light-Stimulated Amino Acid Utilization in Marine Picoplankton. Appl. Environ. Microbiol. 57, 473–479.

Pakulski, J.D., Aas, P., Jeffrey, W., Lyons, M., Von Waasenbergen, L., Mitchell, D., Coffin, R., 1998. Influence of light on bacterioplankton production and respiration in a subtropical coral reef. Aquat. Microb. Ecol. 14, 137–148.

Pavlou, S., 2006. Microbial competition in bioreactors. Chem. Ind. Chem. Eng. Q. 12, 71-81.

Pfennig, N., 1968. Chlorobium phaeobacteroides nov. spec. und C. phaeovibrioides nov. spec., zwei neue Arten der grünen Schwefelbakterien. Arch. Für Mikrobiol. 63, 224–226.

Piper, M.D.W., Daran-Lapujade, P., Bro, C., Regenberg, B., Knudsen, S., Nielsen, J., Pronk, J.T., 2002. Reproducibility of Oligonucleotide Microarray Transcriptome Analyses an interlaboratory comparison using chemostat cultures of saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 277, 37001–37008.

Pirt, S.J., 1965. The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 163, 224–231.

Pirt, S.J., 1975. Principles of microbe and cell cultivation. 274 pp.

Pirt, S.J., 1982. Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. Arch. Microbiol. 133, 300–302.

Pomeroy, L.R., 1974. The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. BioScience 24, 499–504.

Postgate, J.R., Calcott, P.H., 1990. Ageing and Death of Microbes., In Comprehensive Biotechnology. The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine, Moo-Young, M., Bull, A.T., and Dalton, H., (eds.), Pergamon Press.

R

Rathgeber, C., Beatty, J.T., Yurkov, V., 2004. Aerobic Phototrophic Bacteria: New

Evidence for the Diversity, Ecological Importance and Applied Potential of this Previously Overlooked Group. Photosynth. Res. 81, 113–128.

Riedel, T., Gómez-Consarnau, L., Tomasch, J., Martin, M., Jarek, M., González, J.M., Spring, S., Rohlfs, M., Brinkhoff, T., Cypionka, H., Göker, M., Fiebig, A., Klein, J., Goesmann, A., Fuhrman, J.A., Wagner-Döbler, I., 2013. Genomics and Physiology of a Marine Flavobacterium Encoding a Proteorhodopsin and a Xanthorhodopsin-Like Protein. PLoS ONE 8, e57487.

Rippka, R., Coursin, T., Hess, W., Lichtlé, C., Scanlan, D.J., Palinska, K.A., Iteman, I., Partensky, F., Houmard, J., Herdman, M., 2000. Prochlorococcus marinus Chisholm et al. 1992 subsp. pastoris subsp. nov. strain PCC 9511, the first axenic chlorophyll a2/b2-containing cyanobacterium (Oxyphotobacteria). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 1833–1847.

Rothrock, D.A., Yu, Y., Maykut, G.A., 1999. Thinning of the Arctic sea-ice cover. Geophys. Res. Lett. 26, 3469–3472.

Royal Society (Great Britain), 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. Royal Society, [London].

Ruan, S., Ardito, A., Ricciardi, P., DeAngelis, D.L., 2007. Coexistence in competition models with density-dependent mortality. C. R. Biol. 330, 845–854.

Ruan, S., Wolkowicz, G.S.K., Wu, J., Sciences, F.I. for R. in M., 2003. Dynamical Systems and Their Applications in Biology. American Mathematical Soc.

Ruiz-González, C., Galí, M., Lefort, T., Cardelús, C., Simó, R., Gasol, J.M., 2012a. Annual variability in light modulation of bacterial heterotrophic activity in surface northwestern Mediterranean waters. Limnol. Ocean. 57, 1376–1388.

Ruiz-González, C., Lefort, T., Massana, R., Simó, R., Gasol, J.M., 2012b. Diel changes in bulk and single-cell bacterial heterotrophic activity in winter surface waters of the northwestern Mediterranean Sea. Limnol. Ocean. 57, 29–42.

Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J.A., Hoffman, J.M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J.E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J.F., Utterback, T., Rogers, Y.-H., Falcón, L.I., Souza, V., Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L.E., Karl, D.M., Sathyendranath, S., Platt, T., Bermingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M.R., Strausberg, R.L., Nealson, K., Friedman, R., Frazier, M., Venter, J.C., 2007. The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. PLoS Biol. 5, e77.

S

Sabehi, G., Beja, O., Suzuki, M.T., Preston, C.M., DeLong, E.F., 2004. Different SAR86 subgroups harbour divergent proteorhodopsins. Environ. Microbiol. 6, 903–910.

Sabehi, G., Kirkup, B.C., Rozenberg, M., Stambler, N., Polz, M.F., Béjà, O., 2007. Adaptation and spectral tuning in divergent marine proteorhodopsins from the eastern Mediterranean and the Sargasso Seas. ISME J. 1, 48–55.

Sabine, C.L., Feely, R.A., Gruber, N., Key, R.M., Lee, K., Bullister, J.L., Wanninkhof, R., Wong, C.S., Wallace, D.W.R., Tilbrook, B., Millero, F.J., Peng, T.-H., Kozyr, A., Ono, T., Rios, A.F., 2004. The Oceanic Sink for Anthropogenic CO2. Science 305, 367–371.

Santos, A.L., Mendes, C., Gomes, N.C.M., Henriques, I., Correia, A., Almeida, A., Cunha, Â., 2009. Short-term variability of abundance, diversity and activity of estuarine bacterioneuston and bacterioplankton. J. Plankton Res. 31, 1545–1555.

Sarmiento, J.L., Bender, M., 1994. Carbon biogeochemistry and climate change. Photosynth. Res. 39, 209–234.

Sarmiento, J.L., Hughes, T.M.C., Stouffer, R.J., Manabe, S., 1998. Simulated response of the ocean carbon cycle to anthropogenic climate warming. Nature 393, 245–249.

Sarmiento, J.L., Quéré, C.L., 1996. Oceanic Carbon Dioxide Uptake in a Model of Century-Scale Global Warming. Science 274, 1346–1350.

Shiah, F.-K., 1999. Diel cycles of heterotrophic bacterioplankton abundance and production in the ocean surface waters. Aquat. Microb. Ecol. 17, 239–246.

Shiba, T., Simidu, U., 1982. Erythrobacter longus gen. nov., sp. nov., an Aerobic Bacterium Which Contains Bacteriochlorophyll a. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 211–217.

Srinivasan, S., Ostling, J., Charlton, T., De Nys, R., Takayama, K., Kjelleberg, S., 1998. Extracellular signal molecule (s) involved in the carbon starvation response of marine Vibrio sp. strain S14. J. Bacteriol. 180, 201.

Steele, J.H., 1974. The structure of marine ecosystems. Harvard University Press, Cambridge [etc.].

Steindler, L., Schwalbach, M.S., Smith, D.P., Chan, F., Giovannoni, S.J., 2011. Energy Starved Candidatus Pelagibacter Ubique Substitutes Light-Mediated ATP Production for Endogenous Carbon Respiration. PLoS ONE 6, e19725.

Stingl, U., Desiderio, R.A., Cho, J.-C., Vergin, K.L., Giovannoni, S.J., 2007. The SAR92 Clade: an Abundant Coastal Clade of Culturable Marine Bacteria Possessing Proteorhodopsin. Appl. Environ. Microbiol. 73, 2290–2296.

Stouthamer, A.H., 1977. Energetic aspects of the growth of micro- organisms. In: Haddock BA, Hamilton WA (eds) Microbial en- ergetics, 27th Symposium of the Soc gen Microbiol. Cambridge University Press, London, pp 283-315

T - V

Tempest, D.W., 1978. The biochemical significance of microbial growth yields: A reassessment. Trends Biochem. Sci. 3, 180–184.

Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J., 2004. Biodiversity of Vibrios. Microbiol. Mol. Biol.

Rev. 68, 403–431.

Thomson, B.E., Van Dyke, H., Worrest, R.C., 1980. Impact of UV-B radiation (290–320 nm) upon estuarine bacteria. Oecologia 47, 56–60.

Venter, J.C., 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. Science 304, 66–74.

Veron, J.E.N., Hoegh-Guldberg, O., Lenton, T.M., Lough, J.M., Obura, D.O., Pearce-Kelly, P., Sheppard, C.R.C., Spalding, M., Stafford-Smith, M.G., Rogers, A.D., 2009. The coral reef crisis: The critical importance of<350ppm CO2. Mar. Pollut. Bull. 58, 1428– 1436.

Volk, T., Hoffert, M.I., 1985. Ocean carbon pumps: Analysis of relative strengths and efficiencies in ocean-driven atmospheric CO2 changes, in: Sundquist, E.T., Broecker, W.S. (Eds.), Geophysical Monograph Series. American Geophysical Union, Washington, D. C., pp. 99–110.

Volterra, V., 1928. Variations and Fluctuations of the Number of Individuals in Animal Species living together. J. Cons. 3, 3–51.

W - X - Y - Z

Walter, J.M., Greenfield, D., Bustamante, C., Liphardt, J., 2007. Light-powering Escherichia coli with proteorhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 2408.

Walter, J.M., Greenfield, D., Liphardt, J., 2010. Potential of light-harvesting proton pumps for bioenergy applications. Curr. Opin. Biotechnol. 21, 265–270.

Wang, W.-W., Sineshchekov, O.A., Spudich, E.N., Spudich, J.L., 2003. Spectroscopic and Photochemical Characterization of a Deep Ocean Proteorhodopsin. J. Biol. Chem. 278, 33985–33991.

Wang, Z., O'Shaughnessy, T.J., Soto, C.M., Rahbar, A.M., Robertson, K.L., Lebedev, N., Vora, G.J., 2012. Function and Regulation of Vibrio campbellii Proteorhodopsin: Acquired Phototrophy in a Classical Organoheterotroph. PLoS ONE 7, e38749.

Warner F. E., Cook, A. M. and Train, D., 1954a. Engineering and microbiological processes. *Chem. & Ind. (Rev.)* p. 114.

Warner F.E., Cook, A.M. and Train, D., 1954b. Engineering and microbiological processes. *Chern. & Ind. (Rev.)* p. 283.

Wolkowicz, G.S., Lu, Z., 1992. Global dynamics of a mathematical model of competition in the chemostat: general response functions and differential death rates. SIAM J. Appl. Math. 52, 222–233.

Xiu, Z.-L., Zeng, A.-P., Deckwer, W.-D., 1998. Multiplicity and stability analysis of microorganisms in continuous culture: effects of metabolic overflow and growth inhibition. Biotechnol. Bioeng. 57, 251–261.

Yamada, K., Kawanabe, A., Kandori, H., 2010. Importance of Alanine at Position 178 in Proteorhodopsin for Absorption of Prevalent Ambient Light in the Marine Environment. Biochemistry (Mosc.) 49, 2416–2423.

Yurkov, V.V., Beatty, J.T., 1998. Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 695–724.

Zubkov, M.V., Fuchs, B.M., Tarran, G.A., Burkill, P.H., Amann, R., 2003. High Rate of Uptake of Organic Nitrogen Compounds by Prochlorococcus Cyanobacteria as a Key to Their Dominance in Oligotrophic Oceanic Waters. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1299–1304.