



HAL
open science

Interactions entre microalgues et bactéries dans l'environnement marin

Klervi Crenn

► **To cite this version:**

Klervi Crenn. Interactions entre microalgues et bactéries dans l'environnement marin. Interactions entre organismes. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066110 . tel-01391468

HAL Id: tel-01391468

<https://theses.hal.science/tel-01391468>

Submitted on 3 Nov 2016

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.



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
Spécialité Microbiologie Marine
Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement d'Ile de France (ED129)

Présentée par
Klervi CRENN
Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)

INTERACTIONS ENTRE MICROALGUES ET BACTERIES DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN

Soutenue publiquement le 3 juin 2016, devant un jury composé de :

Dr Patricia BONIN Rapporteur
DR, Microbiologie Environnementale Biotechnologie, Institut Méditerranéen d'Océanologie, CNRS/IRD

Dr Philippe SOUDANT Rapporteur
DR, Interactions Biotiques et Variabilité Environnementale, LEMAR, IUEM, CNRS/UBO/IRD/Ifremer

Dr Marie-Anne CAMBON BONAVIDA Examineur
Chercheur, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, IFREMER/UBO

Dr Pascal CLAQUIN..... Examineur
PR, Diversité et Interactions dans les Ecosystèmes Côtiers, BOREA, MNHM/CNRS/UPMC/IRD/UCN/UA

Dr Christian JEANTHON Directeur de Thèse
DR, Procaryotes Phototrophes Marins, Station Biologique de Roscoff, CNRS/UPMC

Equipe Procaryotes Phototrophes Marins – Groupe Plancton
UMR7144 – Adaptation et Diversité en Milieu Marin
Station Biologique de Roscoff CNRS/UPMC - Place Georges Teissier -29680 Roscoff, FRANCE

Je tiens à remercier la **Région Bretagne** et le Projet Européen **MaCuMBA¹** (**Marine**
microorganisms : **Cultivation Methods** for improving their **Biotechnological Applications**)
pour avoir financé ce travail de Thèse



¹ The research leading to these results has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no 311975. The publication reflects the views only of the author, and the European Union cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein

A mes parents,

Merci bras tout an dud !

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de ce jury, Mme Patricia Bonin, M Philippe Soudant, Mme Marie-Anne Cambon Bonavita et M Pascal Claquin qui ont accepté d'évaluer ce travail. Un grand merci également à Mme Isabelle Biegala, Mme Laure Guillou, M Ian Probert et M Rafaele Siano pour vos conseils pertinents, remarques, et diverses suggestions lors des mes comités de thèse. Je tiens également à remercier M François Lallier, directeur de l'unité Adaptation et Diversité en Milieu Marin ainsi que Frédérique Partensky et Laurence Garczarek, responsables successifs de l'équipe Procaryotes Prototrophes Marins, de m'avoir accueilli durant ces trois belles années.

Merci infiniment Christian, de m'avoir offert la chance de réaliser cette thèse avec toi. Thématique nouvelle pour toi, mais encore plus pour moi (une diato-quoi ?), je ne retiendrais de ce chemin semé d'embuches, que l'essentiel : une expérience extrêmement enrichissante et captivante. Je tiens également à remercier Anne et Marie-Anne, de m'avoir donnée l'envie de réaliser une thèse dans la microbiologie marine.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans la contribution du projet européen MaCuMBA et de la Région Bretagne et des différentes personnes avec qui j'ai eu le privilège de collaborer. Je tiens à remercier tout particulièrement Lynn Paterson et Anusha Keloth, de l'Université Heriot Watt, pour leurs tentatives d'isolement cellulaire par pinces optiques. Je tiens aussi à remercier la Collection de Culture d'Oban en Ecosse pour leur chaleureux accueil et leurs précieux conseils dans les méthodes d'axénisation.

Merci à tous les membres du groupe plancton, c'est un réel bonheur de travailler à vos cotés ! Merci donc à tous les zoo-, phyto-, bacterio-, et virioplanctonologistes qui font la singularité de ce groupe. Merci aux filles de la RCC, en particulier Pris, Fabienne, Florence et Roseline, pour leur gentillesse et leur bienveillance. Merci à l'équipe MaPP et son indissociable binôme de tête Lôh et Fred, à mon voisin de paillasse Christophe (à la fois sauvage et sympathique), et la dynamique et attachante Momo. Merci également à An pour ta sympathie et aussi pour m'avoir fait partagé ton expertise de la transcriptomique. Merci aussi à Domi M, de toutes les qualités qui te caractérisent, ton humour est probablement celle qui m'aura la plus marquée ! Merci aussi à Nathalie et Anne Claire, pour leur gentillesse et leurs conseils avisés. Merci également à Raffaele pour ton expertise dans l'identification des diatomées et pour ta sympathie. Je n'oublie pas non plus les personnes qui ont œuvré avec moi à la paillasse, notamment Mathilde pendant ces quelques semaines de stage et les deux Delphine(s) qui ont assisté certaines de mes manips avec la plus grande attention. Merci aux membres des plateformes de la SBR (Génomique, Imagerie, Cytométrie en flux, etc.) pour votre professionnalisme. Merci à tout ceux qui nous rendent les tâches

administratives moins pénibles, je pense notamment à Céline, Brigitte et Christine, Béatrice et Nathalie.

Merci à tous les étudiants et doctorants que j'ai rencontré durant ma thèse. Merci notamment à Domi B et Fred, les deux ursidés du groupe, de m'avoir ouvert les portes de votre grotte en m'accueillant dans le bureau. Merci aussi à Noan, de m'avoir armé pour me défendre dans ce terrain hostile. Finalement, le panda et l'ours n'étaient pas si féroces que ça ! Merci à Greg de nous faire part de tes pensées philosophiques. Merci à toi Marie, pour ton sourire et ton entrain, notre trio JJC restera un de mes plus beaux souvenirs. Je te souhaite bon courage pour les derniers mois et surtout beaucoup de bonheur avec mini-toi ! Merci aussi à Léa, ensemble dans nos premiers et nos derniers mois de vie étudiante, depuis l'IUT de Brest jusqu'à Roscoff. C'est toujours un plaisir d'échanger avec toi, et je te souhaite une belle fin de thèse ! Merci également à toutes les personnes qui ont ponctué le quotidien par leur passage dans le groupe plancton, notamment Camille P, Laura, Joanne, Tristan, Loïc ou David. Bonne continuation aux actuels doctorants Laure A, Margot et Solène, la route n'est pas si longue que ça, alors profitez-en bien ! Et désolé à tous ceux que j'aurais oublié.

Enfin, une attention toute particulière à mes acolytes, Justine, Théophile et Hugo. Dans les bons, comme les mauvais moments, vous étiez toujours fidèles aux rendez-vous. Plus que moi d'ailleurs, si l'on considère les derniers mercredi marché... promis, je me rattraperais aux beaux jours ! Hugo, merci pour ta gentillesse, ta malice, ta douceur et tes baguettes de pains. Pour un parisien, tu te défends pas mal, alors ne changes rien ! Mise à part peut-être tes chaussons au bureau... quoi que, ça va peut être devenir une nouvelle tendance ! Théophile, malgré ton « sens de la propriété », tu acceptas tout de même de partager ton bureau, et me proposa quasi quotidiennement tes tablettes de chocolat, tes gouters, etc. Finalement, tu n'es pas si perso que ce que peut laisser penser ta chaise de bureau et ce fut très agréable de partager tout ça avec toi. Ça va me manquer ! Enfin, Justine Soazig, tu as su faire mentir les clichés de tes origines sudistes en balayant, tel un revers de Federer, nombre d'entre eux... même celui du soi-disant talent pour la pétanque ;) Merci pour les innombrables bons moments passés durant ces années Roscovites. Des barbecues (bi)hebdomadaires aux soirées AJC, ça aura toujours été un plaisir de les partager avec toi. Je n'oublie pas non plus ton soutien sans faille dans les moments plus difficiles, c'est à ce genre d'attention qu'on reconnaît les amitiés de valeur. Merci pour tout ! Et je te souhaite un bel avenir, tu le mérites vraiment :)

Je remercie également mes amis du lycée, de la fac de Brest ou d'Ouessant, qui m'ont permis de m'évader le temps d'un weekend ou d'une soirée, d'un concert, d'un festival, d'un fest-noz, d'un resto, d'un match des Albatros, d'une journée à la plage, ou d'une sortie en mer. Quel bonheur de partager tous ces moments avec vous !

Mes remerciements les plus profonds sont adressés à mes parents. Merci de m'avoir bercé de tant d'amour, merci pour votre éducation, merci de tous vos sacrifices qui m'ont permis de faire de longues études. Inconsciemment, c'est probablement grâce à vous que j'ai choisi cette voie : merci Maman pour ton insularité qui m'a donné le goût de la mer, merci Papa de m'avoir transmis ton appétit de la Science. Papa, il y a trois ans, je partageais avec toi l'excitation de ma première année de thèse, aujourd'hui j'aurai tellement aimé que tu sois là pour partager tant d'autres choses avec toi. Tu me manques comme jamais. Je remercie également infiniment ma formidable fratrie et belle fratrie : Gwendoline, Marc, Bréval, Paskell et Alex (+Julio). Merci pour leur soutien à ma marraine, mes oncles et tantes, cousins et cousines. Merci également à ma belle famille.

Enfin, mes remerciements les plus tendres vont vers toi, Vincent, mon fiancé moderne. Merci de ton soutien sans faille durant ces 6 belles années, merci de ta bonne humeur, merci de m'avoir donné la chance de devenir tata (gros bisous à Marie et Tifenn), merci de tous ces projets fous qui rythment notre quotidien, merci de ton Amour.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	i
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTE DES ABREVIATIONS	xv

CHAPITRE 1 : Introduction générale : phytoplancton et bactéries, deux acteurs majeurs de la microflore océanique

1

1. Les bactéries pélagiques marines	2
1.1. <i>Diversité et classification des bactéries</i>	2
1.2. <i>Diversité et écologie des bactéries pélagiques marines</i>	6
1.2.1. Les principaux taxons bactériens pélagiques.....	6
1.2.1.1. Le phylum des Proteobacteria	7
1.2.1.1.1. La classe des Alphaproteobacteria	7
1.2.1.1.2. Les <i>Gammaproteobacteria</i>	9
1.2.1.2. Le phylum des <i>Bacteroidetes</i>	10
1.2.1.3. Le phylum des <i>Actinobacteria</i>	11
1.2.1.4. Le phylum des <i>Cyanobacteria</i>	12
1.2.1. Diversité culturelle, le sommet de l'iceberg	13
1.3. <i>Mode de vie des bactéries dans l'environnement aquatique</i>	15
1.3.1. Différents types trophiques	15
1.3.2. Entre attachement et vie sous forme libre	15
1.3.3. Cohabitation entre bactéries et autres organismes.....	17
2. Le phytoplancton marin	21
2.1. <i>Définitions</i>	21
2.1.1. Microalgues procaryotes.....	22
2.1.2. Microalgues eucaryotes et le cas particulier des diatomées.....	23
2.1.2.1. Une classification polyphylétique complexe.....	23
2.1.2.2. Origine des microalgues eucaryotes et des diatomées : un lien ancestral avec les bactéries	28
2.1.3. Les efflorescences algales	31
2.2. <i>Importance écologique du phytoplancton et des diatomées</i>	35

2.2.1.	Sur une courte échelle de temps (durant leur cycle de vie).....	35
2.2.2.	A moyen terme (directement après leur cycle de vie)	39
2.2.3.	A long terme (sur plusieurs siècles à milliards d'années)	41
2.2.4.	Les microalgues : quand l'écologie inspire une économie.....	41
3.	Interactions entre microalgues et bactéries.....	45
3.1.	<i>Nature des interactions : « pour le meilleur et pour le pire ? »</i>	<i>47</i>
3.2.	<i>Bactéries couramment associées aux microalgues et tendances dans la nature de leurs actions.....</i>	<i>54</i>
3.3.	<i>Spécificité des interactions entre bactéries et microalgues eucaryotes.....</i>	<i>60</i>
3.3.1.	Interactions avec les cyanobactéries	60
3.3.2.	Interactions avec les haptophytes.....	62
3.3.3.	Interactions avec les dinoflagellés	64
3.3.4.	Interactions avec les raphidophytes	67
3.3.5.	Interactions avec les diatomées	69
3.4.	<i>Exemples d'applications biotechnologiques inspirées des interactions entre bactéries et microalgues.....</i>	<i>72</i>
4.	Objectifs de la thèse.....	75
CHAPITRE 2 : Diversité des bactéries épibiontes isolées de deux genres de diatomées : <i>Chaetoceros</i> et <i>Thalassiosira</i>.....		
79		
1.	Contexte de l'étude	81
1.1.	<i>Pourquoi s'intéresser aux bactéries physiquement attachées aux cellules algales ?.....</i>	<i>81</i>
1.2.	<i>Pourquoi comparer les communautés bactériennes épibiontes issues d'interactions à long terme avec celles issues d'interactions à court terme ?.....</i>	<i>83</i>
1.3.	<i>Différentes méthodes testées pour l'isolement des bactéries attachées aux microalgues....</i>	<i>84</i>
1.4.	<i>Approches utilisées pour identifier les bactéries épibiontes.....</i>	<i>85</i>
2.	Points techniques.....	87
2.1.	<i>Isolement de bactéries épibiontes à partir de microalgues, par micropipetages successifs</i>	<i>87</i>
2.1.1.	Préparation de pipettes Pasteur effilées	87
2.1.2.	Stérilisation du matériel	87
2.1.3.	Préparation des milieux de culture	88
2.1.4.	Isolement de cellules de microalgues (« single cell »).....	89
2.2.	<i>Analyse des cultures par cytométrie en flux et purification des bactéries épibiontes cultivées.....</i>	<i>91</i>

2.3.	<i>Déréplication des cultures de bactéries épibiontes par MALDI-TOF</i>	92
2.4.	<i>Identification des bactéries</i>	93
2.4.1.	Lyse bactérienne par traitement chimique et thermique.....	93
2.4.2.	Amplification par PCR du gène codant l'ARNr 16S.....	94
2.4.3.	Amplification par PCR des gènes codant pour l'ARNr 18S, la région D1-D3 du LSU et la région <i>rbcl</i>	95
2.4.4.	Séquençage par la méthode de Sanger.....	96
2.4.5.	Analyse des séquences nucléotidiques et phylogénie.....	96
2.4.6.	Comparaison des communautés bactériennes à l'aide du logiciel Fast Unifrac.....	97
3.	Etude préliminaire : quelles microalgues choisir?	97
4.	Article	101
CHAPITRE 3 : Epibiontes de microalgues, une source de nouveaux taxons bactériens...		127
1.	Contexte de l'étude	129
2.	Etude d'une souche correspondant à un nouveau genre au sein du clade des <i>Roseobacter</i>	130
3.	Article	132
4.	Point technique : adaptation des méthodes classiques de caractérisation pour les souches bactériennes à croissance lente	149
4.1.	<i>Analyse de l'activité enzymatique d'une souche bactérienne à croissance lente</i>	149
4.2.	<i>Analyse de la susceptibilité aux antibiotiques</i>	150
4.3.	<i>Détermination des optimums de croissance</i>	151
5.	Autres bactéries épibiontes cultivées présentant un intérêt taxonomique	152
6.	Conclusion	159
CHAPITRE 4 : Rôle des bactéries épibiontes dans les interactions avec <i>C. danicus</i> et <i>T. delicatula</i>		163
1.	Contexte de l'étude	165
2.	Methodologie	168
2.1.	<i>Méthodes d'axénisation de cultures microalgales</i>	168
2.2.	<i>Contrôle de l'axénie</i>	170
2.3.	<i>Expériences de co-cultures</i>	171

2.3.1.	Préparation des pré-cultures	171
2.3.1.	Préparation des mono-cultures et co-cultures	172
2.3.2.	Prélèvements et suivi de la croissance algale et bactérienne	173
3.	Résultats.....	173
3.1.	<i>Axénisation des cultures algales</i>	<i>173</i>
3.2.	<i>Expériences de co-cultures</i>	<i>174</i>
4.	Pour aller plus loin, la transcriptomique.....	183
4.1.	<i>La transcriptomique dans le cas particulier des interactions microalgues-bactéries.....</i>	<i>183</i>
4.1.1.	Récolte de cellules pour extraction d'ARN : rapidité et efficacité	183
4.1.2.	Extraction des ARN totaux.....	186
4.1.3.	Analyse de la qualité des ARN totaux extraits	186
4.1.4.	Purification des ARN totaux pour obtenir des ARNm bactériens et algaux.....	188
4.1.4.1.	Elimination des traces d'ADN.....	188
4.1.4.2.	Diminution de la quantité relative d'ARNr	188
4.2.	<i>Mise au point de la technique d'obtention d'ARN.....</i>	<i>192</i>
4.2.1.	Récolte des cellules.....	192
4.2.2.	Extraction de l'ARN et élimination des traces de l'ADN co-extrait	193
4.2.3.	Analyse des ARN extraits	194
4.2.4.	Bilan de la mise au point	195
7.	Conclusion	198
 CHAPITRE 5 : Discussion générale et perspectives.....		201
1.	Sélection des microalgues d'intérêt, de nouveaux éléments à considérer.....	203
2.	Bactéries et diatomées : et si l'union faisait la force ?	204
3.	Comment expliquer l'apparente spécificité des taxons bactériens vis-à-vis des taxons microalgaux ?	205
4.	La richesse taxonomique des bactéries épibiontes.....	207
5.	Identification d'interactions fortes.....	210
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		215
 ANNEXE		253

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique du domaine des bactéries réalisé à partir de l'alignement concaténé des gènes codant pour 31 protéines largement conservées.	3
Figure 2 : Seuils retenus pour classer une souche à caractériser avec son plus proche représentant bactérien décrit (= souche de référence).....	5
Figure 3 : Contribution des groupes bactériens majeurs à la composition de la communauté bactérienne pélagique globale.....	7
Figure 4 : Vision schématique des styles de vie complexes des bactéries aquatiques, tel un réseau microbien étroitement établi entre les bactéries libres et celles attachées sur des surfaces..	17
Figure 5 : Différents mécanismes bactériens de mobilité qui s'appuient sur des surfaces. ...	18
Figure 6 : Distribution des différents compartiments du plancton, selon leur niveau trophique, leur taille et leur abondance.	22
Figure 7 : Schématisation phylogénétique de la distribution polyphylétique des microalgues eucaryotes parmi les groupes majeurs d'eucaryotes, modifié à partir de Worden <i>et al.</i> (2015), d'après une analyse phylogénétique de Burki & Keeling (2014).	24
Figure 8 : Représentants des quatre grands groupes de diatomées (Round <i>et al.</i> , 1990, Kröger & Poulsen, 2008).	25
Figure 9 : Classifications des diatomées proposées par : (a) Ruggiero <i>et al.</i> (2015) et par (b) Medlin (2016)	26
Figure 10 : Représentation de l'acquisition de plaste chez la cellule eucaryote par endosymbiose primaire d'une cyanobactérie, d'après Armbrust, 2009.....	28
Figure 11 : Représentation schématique de l'évolution des diatomées, d'après Bowler <i>et al.</i> (2010).....	29
Figure 12 : Apparition des diatomées au cours de l'Histoire de la Terre et grandes étapes de l'apparition de l'oxygène.	31
Figure 13 : Photo satellite d'une efflorescence phytoplanktonique de coccolithophores, responsable de la coloration de l'eau au large de la Bretagne.	33

Figure 14 : Organisation des réseaux microbiens dans l'écosystème marin (Modifié d'après Azam & Malfatti, 2007).....	35
Figure 15 : Planche comprenant trois cent cellules de diatomées montées individuellement à la main.	37
Figure 16 : Cycle de vie de la diatomée <i>Seminavis robusta</i>	38
Figure 17 : Représentation d'une diatomée et des mécanismes cellulaires couplant la photosynthèse et la respiration dans cet organisme.....	39
Figure 18 : Différents flux de carbone provenant de la neige marine et des microorganismes qui la compose, d'après Azam & Malfatti (2007).....	40
Figure 19 : Cycle de bioressources à base de microalgues.	42
Figure 20 : Combinaisons des différentes interactions écologiques possibles entre deux organismes, d'après Faust & Raes (2012).	46
Figure 21 : Différentes interactions entre les bactéries et les microalgues.....	48
Figure 22 : D'après Cooper & Smith (2015), inventaire des approches utilisées pour étudier les interactions microalgues-bactéries et principaux échanges de métabolites décelés.	53
Figure 23 : Caractéristiques physiologiques des bactéries appartenant au clade des <i>Roseobacter</i> impliqués dans leur association avec le phytoplancton et les matériaux phytodétritaux (Buchan <i>et al.</i> , 2014).	57
Figure 24 : Caractéristiques physiologiques des <i>Flavobacteriia</i> impliquées dans leur association avec le phytoplancton et la matière organique dérivée du phytoplancton (Buchan <i>et al.</i> , 2014).	59
Figure 25 : Un possible mécanisme expliquant la lyse de <i>P. globosa</i> par le composé algicide produit par l'actinobactérie <i>S. alboflavus</i> RPS..	63
Figure 26 : Arbre phylogénétique représentant le domaine des bactéries et mettant en avant les taxons hétérotrophes les plus communément rencontrés dans les associations avec des diatomées (cercle extérieur).	68
Figure 27 : Isolement de cellules de diatomées par pinces optiques..	84
Figure 28 : Stratégie mise en place dans l'approche culturale d'étude de la diversité des bactéries attachées à la surface des cellules algales.	86
Figure 29 : Stratégie mise en place dans l'approche moléculaire d'étude de la diversité des bactéries attachées à la surface des cellules algales.	86

Figure 30 : Préparation des pipettes pasteurs effilées.	87
Figure 31 : Isolement de cellules microalgales au microscope inversé par micropipetage à l'aide d'une pipette Pasteur et dans un environnement stérile (hotte à flux laminaire, instruments stérilisés).....	91
Figure 32 : Maldi Biotyper™ utilisé pour établir une empreinte moléculaire des différentes bactéries cultivées isolées.	92
Figure 33 : Analyse microscopique de cellules de <i>Chaetoceros danicus</i> RCC 2656 marquées au DAPI.	98
Figure 34 : Evolution de la détection des taxons procaryotes entre 1992 et 2012 dans la base donnée SIVA REF 114 correspondant à des nouvelles espèces (a) et à des nouveaux genres (b), d'après Yarza <i>et al.</i> , (2014).	129
Figure 35 : Evolution du nombre de nouveaux genres bactériens affiliés au clade des <i>Roseobacter</i> dans la famille des <i>Rhodobacteraceae</i> entre 1991 et 2016	131
Figure 36 : Lecture des galeries API ZYM pour la souche KC90B ^T	150
Figure 37 : Suivi de la croissance bactérienne de la souche KC90B ^T dans du milieu MB/2 à différents pH (4,5 à 10 par incrémentation de 0,5) par cytométrie en flux.....	151
Figure 38 : Arbre phylogénétique réalisé par Neighbour-Joining (NJ), à partir d'un alignement de séquences nucléotidiques codant l'ARNr 16S qui indique la position des souches bactériennes KC41A et KC41B et de proches taxons bactériens..	155
Figure 39 : Arbre phylogénétique réalisé par Neighbour-Joining (NJ), à partir d'un alignement de séquences nucléotidique codant l'ARNr 16S qui indique la position de la souche bactérienne KC56 et de proches taxons bactériens.....	156
Figure 40 : Arbre phylogénétique réalisé par Neighbour-Joining (NJ), à partir d'un alignement de séquences nucléotidique codant l'ARNr 16S qui indique la position de la souche bactérienne KC60 et de proches taxons bactériens.....	157
Figure 41 : Arbre phylogénétique réalisé par Neighbour-Joining (NJ), à partir d'un alignement de séquences nucléotidique codant l'ARNr 16S qui indique la position de la souche bactérienne KC69 et de proches taxons bactériens.....	158
Figure 42 : Quadrillage d'une cellule de Malassez	172
Figure 43 : Suivis de croissance algale sur des mono-culture de <i>C. danicus</i> RCC 2565 (en bleu clair) et des co-cultures entre cette diatomée et la bactérie (A-C) <i>Sulfitobacter</i> sp. KC39	

(en orange), (D-F) <i>Marinobacter</i> sp. KC32B (en vert), (G,H) <i>Algimonas</i> sp. KC7B (en rouge). Les suivis ont été réalisés en microplaques 48 puits (volume de 500µL).....	177
Figure 44 : Suivis de croissance algale sur des mono-culture de <i>C. danicus</i> RCC 2565 (bleu clair) et des co-cultures entre cette diatomée et la bactérie <i>Marinobacter</i> sp. KC32B (A), <i>Sulfitobacter</i> sp. KC39 (B), <i>Algimonas</i> sp. KC7B (C). Les suivis ont été réalisés en flasques ventilées dans un volume de 30 mL.....	178
Figure 45 : Suivis de croissance algale sur des mono-culture de <i>C. danicus</i> RCC 2565 (bleu) et des co-cultures entre cette diatomée et la bactérie <i>Sulfitobacter</i> sp. KC39 (orange). Trois suivis indépendants sont présentés (tests F6, F7 et F8) et correspondent à des suivis réalisés dans des volumes respectifs de 250, 200 et 500 mL.....	179
Figure 46 : Suivis de croissance algale sur des mono-culture de <i>C. danicus</i> RCC 2565 (en bleu clair) et des co-cultures entre cette diatomée et la bactérie (A) <i>Sulfitobacter</i> sp. KC39 en orange, (B) <i>Sulfitobacter</i> KC38B en bleu foncé, (C) <i>Micrococcus</i> sp. KC23 en violet, (D) <i>Marinobacter</i> sp. KC31 en vert. Les résultats de croissances sont issus du test F9, réalisés dans 400 mL (flasque ventilée de 1 L).....	181
Figure 47 : Suivi de croissance algale sur des mono-culture de <i>C. danicus</i> RCC 2565 (bleu clair) et des co-cultures entre cette diatomée et la bactérie <i>Sulfitobacter</i> sp. KC39 (orange). Les résultats de croissance correspondent au suivi F10, réalisé en volumes de 250 mL (flasque ventilée de 1L).	181
Figure 48 : Rôle des ARNm, ARNr et ARNt dans la synthèse protéique. La transcription (qui se produit dans le noyau) et la traduction (dans le cytoplasme au niveau des ribosomes) sont deux étapes indispensables à formation de protéines. (Source : http://www.mheducation.co.uk/he/chapters/9780071102087.pdf)	184
Figure 49 : Fragmentation de l'ARNr 23S.....	187
Figure 50 : Cellule de <i>C. danicus</i> RCC 2565, obtenue par microscopie optique.....	189
Figure 51 : Analyse de l'efficacité de la Turbo DNase sur un extrait d'ARN obtenu à partir de cellules de <i>C. danicus</i> RCC 2565.	193
Figure 52 : Analyse Agilent « Prokaryote Total RNA Nano » sur l'ARN bactérien avant Turbo DNase	195
Figure 53 : Analyse Agilent « Prokaryote Total RNA Nano » sur l'ARN bactérien après Turbo DNase	195

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Définition des différents types d'interactions écologiques selon Prescott <i>et al.</i> , (2003) et Faust & Raes (2012).....	46
Tableau 2 : Quelques dinoflagellés impliqués dans des efflorescences algales qui ont été étudiés dans le cadre d'interactions avec des bactéries.....	65
Tableau 3 : Composition du milieu LNHM modifié.....	88
Tableau 4 : Solution de vitamines.....	89
Tableau 5 : Solution d'oligo-éléments	89
Tableau 6 : Bilan de la présence de bactéries épibiontes cultivables sur les différentes microalgues sélectionnées.....	100
Tableau 7 : Susceptibilité aux antibiotiques de <i>S. algicola</i> KC90B ^T	151
Tableau 8 : Souches bactériennes isolées de la surface de différentes cellules algales en culture et leur plus proche représentant décrit identifié par Blastn (NCBI)..	152
Tableau 9 : Souches bactériennes isolées de la surface de différentes cellules algales (prélevées dans l'eau de mer au large de Roscoff) et leur plus proche représentant décrit identifié par Blastn (NCBI)..	153
Tableau 10 : Souches bactériennes isolées de la surface de différentes cellules algales en culture (autres que <i>Thalassiosira delicatula</i> RCC 2560 et <i>Chaetoceros danicus</i> RCC 2565) et leur plus proche représentant décrit identifié par Blastn (NCBI).	154
Tableau 11 : Traitement des microalgues au mélange d'antibiotiques.....	169
Tableau 12 : Résultats des différentes co-cultures réalisées entre les souches de bactéries épibiontes et la culture axénique de <i>T. delicatula</i> RCC 2560.....	175
Tableau 13 : Résultats des différentes co-cultures réalisées entre les souches de bactéries épibiontes et la culture axénique de <i>C. danicus</i> RCC 2565..	176
Tableau 14 : Résultats des différentes co-cultures réalisées entre quelques souches de bactéries épibiontes d'intérêt et la culture axénique de <i>C. danicus</i> RCC 2565.....	179
Tableau 15 : Méthodes de purification des ARNm choisies selon les conditions expérimentales pratiquées dans le cadre de l'étude des interactions entre bactéries et microalgues.....	191

Tableau 16 : Sommaire des conditions à remplir pour la soumission d'échantillons d'ARN au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.....	192
Tableau 17 : Analyse quantitative et qualitative des ARN extraits.....	194
Tableau 18 : Concentration cellulaire (en cellules par mL) en bactéries et microalgues dans les différentes fractions de tailles obtenues sans filtration, après filtration à 11µm, à 3µm et à 0,2µm.....	197
Tableau 19 : Analyse des ARN bactériens avant (A) et après (B) traitement par DNase, sur différentes quantité de cellules bactériennes.	197
Tableau 20 : Microalgues de la collection de culture de Roscoff correspondant aux genres <i>Chaetoceros</i> et <i>Thalassiosira</i> , en plus des souches étudiées durant cette thèse (RCC 2565 et RCC 2560) et qui ont été isolées dans les eaux côtières de Roscoff.	204

LISTE DES ABREVIATIONS

AIA : Acide Indole 3-Acétique, indiquée IAA (Indole-3-Acetic Acid) dans les figures en anglais
ADN : Acide DéoxyriboNucléique
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
ATP : Adénosine TriPhosphate
AZP : AZaspiracid shellfish Poisoning (Intoxication par phycotoxine azaspiracide, qui a des effets diarrhéiques)
CAT : CATalase, enzyme impliquée dans la réduction du stress oxydatif
CO₂ : Dioxyde de carbone
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DMS : DiMéthylSulfure ou Sulfure de DiMéthyle
DMSP : DiMéthylSulfonioPropionate
DSMZ : de l'allemand « Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH » qui est la Collection de microorganismes et de cultures cellulaire d'Allemagne
EPA : Acide EicosaPentaénoïque
FISH : de l'anglais « Fluorescent In Situ Hybridization » ou hybridation in situ en fluorescence
GSH : Glutathion réduit, tripeptide impliqué dans la réduction du stress oxydatif
HAA : Hybridation ADN-ADN (ou DDH en anglais)
HAB : de l'anglais « Harmful Algal Bloom » ou efflorescence algale nuisible
HAQ : 4-hydroxy-2-alkylquinolines, molécule impliquée dans le QS
HHQ : 2-heptyl-4-quinolone, molécule impliquée dans le QS
HLA : Homosérines Lactones Acylées, indiqué AHL (Acyl homoserine lactones) dans les figures en anglais
INM : Identité Nucléotidique Moyenne (ou ANI en anglais)
MeSH : Méthanethiol
ML : Maximum Likelihood (maximum de vraisemblance)
MOD : Matière Organique Dissoute, indiquée DOM (Dissolved Organic matter) dans les figures en anglais
MOP : Matière Organique Particulaire, indiquée POM (Particulate Organic matter) dans les figures en anglais
MP : Maximum Parsimony (maximum de parcimonie)
Mpb : Méga paires de bases, soit 1 million de nucléotides

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NADPH : forme réduite du NADP
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NH₄ : Ammonium
NSP : Neurotoxic Shellfish Poisoning (Intoxication par phycotoxine neurotoxique)
O₂ : Dioxygène
OMG : de l'anglais « Oligotrophic Marine Gammaproteobacteria » ou groupe des Gammaproteobacteria marines oligotrophes
PCR : de l'anglais « Polymerase Chain Reaction » ou réaction en chaîne par polymérase
PQS : *Pseudomonas* quinolone signal ou 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline, molécule impliquée dans le QS
PR : Protéorhodopsine
PSP : Paralytic Shellfish Poisoning (Intoxication par phycotoxine paralysante)
QS : Quorum Sensing
RIN : RNA Integrity Number
ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène (ou Reactive Oxygen Species), provoquant un stress oxydatif
SAR (dans un contexte procaryote) : Différents groupes bactériens ont pour identité les trois lettres « SAR » suivies d'un numéro (par exemple : SAR11, SAR116, SAR86 ou SAR324) et correspondent à des bactéries incultivées ou difficile à cultiver comme *Pelagibacter ubique* qui était initialement nommé SAR11. La dénomination « SAR » faisant référence à la mer des Sargasses, lieu où ils ont été détectés pour la première fois.
SOD : SuperOxyde Dismutase, enzyme impliquée dans la réduction du stress oxydatif

CHAPITRE 1

**Introduction générale : phytoplancton et bactéries,
deux acteurs majeurs de la microflore océanique**

Dans les océans, comme dans de nombreux autres environnements, le rôle des micro-organismes est indispensable à la vie. Les micro-organismes océaniques sont reconnus pour jouer un rôle important dans les cycles du carbone, de l'azote et du soufre. En effet, d'importantes quantités de carbone (C) sont perpétuellement métabolisées à travers tous les océans et cela est principalement réalisé par l'intermédiaire du phytoplancton et des procaryotes hétérotrophes. La production primaire (environ 40 Gt de C par an) et la respiration hétérotrophe (environ 37 Gt de C par an) comptabilisent à eux deux plus de la moitié du carbone métabolisé dans les océans, et uniquement au niveau de la couche euphotique² (del Giorgio & Duarte, 2002).

Dans cette zone très active, le carbone organique dissout et particulaire, dérivé d'exsudats de phytoplancton ou de la lyse cellulaire est une source d'énergie majeure utilisée pour la respiration et la croissance des procaryotes hétérotrophes (Hellebust, 1965; Karl *et al.*, 1998; Mague *et al.*, 1980). Alors que les procaryotes hétérotrophes et les communautés phytoplanctoniques sont connus pour interagir à travers des mécanismes complexes (Azam & Malfatti, 2007), on s'attend à ce que ces compartiments soient très étroitement liés (interdépendants) dans l'environnement planctonique. En effet, l'abondance et la production des procaryotes hétérotrophes sont habituellement corrélés avec la biomasse du phytoplancton (mesuré en fonction de la chlorophylle a) et la production primaire (Bird & Kalff, 1984; Cole *et al.*, 1988; Gasol & Duarte, 2000; Simon *et al.*, 1992). Ainsi, des mécanismes autres que les émissions extracellulaires sont nécessaires pour équilibrer la demande bactérienne (excrétions du zooplancton, surplus de nutriments, etc.).

Dans ce contexte où beaucoup de choses restent à être élucidées, il est donc important de s'intéresser aux interactions entre bactéries et microalgues dans l'environnement marin, pour mieux comprendre la complexité de cet écosystème. En effet, l'environnement immédiat des cellules phytoplanctoniques marines (ou phycosphère) est considérée comme un environnement physiquement et chimiquement distinct de l'eau de mer environnante qui pourrait favoriser la croissance de taxons microbiens spécifiques, instaurant ainsi une dynamique d'interactions dont le fonctionnement permet d'expliquer la complexité des réseaux trophiques marins.

² La zone euphotique (ou photique ou épipélagique) est la zone aquatique allant de la surface à une profondeur où l'intensité lumineuse résiduelle rend l'activité photosynthétique possible, c'est-à-dire jusqu'à environ 200m.

1. Les bactéries pélagiques marines

1.1. Diversité et classification des bactéries

Le monde bactérien avec lequel nous partageons la planète est le résultat de près de 4 milliards d'années d'évolution. Des taxonomistes microbiens ont longtemps cherché à définir la diversité bactérienne globale en faisant des estimations sur le nombre d'espèces existantes (Curtis *et al.*, 2002; Dykhuizen, 1998; Mora *et al.*, 2011), mais les contraintes techniques et aussi l'ambiguïté autour de la définition de l'espèce chez les bactéries ont résulté à des chiffres extrêmement différents. C'est pourquoi, une estimation ferme de toutes les espèces microbiennes existantes est maintenant reconnue comme une tâche impossible à réaliser (Madigan *et al.*, 2010; Youssef *et al.*, 2015). En aout 2015, on recensait plus de 14800 espèces procaryotes décrites représentant plus de 2600 genres³, définis principalement sur la base de la séquence du gène codant pour l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr) 16S. Néanmoins, la majorité des procaryotes demeure encore incultivée et de nombreuses études d'écologie classique ont montré que la plupart des communautés d'organismes était composée de quelques espèces très abondantes et de nombreuses espèces rares (Magurran & McGill, 2011).. En combinant l'ensemble de ces éléments, il devient alors évident que la diversité des bactéries décrites à l'heure actuelle n'est qu'une infime partie de la réelle diversité qui occupe la planète Terre, et qui serait estimée selon Madigan *et al.* (2010) à des milliers, voire peut-être cent mille à 1 million d'espèces bactériennes.

La classification des bactéries présentée dans cette partie n'est pas figée et est très largement débattue et enrichie notamment lors de la découverte de nouveaux taxons qui permettent de définir de nouveaux ordres ou de nouvelles familles (Spring *et al.*, 2015).

³ Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany, Prokaryotic Nomenclature Up-to-date [Aout 2015] (<http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date>)

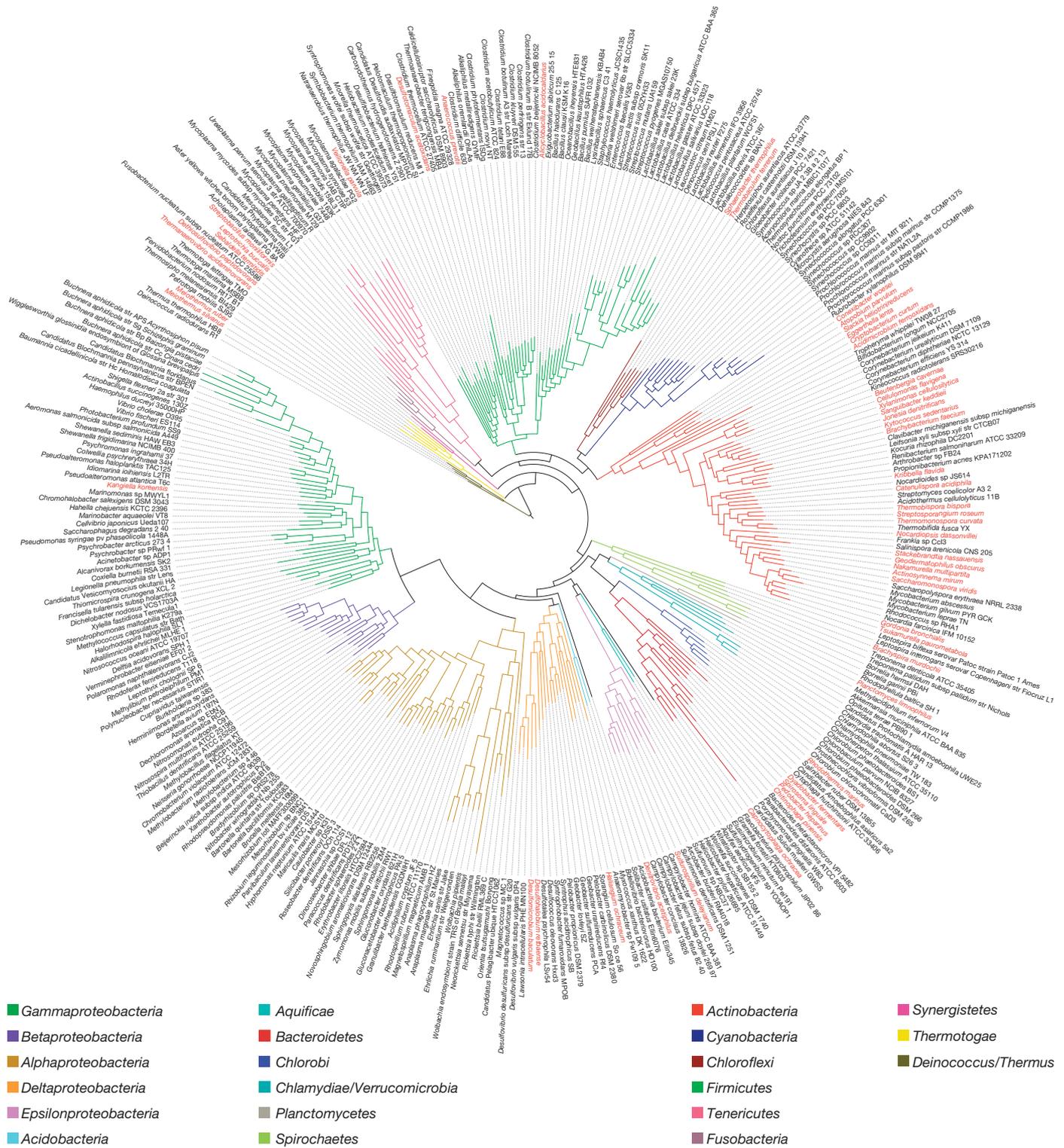


Figure 1 : Arbre phylogénétique du domaine des bactéries réalisé à partir de l'alignement concaténé des gènes codant pour 31 protéines largement conservées. Les embranchements se distinguent par un code couleur (détaillé sous l'arbre). L'identité taxonomique des espèces utilisées pour réaliser cet arbre est mentionnée dans le cercle externe et les génomes des taxons indiqués en rouge ont été séquencés dans le cadre du projet GEBA (Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea) (Wu *et al.* 2009).

Rappé & Giovannoni, (2003) ont estimé qu'il y avait environ 52 phyla identifiables majeurs (dont 26 seulement comprenaient des représentants cultivés). Plus récemment, ce chiffre a été considérablement revu à la hausse avec un total de près de 1000 phyla bactériens (Yarza *et al.*, 2014). Un grand nombre de ces phyla n'aurait pas encore été décrit ou comprend des bactéries décrites mais qui sont classées à tort et pour plus de simplicité dans des phyla déjà existants. Et beaucoup de ces phyla ne comprendrait qu'une faible diversité, avec souvent 1 seule classe, composée d'un seul ordre et la plupart des ordres refermant une seule famille (Yarza *et al.*, 2014). La Figure 1 présente les phyla les plus souvent rencontrés dans les études de diversité bactérienne. Même si elle ne présente que 21 des phyla bactériens, cette phylogénie témoigne d'une diversité assez impressionnante. On y retrouve les phyla des différentes protéobactéries (*Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-* et *Epsilonproteobacteria*), mais aussi les *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, les *Cyanobacteria* ou encore les *Firmicutes*.

La classification bactérienne répond à des règles qui évoluent au fil du temps pour s'adapter à l'évolution des connaissances et des outils. Actuellement, un nouvel isolat bactérien est considéré comme une nouvelle espèce s'il est suffisamment différent des autres espèces décrites. Pour parvenir à la validation formelle du statut taxonomique (nouveau genre, nouvelle espèce), une description détaillée des caractéristiques de l'organisme doit être réalisée en mettant en évidence ses traits distinctifs. Il s'agit essentiellement de critères moléculaires (pour plus de détails voir paragraphe suivant), qui sont complétés par des analyses morphologiques, biochimiques, métaboliques, ainsi que la détermination des conditions physiologiques de croissance (Tindall *et al.*, 2010). Différents sites internet permettent l'accès à la liste des espèces bactériennes continuellement mise à jour, comme sur www.bacterio.net (Euzéby, 1997; Parte, 2014) ou sur le site du Leibniz-Institute DSMZ (<https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>).

Actuellement, pour classer les bactéries, des critères moléculaires officiels sont utilisés et comprennent la comparaison des séquences nucléotidiques codant pour l'ARNr 16S et éventuellement l'Hybridation ADN-ADN⁴ (HAA). En premier lieu, la séquence codant pour l'ARNr 16S [aussi complète que possible et de taille au moins supérieure à 1300 nucléotides

⁴ Cette méthode ne mesure pas directement l'identité des séquences, mais plutôt l'efficacité d'hybridation entre les molécules d'ADN (acide désoxyribonucléique)

avec moins de 0,5% d'ambiguïté (Stackebrandt *et al.*, 2002)] de la bactérie est comparée à celles des bactéries déjà décrites. Selon le pourcentage d'identité avec le plus proche voisin, il est possible d'en tirer différentes conclusions (Figure 2). Par exemple, si le pourcentage d'identité de cette séquence est inférieur à 98,7-99% avec celle de la plus proche bactérie décrite, il s'agit potentiellement d'une nouvelle espèce (Stackebrandt & Ebers, 2006). S'il est supérieur, une étape d'HAA est nécessaire et si la valeur d'HAA entre les deux souches est supérieur à 70%, les deux souches sont considérées comme appartenant à la même espèce (Stackebrandt *et al.*, 2002; Wayne *et al.*, 1987). Cependant, la détermination de l'HAA est fastidieuse, et des études recommandent de la remplacer par l'utilisation de l'identité nucléotidique moyenne (INM) basée sur des comparaisons de génomes. Une valeur de HAA de 70% serait équivalente à une INM de 95-96% (Goris *et al.*, 2007; Konstantinidis *et al.*, 2006; Richter & Rosselló-Móra, 2009). Pour classer les bactéries dont les gènes codant pour l'ARNr 16S ont de très faibles pourcentages d'identité et qui pourraient correspondre à des nouveaux genres, familles, ordres, classes ou phyla, de nouveaux seuils ont récemment été proposés sur la base d'analyses statistiques faite à partir du 'Living Tree Project 102 data set' (Yarza *et al.*, 2014).

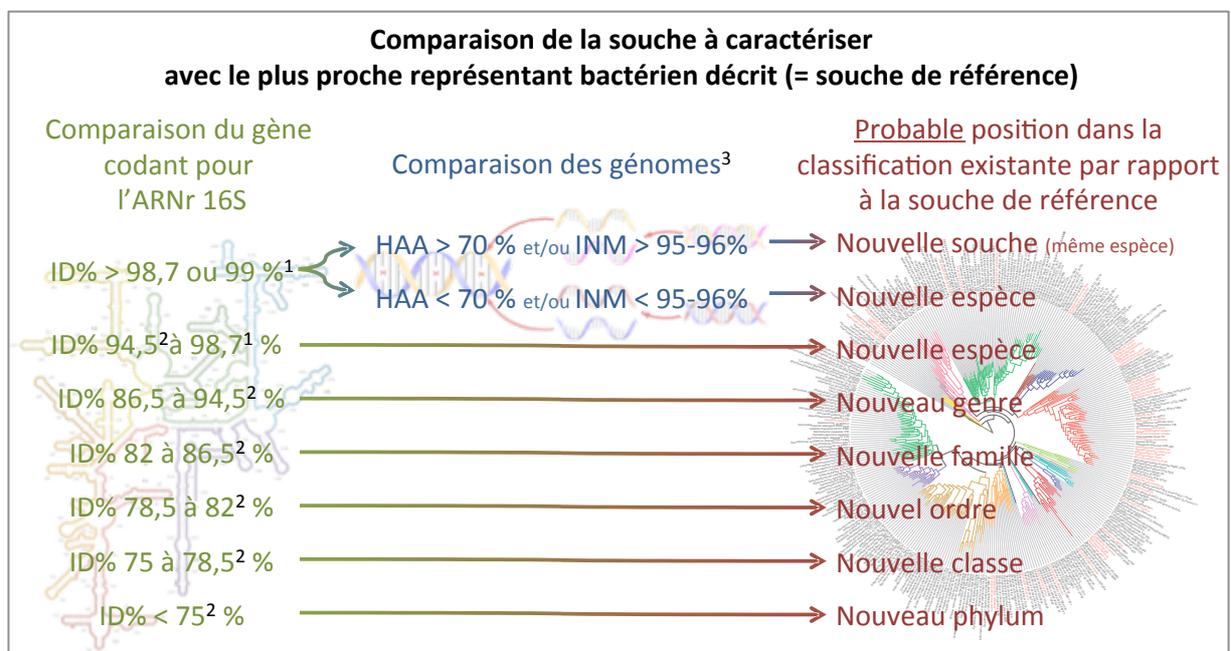


Figure 2 : Seuils retenus pour classer une souche à caractériser avec son plus proche représentant bactérien décrit (= souche de référence). En vert, les pourcentages d'identité du gène codant pour l'ARNr 16S (ID%). En bleu, les valeurs d'HAA et d'INM qui sont issues de la comparaison des génomes par un test moléculaire d'hybridation moléculaire et par un alignement des séquences génomiques, respectivement. Références bibliographiques pour les différents seuils employés : 1 (Stackebrandt & Ebers, 2006), 2 (Yarza *et al.*, 2014), 3 (Goris *et al.*, 2007; Konstantinidis *et al.*, 2006; Richter & Rosselló-Móra, 2009; Wayne *et al.*, 1987)

Cependant, même si ces seuils sont valables dans de très nombreux cas, ils sont néanmoins arbitraires et réaliser des analyses phylogénétiques de qualité (voir détail pour la réalisation de ces analyses dans Tindall *et al.*, 2010) demeure indispensable pour déterminer son affiliation précise et définir s'il s'agit d'une nouvelle espèce, d'un nouveau genre, etc. En effet, lorsque le pourcentage d'identité de leur séquence codant pour l'ARNr 16S se situe au voisinage des 95%, il n'est pas rare qu'il s'agisse non pas d'une nouvelle espèce, mais d'un nouveau genre. Par exemple, la séquence d'ARNr 16S de *Boseongicola aestuarii* BS-W15 partage 96,4% d'identité avec celle de son plus proche voisin décrit, *Profundibacterium mesophilum* JCM 17872 mais les analyses phylogénétiques appuyées par des différences phénotypiques et chimiotaxonomiques suggéraient de classer cette souche comme un genre distinct de *Profundibacterium* (Park *et al.*, 2014) .

1.2. Diversité et écologie des bactéries pélagiques marines

Les bactéries pélagiques correspondent aux bactéries qui occupent la colonne d'eau (du grec *pelagos* qui signifie « la haute mer »), par opposition au terme benthique pour les organismes vivant à proximité du fond. Les bactéries vivant dans les océans constituent l'une des communautés microbiennes les plus grandes et les plus actives de la planète (Whitman *et al.*, 1998). Ces bactéries possèdent des mécanismes enzymatiques qui gouvernent les flux biogéochimiques globaux essentiels à la vie (Falkowski *et al.*, 2008). Elles alimentent les cycles du carbone, du soufre et de l'azote, avec des conséquences importantes pour la composition des gaz à effets de serre dans l'atmosphère, mais aussi dans les efflorescences algales et l'acidification des océans (Azam & Malfatti, 2007; Hom *et al.*, 2015; Moran *et al.*, 2012; Zehr & Kudela, 2011) .

1.2.1. Les principaux taxons bactériens pélagiques

Dans les océans, la majorité des taxons bactériens pélagiques rencontrés jusqu'à présent appartient aux phylums des *Proteobacteria* (notamment les classes des *Alpha-* et *Gammaproteobacteria*), des *Bacteroidetes* (classes des *Cytophagia*, *Flavobacteriia*, *Bacteroidia*, *Sphingobacteriia*), des *Cyanobacteria* et celui des *Actinobacteria* (Kirchman, 2008; Zinger *et al.*, 2011). Même si l'abondance relative des différents groupes bactériens est difficile à évaluer dans l'environnement car elle peut fluctuer en fonction de la méthode

utilisée (Cottrell & Kirchman, 2000), des tendances se dégagent tout de même, comme indiqué dans la Figure 3.

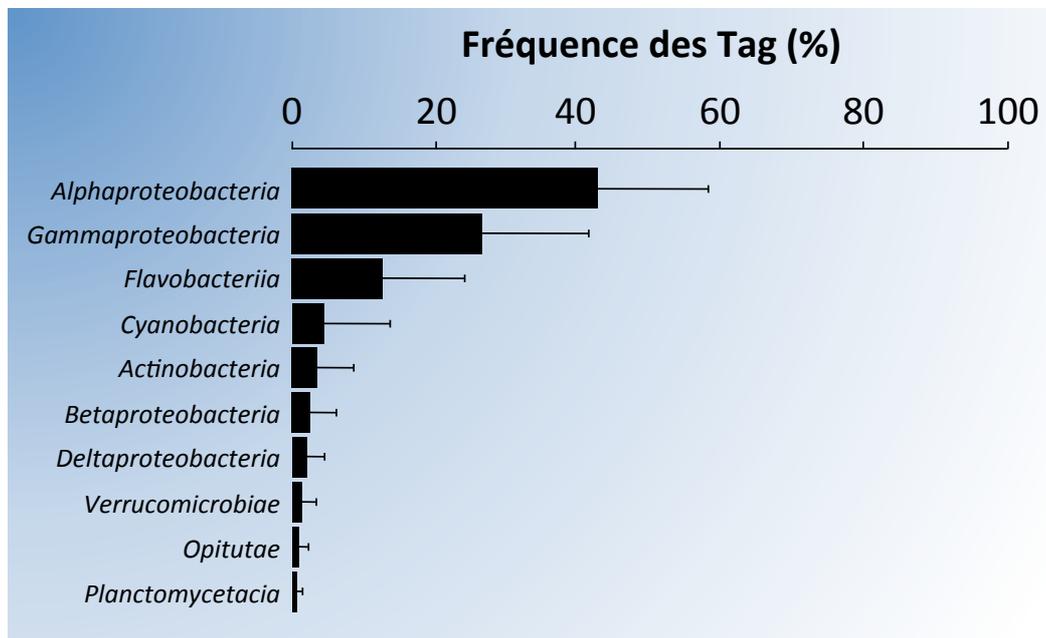


Figure 3 : Contribution des groupes bactériens majeurs à la composition de la communauté bactérienne pélagique globale. Moyenne des fréquences des séquences appartenant à chacun des 10 groupes bactériens les plus abondants dans le domaine pélagique. Les barres d'erreur représentent les valeurs des écart-types. Les écosystèmes anoxiques, ainsi que les cheminées hydrothermales ne sont pas pris en compte pour la composition de la communauté bactérienne moyenne, en raison de la plus petite taille des échantillons. Les niveaux taxonomiques présentés dans la figure ne sont pas nécessairement de même niveau, mais reflètent les niveaux les plus couramment employés pour étudier l'écologie et la diversité des bactéries marines. Représentation originale de Zinger *et al.* (2011)

1.2.1.1. Le phylum des Proteobacteria

1.2.1.1.1. La classe des Alphaproteobacteria

Les *Alphaproteobacteria* correspondent au groupe bactérien dominant dans les environnements marins côtiers, que ce soit lors des approches culturelles classiques (sur milieu relativement riche) ou lors des analyses quantitatives qui s'affranchissent de la culture (Gonzalez & Moran, 1997; Zinger *et al.*, 2011).

- L'apparition des méthodes d'étude de la diversité bactérienne qui s'affranchissent de la culture a permis de mettre en évidence un cluster bactérien ubiquiste dans les océans : les SAR11⁵ (Giovannoni & Stingl, 2005; Giovannoni, 1990; Mullins *et al.*, 1995; Rappé *et al.*, 1997). On estime qu'il y a près de $2,4 \cdot 10^{28}$ bactéries appartenant aux

⁵ Différents groupes bactériens ont pour identité les trois lettres « SAR » suivies d'un numéro (par exemple : SAR11, SAR116, SAR86 ou SAR324) et correspondent à des bactéries incultivées ou difficiles à cultiver. La dénomination « SAR » faisant référence à la mer des Sargasses, lieu où ils ont été détectés pour la première fois.

SAR11 dans les océans, ce qui en ferait le groupe microbien le plus abondant de toute la planète (Morris *et al.*, 2002). C'est un groupe très diversifié avec différents sous-clades, localisés à des profondeurs et des habitats différents. Ce n'est qu'en 2002, que la première bactérie appartenant à ce clade majeur a pu être cultivée (Rappé *et al.*, 2002). Depuis, plusieurs autres souches cultivées sont venues grossir les rangs des SAR11 (Connon & Giovannoni, 2002; Simu & Hagström, 2004; Song *et al.*, 2009). Son représentant cultivé le plus étudié est *Pelagibacter ubique* et il possède l'un des plus petits génomes pour un micro-organisme vivant sous forme libre. Il conserve néanmoins des gènes impliqués dans les mécanismes cellulaires fondamentaux, ce qui expliquerait son succès évolutif dans les océans (Giovannoni *et al.*, 2005).

- Parmi les *Alphaproteobacteria*, la famille des *Rhodobacteraceae* est la plus représentée avec une centaine de genres reconnus actuellement et qui sont répartis en 5 groupes phylogénétiques ou clades (les *Rhodobacter*, *Paracoccus*, *Rhodovulum*, *Amaricoccus*, et *Roseobacter*). Cette famille comprend des bactéries aquatiques qui sont fréquemment rencontrées dans les environnements marins. Elle comprend principalement des bactéries aérobies photo- et chimiohétérotrophes, mais aussi des bactéries pourpres non sulfureuses qui réalisent la photosynthèse dans des environnements anaérobies. Elles sont très impliquées dans les cycles biogéochimiques du carbone et de soufre, mais aussi dans la symbiose avec des micro- et macroorganismes aquatiques (Pujalte *et al.*, 2014).

Les membres du clade des *Roseobacter* sont retrouvés dans des environnements marins assez variés (incluant le plancton, le sédiment, la banquise, la surface des animaux, etc.) et constituent environ 20% des communautés bactériennes des eaux côtières, environ 15% des communautés bactériennes de la couche de mélange océanique et moins de 1% à des profondeurs inférieures à quelques centaines de mètres (Buchan *et al.*, 2005). Certains des membres du clade *Roseobacter* possèdent de la bactériochlorophylle a et sont des phototrophes anoxygéniques aérobies ou AAP (pour « aerobic anoxygenic phototrophs »). Des études ont montré que ce groupe était particulièrement important dans la transformation de composés tels que le DMSP⁶ qui

⁶ DMSP signifie diméthylsulfoniopropionate, et correspond à un composé produit principalement par le phytoplancton et les macroalgues dans l'océan. Il a plusieurs fonctions, dont celles de composé osmolyte, antioxydant, cryoprotectant, etc. (Choi *et al.*, 2015).

génère la production de DMS⁷ (Buchan *et al.*, 2005; Gonzalez & Bashan, 2000), caractéristique qui sera plus développée dans la partie 0 de ce chapitre. Les génomes de plusieurs membres des *Rhodobacteraceae* ont été séquencés. Le premier fut celui de *Silicibacter pomeroyi*, qui a des capacités intéressantes comme l'utilisation de composés inorganiques (monoxyde de carbone et des composés soufrés réduits), mais aussi des gènes favorisant les associations avec le plancton et les particules en suspension, tels que des gènes pour l'absorption de la matière organique dérivée du phytoplancton (Moran *et al.*, 2004).

- Comme pour le cluster des SAR11, les membres apparentés au cluster SAR116 des *Alphaproteobacteria* sont communément rencontrés dans les banques de clones, en particulier dans la zone euphotique, mais dans des proportions moindres que les SAR11 (Acinas *et al.*, 1999; Giovannoni & Stingl, 2005; Mullins *et al.*, 1995; Rappé *et al.*, 1997). Très peu d'informations existent sur ce cluster incultivé jusqu'en 2010 (Oh *et al.*, 2010b). Les analyses culturales et génomiques ont permis de déterminer qu'il s'agissait de bactéries présentant un métabolisme généraliste, lui conférant un rôle important dans le recyclage des nutriments dans l'océan, comme par exemple dans les cycles biogéochimiques du soufre, via la production de DMS provenant de la dégradation du DMSP (Choi *et al.*, 2015; Grote *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2010b).

1.2.1.1.2. Les *Gammaproteobacteria*

Il existe une assez grande diversité de *Gammaproteobacteria* marines caractérisées avec notamment des espèces appartenant aux genres *Vibrio*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Shewanella*, *Glaciecola*, *Oceanospirillum*, *Colwellia*, etc. (Giovannoni & Rappé, 2000). Ce sont des organismes ayant des potentiels de croissance rapide, et qui ont un style de vie adapté aux régimes nutritifs fluctuants (alternant entre zone eutrophes et oligotrophes), tels que sur des surfaces organiques ou dans les intestins des poissons. Cependant, il existe aussi des *Gammaproteobacteria* oligotrophes incapables de se développer sur milieu riche, tels que le groupe des OMG (pour Oligotrophic Marine *Gammaproteobacteria*) qui renferme des bactéries de très petite taille (Cho & Giovannoni,

⁷ DMS signifie sulfure de diméthyle, et correspond à gaz ayant un impact sur l'atmosphère et la régulation du climat.

2004). Et certains clades des *Gammaproteobacteria* ne comportent pas encore de représentant cultivé, comme par exemple le clade SAR86. Cependant, des analyses récentes de génomique environnementale ont permis de formuler certaines hypothèses sur ses caractéristiques métaboliques, qui permettront peut-être de le cultiver en laboratoire (Dupont *et al.*, 2012; Rusch *et al.*, 2013).

Le membre des *Gammaproteobacteria* le plus connu et étudié est probablement *Vibrio* spp., un bacille incurvé flagellé à croissance rapide. Il peut être isolé de l'eau de mer ou du sédiment, et est connu pour son impact en aquaculture et pour ses associations avec des organismes eucaryotes. Même si de nombreuses espèces de *Vibrio* ne sont pas pathogènes, certaines peuvent être pathogènes des poissons (*V. anguillarum*) ou causer des maladies chez l'homme comme le cholera (*V. cholerae*). D'autres espèces, comme *V. fischeri*, vivent de façon symbiotique dans les organes lumineux des poissons-phares (ou « flashlight fish ») ou des calamars, où ils émettent un signal bioluminescent.

1.2.1.2. Le phylum des *Bacteroidetes*

Le phylum des *Bacteroidetes* (autrefois connu sous l'appellation CFB pour « *Cytophaga – Flavobacteria – Bacteroides* ») est reconnu comme étant une composante importante du bactérioplancton marin (Kirchman, 2002). Ces bactéries sont très diversifiées et occupent de nombreux habitats (i.e. rumen, colon humain, lac, océans pélagiques, sédiments, cheminées hydrothermales, banquise, etc.). Ce groupe peut représenter près de la moitié du bactérioplancton détecté par FISH (hybridation *in situ* en fluorescence) en milieu océanique et être paradoxalement sous représenté dans d'autres analyses de diversité tels que les banques de clones (Cottrell & Kirchman, 2000). Les *Bacteroidetes* marins font régulièrement partie des organismes impliqués dans la dégradation de la matière organique de haut poids moléculaire telle que la cellulose ou la chitine (Kirchman, 2002). Ils sont particulièrement rencontrés dans les environnements riches en débris organiques et ont été souvent signalés comme étant associés à des efflorescences de microalgues (Hold *et al.*, 2001a; Riemann *et al.*, 2000; Sapp *et al.*, 2007a). En effet, les bactéries de ce groupe se développent préférentiellement sur des surfaces telles que des particules inertes ou des cellules algales. L'analyse du génome de nombreuses *Bacteroidetes* faite par Fernández-Gómez *et al.* (2013) a révélé diverses

adaptations leur permettant une croissance par attachement (protéines d'adhésion, mobilité par glissement), mais aussi toute une panoplie d'enzymes impliquées dans la dégradation de polymères (peptidases, glycoside hydrolases, glycosyl transferases, etc.). Pour survivre dans les environnements plus pauvre en matière organique, certaines *Bacteroidetes* possèdent des protéorhodopsines, qu'elles utilisent pour capter l'énergie lumineuse (Fernández-Gómez *et al.*, 2013).

1.2.1.3. Le phylum des *Actinobacteria*

En considérant la dernière révision de la classification du Bergey's, le phylum des *Actinobacteria* est divisé en 6 classes : *Actinobacteria*, *Nitriliruptoria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Thermoleophilia* et *Rubrobacteria* (Ludwig *et al.*, 2012). Ce phylum a la particularité d'être constitué de bactéries gram positif (ce qui n'est pas courant dans l'environnement marin) et ses membres cultivés ont principalement un génome au pourcentage élevé en G et C, même si des études récentes ont mis en évidence des *Actinobacteria* ayant un faible G+C% (Ghai *et al.*, 2012, 2013). La diversité et l'évolution de la nomenclature des *Actinobacteria* fait que, dans l'environnement marin, différents noms y faisaient référence (par exemple 'Bactéries marines gram +' ou 'Bactéries marines gram + à fort GC%' ou 'Groupe des Actinomycetes'). La reconstitution d'un génome virtuel correspondant à la sous-classe 'Candidatus *Actinomarinidae*' (estimé à 0,8-1,03 méga paires de bases ou Mpb) a révélé qu'il était encore plus petit que celui de *Pelagibacter ubique* (1,31Mpb) et que ce nouvel organisme était la plus petite bactérie hétérotrophe marine vivant sous forme libre (Ghai *et al.*, 2013).

Jusque dans le milieu des années 80, il existait peu d'informations sur le rôle de ces bactéries dans l'environnement marin global, car elles étaient souvent ignorées et considérées à tort comme des « contaminants » provenant d'habitats terrestres (sol, eau douce) et survivant de longues périodes sous forme de spores dans le sédiment marin (Goodfellow & Williams, 1983). Cependant, certains membres cultivés des *Actinobacteria* ont montré un rôle dans la décomposition de diverses grandes molécules (comme l'agar, l'alginate, la laminarine, la cellulose, la chitine, l'huile et d'autres hydrocarbures) ainsi que dans la dégradation du bois et des hydrocarbures pétroliers dans les habitats marins (Goodfellow & Williams, 1983). Les *Actinobacteria* sont régulièrement rencontrés dans les banques de clones dans l'océan

mondial (Kirchman, 2008; Zinger *et al.*, 2011). Elles sont connues pour correspondre à une petite fraction de la communauté bactérienne marine globale, et peuvent devenir dominantes dans certains habitats spécifiques tels que dans les fonds marins (Colwell *et al.*, 2004; Zinger *et al.*, 2011). Les *Actinobacteria* sont relativement ubiquistes (Ward & Bora, 2006) et peuvent par exemple coloniser des environnements pollués, comme les eaux de surface des ports, où elles interviendraient dans la dégradation de composés toxiques comme les hydrocarbures, les pesticides ou encore les métaux lourds (Agogué *et al.*, 2005). Plusieurs études ont également montré que les *Actinobacteria* avaient un rôle important dans des associations parfois spécifiques avec des organismes marins tels que éponges, les coraux ou encore les ascidies, en les protégeant des pathogènes par action bactéricide par exemple (Valliappan *et al.*, 2014). Ainsi, certaines *Actinobacteria*, dont des souches isolées d'environnements marins, sont étudiées pour les métabolites bioactifs d'intérêt qu'elles produisent (Bull & Stach, 2007; Manivasagan *et al.*, 2013, 2014; Ward & Bora, 2006). Ces composés peuvent avoir des applications dans de nombreux domaines tels que la médecine (composés anti-tumoraux, antibiotiques, etc.) ou les biotechnologies (enzymes, inhibiteurs enzymatiques etc.).

1.2.1.4. Le phylum des *Cyanobacteria*

Les cyanobactéries sont des bactéries dotées d'un appareil photosynthétique, et font donc partie du groupe paraphylétique des microalgues. Pour plus de précisions sur ce phylum, se référer au paragraphe 2.1.1.

1.2.1. Diversité culturelle, le sommet de l'iceberg

Au fil des années, le développement des stratégies d'isolement et de culture des bactéries a permis d'accéder à un certain nombre de bactéries et de mettre en lumière des éléments clés permettant d'expliquer leur importance écologique. Il existe cependant des limites aux stratégies culturelles employées, qui sélectionnent uniquement les microorganismes adaptés et ne reflète pas la composition et l'abondance réelle des populations bactériennes d'un échantillon. Cela est particulièrement frappant quand on compare, à partir d'un même échantillon environnemental, le nombre de colonies ayant poussé sur un milieu de culture et le nombre de cellules bactériennes comptées par microscopie directe. Ce phénomène aujourd'hui appelé « la grande anomalie de comptage sur boîte » (Staley & Konopka, 1985), a été constaté probablement pour la première fois par Razumov en 1932. En mer, des estimations ont prédit que seulement 0,001 à 0,1% des bactéries étaient cultivables (Amann *et al.*, 1995), ce qui constitue le réservoir dans lequel le nombre de bactéries cultivable est le plus bas si l'on compare à d'autres habitats tels que l'eau douce, les lacs mésotrophes, les eaux saumâtres, les boues activées, les sédiments ou la terre.

Actuellement, la culture reste le seul moyen de caractériser totalement les propriétés des microorganismes et de prédire leur impact dans un environnement. Cependant, la culture de bactéries est aussi variée et complexe que l'est la diversité des métabolismes bactériens dans l'environnement. Plusieurs centaines de stratégies d'isolement et de culture différentes ont été conçues pour permettre de cultiver la plus grande diversité possible de microorganismes (Madigan *et al.*, 2010). Une des méthodes ayant permis la plus grande avancée dans ce domaine est probablement la technique de cultures par extinction (Button *et al.*, 1993) exploitable à haut débit (Connon & Giovannoni, 2002), permettant de cultiver des microorganismes de façon théoriquement clonale et donc de limiter la compétition et les effets antagonistes des autres microorganismes, mais aussi de promouvoir le développement de souches à croissance lente. En microbiologie marine, les milieux de culture les plus prometteurs sont probablement les milieux de culture pauvres en nutriments (Cho & Giovannoni, 2004; Connon & Giovannoni, 2002; Rappé *et al.*, 2002) ayant conduit à la culture d'organismes oligotrophes majeurs qui défiaient jusqu'alors toutes les méthodes de cultures

employées. C'est notamment le cas de certains membres du groupe des SAR11 (Rappé *et al.*, 2002) qui est le groupe bactérien le plus abondant à la surface des océans (Morris *et al.*, 2002), ou encore ceux appartenant aux SAR116 (Stingl *et al.*, 2007).

Les connaissances apportées par les génomes d'organismes qui étaient longtemps considérés comme incultivables donnent de nouvelles pistes pour améliorer les techniques de cultures *in vitro* (Carini *et al.*, 2013). De plus, les nouvelles techniques de génomique vont encore plus loin en permettant d'obtenir le génome de microorganismes encore incultivés, à partir de données métagénomiques (Albertsen *et al.*, 2013; Ghai *et al.*, 2013) parfois combiné à du séquençage à partir de cellule unique (Dupont *et al.*, 2012; Lasken, 2012; Rusch *et al.*, 2013). L'analyse de ces génomes permet d'en apprendre davantage sur le métabolisme des microorganismes encore incultivés, et laissent présager de beaux jours à l'amélioration des stratégies de cultures.

1.3. Mode de vie des bactéries dans l'environnement aquatique

1.3.1. Différents types trophiques

Les bactéries sont à l'origine de la très grande diversité des types trophiques qui existent sur la planète. Elles peuvent utiliser l'énergie lumineuse (phototrophie) ou chimique (chimiotrophie). Elles peuvent utiliser du carbone inorganique tel que le dioxyde de carbone (CO₂) (autotrophie) ou organique (hétérotrophie). Enfin, leur donneur d'électrons (pour la réduction de la source de carbone) peut être d'origine organique (organotrophie) ou inorganique (lithotrophie). La combinaison de ces trois caractéristiques définit le type trophique d'un organisme. Par exemple, les cyanobactéries sont majoritairement photolithoautotrophes.

1.3.2. Entre attachement et vie sous forme libre

Les interactions entre bactéries, agrégats et organismes de plus grande taille suggèrent que les bactéries ont mis en place des styles de vie complexes qui comprennent :

- soit une existence exclusivement sous forme libre, avec des bactéries qui sont durant tout leur cycle de vie sous forme de cellules individualisées ;
- soit une existence exclusivement sous forme associée à des particules vivantes ou non ;
- soit une alternance entre ces deux styles de vie (parfois libres, parfois associées).

La motilité et le comportement chimiotactique des bactéries aquatiques sont les conditions préalables à ce troisième style de vie puisqu'ils permettent un attachement efficace mais aussi un déplacement sur ces surfaces (par glissement par exemple) et un détachement. L'attachement aux particules en suspension ou à celles qui sédimentent est une stratégie de vie majeure pour les microorganismes marins (Grossart, 2010; Long & Azam, 2001; Simon *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1992) qui a, par conséquent, un rôle important dans la structuration taxonomique des communautés et de leur activité biochimique (Crump *et al.*, 1999; Delong *et al.*, 1993). Les bactéries ont ainsi développé des réponses physiologiques rapides en présence de concentrations élevées en matière organique dissoute (MOD) ou particulaire (MOP), qui constituent des substrats mais aussi des habitats propices aux

bactéries aquatiques, leur permettant d'augmenter leur activité et leur multiplication cellulaire (Grossart, 2010).

La Figure 4 représente une vision schématique des styles de vie complexes des bactéries aquatiques, qui comprennent les différentes phases suivantes :

- (1) phase de vie sous forme libre des bactéries dans l'eau environnante, qui agit comme un réservoir génétique constamment alimenté par des bactéries détachées des surfaces,
- (2) bactéries associées à des gels et microparticules, qui fournissent des nutriments et des surfaces invisibles pour l'attachement des bactéries,
- (3) regroupement bactérien autour d'organismes photosynthétiques qui apportent de fortes concentrations de matière organique labile permettant une activité et une croissance bactérienne forte,
- (4) bactéries chimiotactiques dans le panache entourant un agrégat et bactéries attachées à la surface d'agrégats. Les agrégats, tels ceux formés lors d'efflorescences phytoplanctoniques sont typiquement appelés neige marine, apportent de la MOD et de la MOP et véhiculent rapidement les bactéries pélagiques et la MO vers les fonds (Grossart *et al.*, 2006),
- (5) bactéries associées à des organismes mobiles tels des abris, offrant des conditions de croissance favorable et permettant un transport passif sur de longues distances.
- (6) Un détachement fréquent de ces surfaces et un comportement chimiotactique permet aux bactéries d'être en perpétuelle transition entre la forme libre et la forme attachée à une surface.

Bien que les agrégats peuvent être des « hot spots » d'activités bactériennes, les bactéries attachées à la MOP correspondent généralement à une petite fraction (<10%) de l'abondance et de la production bactérienne totale dans les environnements pélagiques. La majorité des bactéries des eaux pélagiques étant sous forme libre. Cependant, la contribution des bactéries attachées, par rapport à la production bactérienne totale, peut être élevée (> 50%) dans les environnements estuariens et côtiers productifs (Crump *et al.*, 1998) tout comme durant les efflorescences algales (Riemann *et al.*, 2000).

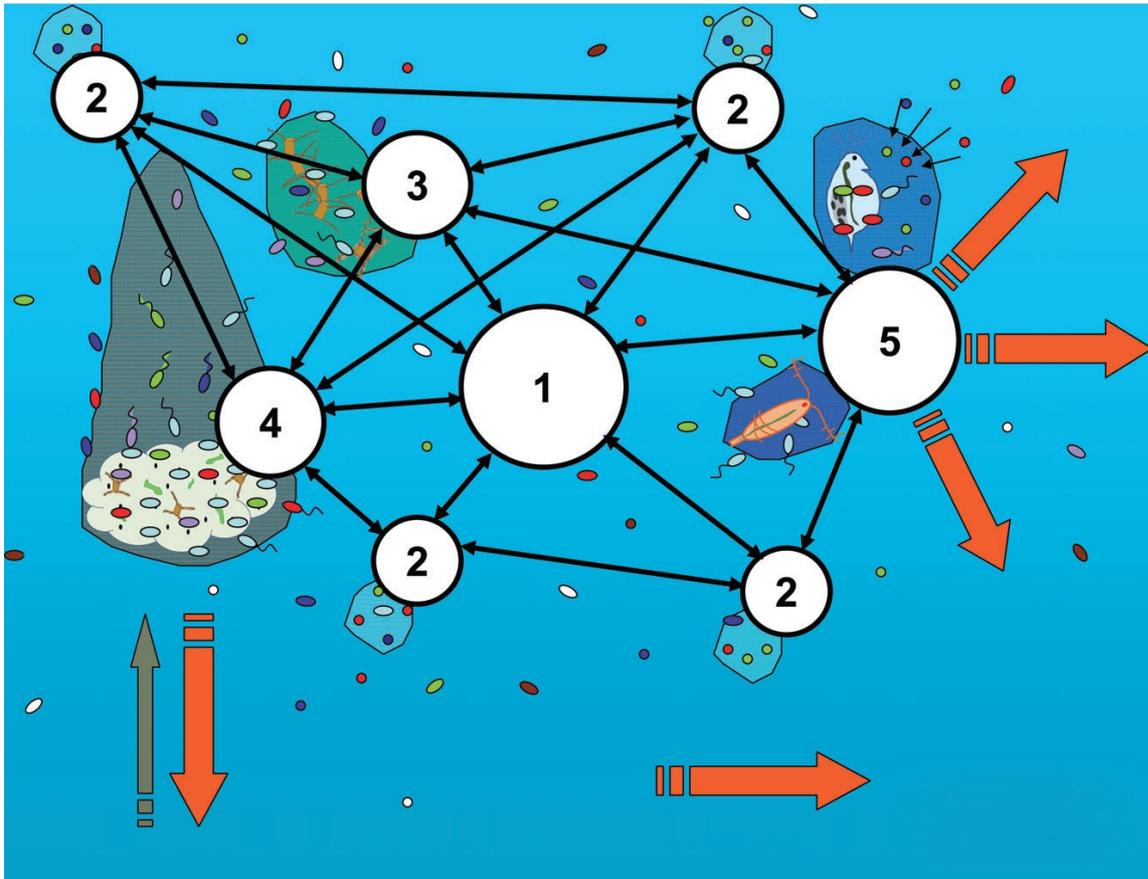


Figure 4 : Vision schématique des styles de vie complexes des bactéries aquatiques, tel un réseau microbien étroitement établi entre les bactéries libres et celles attachées sur des surfaces. Notez que la transformation de la matière organique par les bactéries aquatiques est fortement influencée par la lyse virale et le broyage des protozoaires (Grossart, 2010).

1.3.3. Cohabitation entre bactéries et autres organismes

Les bactéries ont colonisé de très nombreux habitats abiotiques mais aussi biotiques. En ce qui concerne les habitats biotiques, de très nombreuses interactions peuvent exister entre les bactéries et les différents organismes colonisés. C'est le cas par exemple chez l'Homme, où la flore intestinale composée majoritairement de bactéries, est aujourd'hui considérée comme un véritable organe du corps, participant à l'assimilation des aliments (Backhed *et al.*, 2004), mais pouvant aussi être responsable de graves inflammations du tube digestif (Manichanh *et al.*, 2006). Chez certains végétaux, des bactéries capables de fixer l'azote contenu dans le sol et de le restituer à leur hôte via ses racines, jouent également un rôle majeur dans leur développement (Vessey, 2003). Il existe également de très nombreux virus de bactéries, appelés bactériophages, capables de lyser les bactéries jouant ainsi un rôle essentiel dans le recyclage de la matière organique dans de nombreux écosystèmes et en particuliers les écosystèmes aquatiques (Rohwer & Thurber, 2009). Même si cette thèse

s'intéresse aux interactions entre bactéries et microalgues eucaryotes, il est important de garder un œil ouvert sur la grande diversité d'interactions que peuvent entretenir les bactéries avec l'ensemble des organismes vivants car c'est parfois en croisant des informations qui semblent très éloignées que l'on met le doigt sur des éléments essentiels.

Pour que les bactéries cohabitent avec l'ensemble des organismes décrits dans le paragraphe précédent, il est souvent nécessaire qu'elles s'attachent à leur surface. Or l'attachement est souvent corrélé à la mobilité, mais aussi au chimiotactisme ou encore à des mécanismes d'adhésion (Ganesh *et al.*, 2014). En effet, de nombreux mécanismes de mobilité requièrent une surface pour que le mouvement se fasse (Jarrell & McBride, 2008; Kearns, 2010). Ainsi, il est possible d'imaginer que les bactéries capables de se déplacer sur des surfaces seront également capables d'y rester attachées de façon relativement durable et potentiellement d'interagir avec ces surfaces qui peuvent être un organisme hôte. La nature a déployé tout un arsenal de mécanismes permettant la mobilité de surface des bactéries (Figure 5). Certaines bactéries peuvent utiliser plusieurs mécanismes de mobilité, comme *Myxococcus xanthus* qui utilise à la fois des mécanismes de « twitching » et de « gliding » (Zusman *et al.*, 2007).

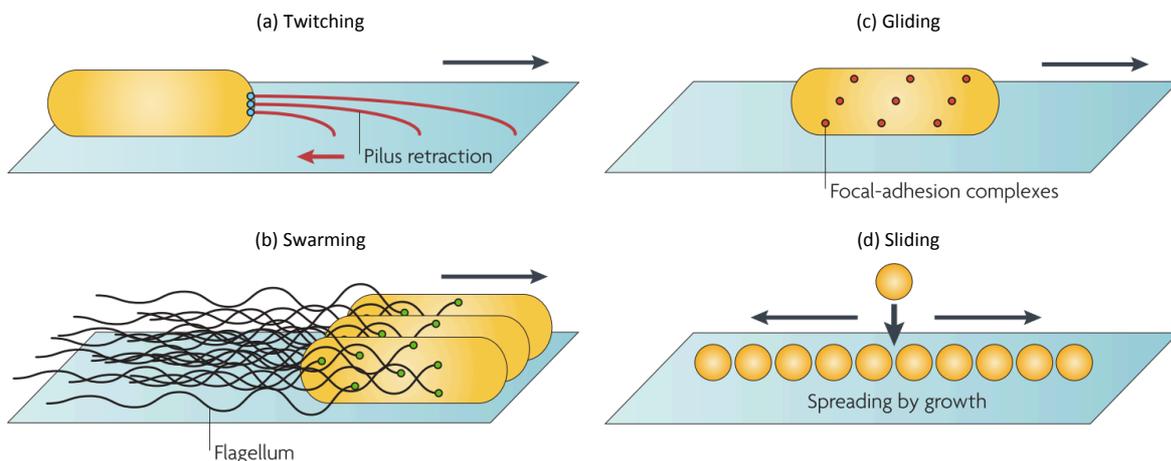


Figure 5 : Différents mécanismes bactériens de mobilité qui s'appuient sur des surfaces. (a) Le mouvement par « twitching » (contraction) correspond à un déplacement lié à une extension des pili de la bactérie, qui s'attachent à une surface avant de se rétracter, conduisant la bactérie vers ce site d'attachement. (b) Le mouvement conjoint de plusieurs bactéries le long d'une surface, sous l'action de flagelles rotatives en hélices est appelé « swarming » (fourmillement). (c) Le « gliding » (glissement rotatif) est un mouvement de surface qui ne nécessite ni de flagelles ni de pili, mais qui implique des mécanismes d'adhérence. (d) Les bactéries peuvent également avoir un déplacement passif par « sliding » (glissement par étalement), qui est possible lorsque les cellules se multiplient tout en adhérant à la surface grâce à des composés tensio-actifs. Les flèches noires indiquent la direction des mouvements cellulaires et les moteurs qui alimentent les mouvements sont indiqués par des cercles de couleur. D'après une illustration de (Kearns, 2010).

Par ailleurs, il a été démontré que sur un même environnement, les bactéries capables de s'attacher à des surfaces et celles vivant sous forme libre étaient différentes et que la diversité des bactéries attachées aux surfaces était plus faible que la diversité des bactéries vivant sous forme libre (Acinas *et al.*, 1999). Cela laisse penser que les mécanismes d'attachement sont spécifiques à certains taxons bactériens qui pourraient également avoir une tendance plus forte à interagir avec un organisme hôte auquel ils seraient capables de s'attacher.

Les communautés bactériennes attachées aux surfaces se distingueraient de celles vivant sous forme libre par la présence de pili de type IV à leur surface cellulaire (Ganesh *et al.*, 2014). Ces structures favorisent l'échange de matériel génétique, mais aussi le transfert de protéines effectrices entre les cellules, ainsi que la mobilité par « twitching », l'adhésion aux surfaces ou encore la virulence (Burrows, 2012; Christie *et al.*, 2005; Persat *et al.*, 2015). La production d'antibiotiques par les bactéries est également plus commune chez les bactéries attachées aux surfaces que chez leurs congénères planctoniques (Gram *et al.*, 2010; Long & Azam, 2001; Long *et al.*, 2005; Nair & Simidu, 1987).

2. Le phytoplancton marin

Les algues forment un groupe très divers comprenant des organismes autotrophes multicellulaires mais parfois unicellulaires (vivant seules ou en colonies/chaines) qui colonisent de nombreux habitats (eaux douces, salées ou hypersalées, sols, etc.). Elles peuvent être de taille macroscopique, on parle alors des macroalgues. Lorsqu'elles sont microscopiques et il s'agit de microalgues ou phytoplancton (van den Hoek *et al.*, 1996; Johansen, 2012; Lee, 2008).

2.1. Définitions

D'après son étymologie, *plancton* provient du grec et signifie « qui flotte ». Le plancton présente une forte diversité d'organismes allant du virus jusqu'au plancton animal. Les organismes planctoniques sont généralement classés selon leur taille (Ōmori & Ikeda, 1992) dans les différentes catégories présentées dans la Figure 6.

D'après son étymologie, le phytoplancton correspond au plancton végétal et signifie plus littéralement « plante qui flotte ». Le phytoplancton recouvre plusieurs gammes de taille incluant le picoplancton (0,2 à 2 μm), nanoplancton (2 à 20 μm), le microplancton (20 à 200 μm) et mésoplancton (0,2 à 2 mm). Il regroupe des espèces planctoniques autotrophes vis-à-vis du carbone, grâce à leur capacité à réaliser la photosynthèse, c'est-à-dire à absorber des sels minéraux et du carbone pour rejeter du dioxygène (O_2) sous l'effet de la lumière. On le retrouve d'ailleurs au niveau des couches superficielles de la mer, principalement dans la zone euphotique. Il constitue le moteur de la « pompe biologique du carbone » dans les océans et produit une grande partie de l'oxygène présent dans notre atmosphère. Le phytoplancton est un groupe polyphylétique très diversifié qui comprend des microorganismes photosynthétiques (ou microalgues) procaryotes et eucaryotes. Il représente une grande diversité d'espèces, de formes, de tailles et est à la base des réseaux trophiques marins. Il constitue donc une clé pour comprendre la structure de ces écosystèmes. Les clades phytoplanctoniques marins les plus abondants et les plus étudiés sont les diatomées (ou bacillariophycées), les cyanobactéries, les dinoflagellés et les coccolithophores.

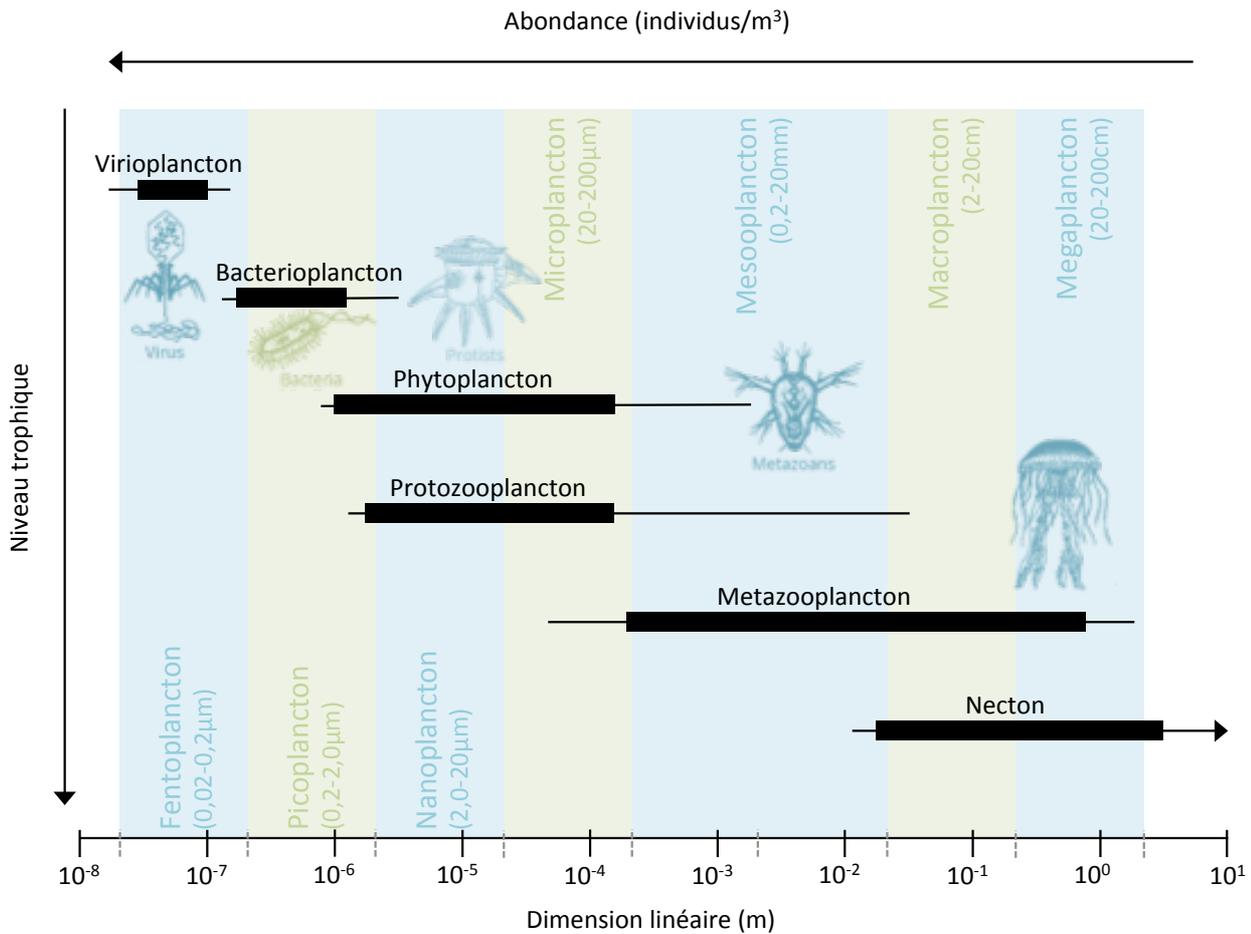


Figure 6 : Distribution des différents compartiments du plancton, selon leur niveau trophique, leur taille et leur abondance. Modifié de Falkowski & Knoll (2007) et de Sieburth, et al. (1978). Illustrations : <http://planktonplanet.org/>

2.1.1. Microalgues procaryotes

Les microalgues procaryotes regroupent l'ensemble des Cyanobactéries (phylum des *Cyanobacteria*), terme qui fait référence à leur ancienne dénomination : les « algues bleues ». Bien que la taxonomie de ce groupe soit en cours de révision, une étude récente scinde ce phylum en deux classes : les *Cyanophyceae* (ou *Phycobacteria*) et les *Gloeobacteria* (ou *Gloeobacterophyceae*) (Ruggiero *et al.*, 2015). De nombreuses études ont montré que les deux genres cyanobactériens *Prochlorococcus* et *Synechococcus* dominaient largement ce groupe dans les océans et constituaient, le plus souvent, les organismes les plus abondants du phytoplancton (Partensky *et al.*, 1999; Waterbury *et al.*, 1986). Ces bactéries photosynthétiques ont été des actrices majeures dans l'évolution de la vie, puisqu'elles ont constitué les premiers organismes phototrophes oxygéniques à évoluer sur Terre, et auraient donc eu un rôle important dans l'oxygénation de l'atmosphère terrestre (Blank & Sanchez-Baracaldo, 2010, Kirschvink & Kopp, 2008, Rosing & Frei, 2004, Schopf & Packer, 1987, Schopf,

1993 et Figure 12). Actuellement, les Cyanobactéries sont des contributrices majeures dans les cycles biogéochimiques (Li, 1994; Scalan & West, 2002), notamment par leur forte implication dans la production primaire globale ou encore par leur capacité à fixer le diazote inerte contenu dans l'atmosphère (Kirchman, 2008). Dans les océans oligotrophes, pauvres en nutriments, il est courant d'observer que les cyanobactéries représentent une importante fraction (environ 90%) de la production primaire et de la biomasse totale en phytoplancton. Cependant, ces estimations pourraient diminuer à mesure que les connaissances sur les petits eucaryotes phytoplanctoniques s'étoffent, même s'il est incontestable que le rôle des cyanobactéries demeurent important dans les océans (Kirchman, 2008).

2.1.2. Microalgues eucaryotes et le cas particulier des diatomées

De façon générale, lorsque l'on fait référence aux microalgues, il s'agit non pas de microalgues procaryotes, mais de microalgues eucaryotes. C'est un groupe d'organismes présentant une classification polyphylétique assez complexe et une histoire évolutive assez mystérieuse. La suite du paragraphe concerne les microalgues eucaryotes et met l'accent sur le groupe des diatomées.

2.1.2.1. Une classification polyphylétique complexe

Le phytoplancton eucaryote rassemble des clades d'origines variées. On en rencontre principalement au sein des super-groupes straménopiles, alvéolés et rhizaires, mais aussi parmi les archéplastides, les excavés et également dans des clades (tels que les cryptophytes, haptophytes, raphidomonades et picozoa) dont les groupes sont encore mal définis (Figure 7). En se basant sur leur pigmentation (due à leurs chloroplastes), une autre classification plus éloignée de l'histoire évolutive des microalgues, mais toujours utilisée, vise à distinguer trois groupes très polyphylétiques qui sont les algues rouges, vertes ou bleues.

Les principaux groupes de microalgues eucaryotes dont il sera question dans la suite de ce chapitre et qui sont les plus étudiés sont des membres des straménopiles avec les diatomées (ou *Bacillariophyta*) et les raphidophytes, des membres des alvéolés avec les dinoflagellés, des membres des archéplastides avec les chlorophytes (dont les chlorophycées) et les rhodophytes (dont les porphyridiophycées) et les haptophytes (dont les prymnésiohaptophycées ou coccolithophores).

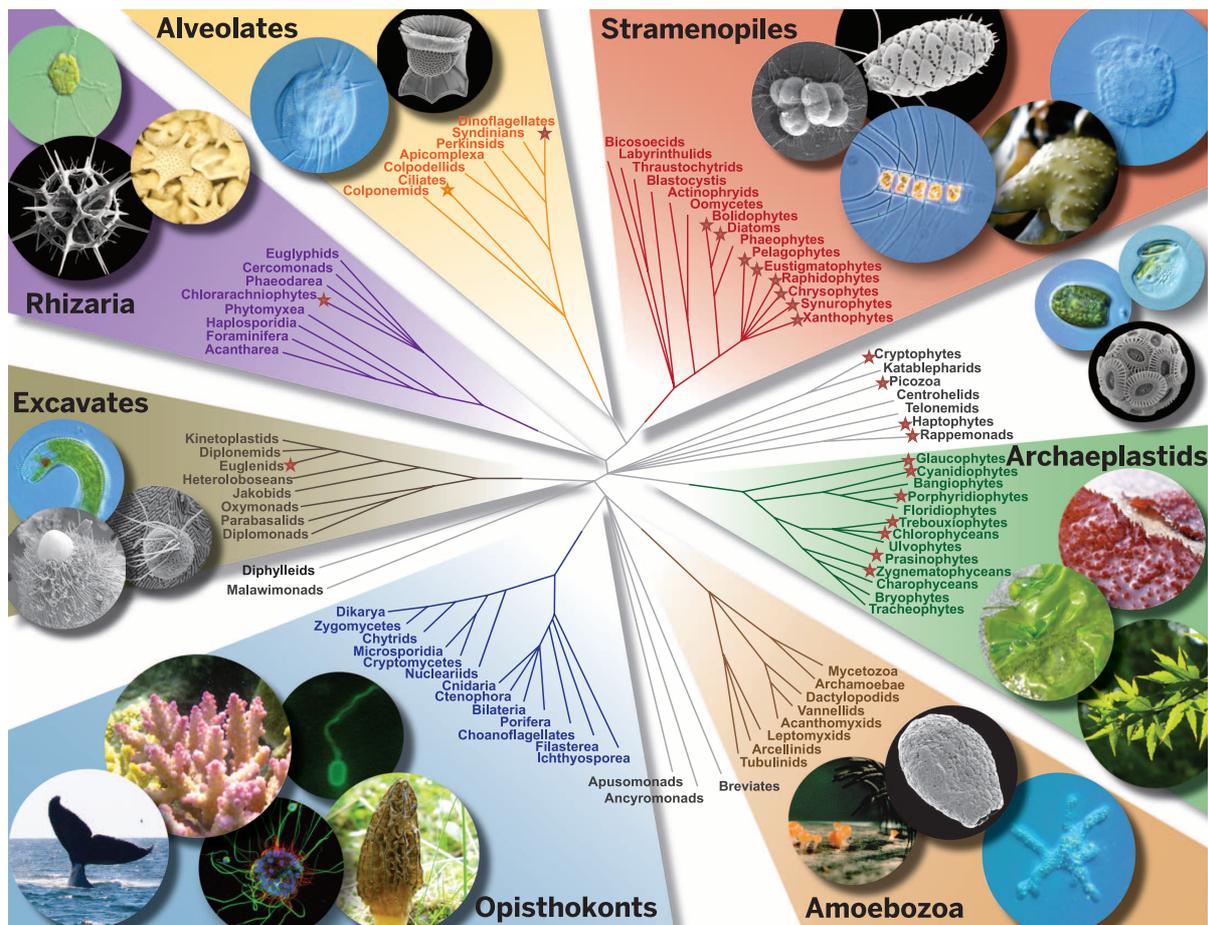


Figure 7 : Schématisation phylogénétique de la distribution polyphylétique des microalgues eucaryotes parmi les groupes majeurs d'eucaryotes, modifié à partir de Worden *et al.* (2015), d'après une analyse phylogénétique de Burki & Keeling (2014). La représentation a été construite à partir d'analyses morphologiques et phylogénétiques (sur la base de quelques gènes d'une large diversité d'organismes), ainsi que d'analyses phylogénomiques (de nombreux gènes représentatifs des lignées majeurs). On distingue sept « super-groupes » (fonds colorés) qui contiennent plusieurs « groupes ». Les autres groupes, situés à l'extérieur des « super-groupes », ont une classification assez incertaine. Les étoiles rouges représentent les groupes dans lesquels il est possible de retrouver des microalgues eucaryotes. L'étoile orange, indiquée pour le groupe des ciliés, comprend des organismes hétérotrophes capables d'acquérir un plaste par kleptoplastidie et de le contrôler pour utiliser un métabolisme photoautotrophe (Johnson *et al.*, 2006; Nowack & Melkonian, 2010). Les images en périphérie illustrent l'immense diversité des eucaryotes. Dans le sens des aiguilles d'une montre, à partir de droite : archéplastides (rhodophyte, chlorophyte, streptophyte); amibozoaires (tubulinid, arcellinid, mycetozoan); opisthocontes (fungus, microsporidian, choanoflagellate, cnidarian, bilaterian); excavés (parabasalian, oxymonad, euglenid); rhizaires (acantharian, foraminiferan, chlorarachniophyte); alvéolés (ciliate, dinoflagellate); straménopiles (labyrinthulid, synurophyte, diatom, phaeophyte, actinophryid); hors des « super-groupes » [cryptomonad, katablepharids, haptophytes (appelés ici prymnesiophytes, et à laquelle appartiennent coccolithophores)].

La classification des diatomées est depuis longtemps sujette à débat (Round *et al.*, 1990 et Medlin & Kaczmarska, 2004, Ruggiero *et al.*, 2015, Medlin, 2016) et évolue perpétuellement en fonction des découvertes scientifiques (découverte de nouvelles espèces correspondant à un nouveau genre ou une nouvelle famille, ou encore découverte de fossiles permettant de mieux comprendre l'évolution des espèces, etc.), comme cela est d'ailleurs le

cas chez de très nombreux organismes vivants. Pour l'identification et la classification des diatomées, il est d'usage de se baser notamment sur la grande diversité de structures de la paroi cellulaire appelée frustule (forme, taille, géométrie, motifs, etc.), qui est une caractéristique très informative utilisée en taxonomie (Round *et al.*, 1990; Tomas, 1997). Ainsi, 4 groupes majeurs ont été définis selon la forme et la symétrie de leur frustule : centriques radiales, centriques (multi/bi)polaires, et pennées araphides et pennées raphides (Round *et al.*, 1990) (Figure 8). Les diatomées centriques radiales ont une architecture semblable à une boîte de Petri avec un centre de symétrie circulaire (annulus) au milieu de la valve et des rangées de pores formant des rayons depuis l'annulus. Les diatomées centriques polaires ont des valves bi ou multipolaires, avec un annulus allongé ou déformé. Les diatomées pennées ont une symétrie bilatérale et n'ont pas d'annulus, mais une nervure (sternum) qui suit l'axe longitudinal de chaque valve. Le sternum des pennées raphides contient une fente (le raphé), qui est interrompue par le nodule central au milieu de la valve. Les pennées araphides ne disposent pas de raphé. Les pennées raphides sont capables de se déplacer sur des surfaces par un moyen de traction généré par un mucilage adhésif (polysaccharides et peptidoglycanes) sécrété par le raphé. Les autres groupes de diatomées ne sont pas mobiles.

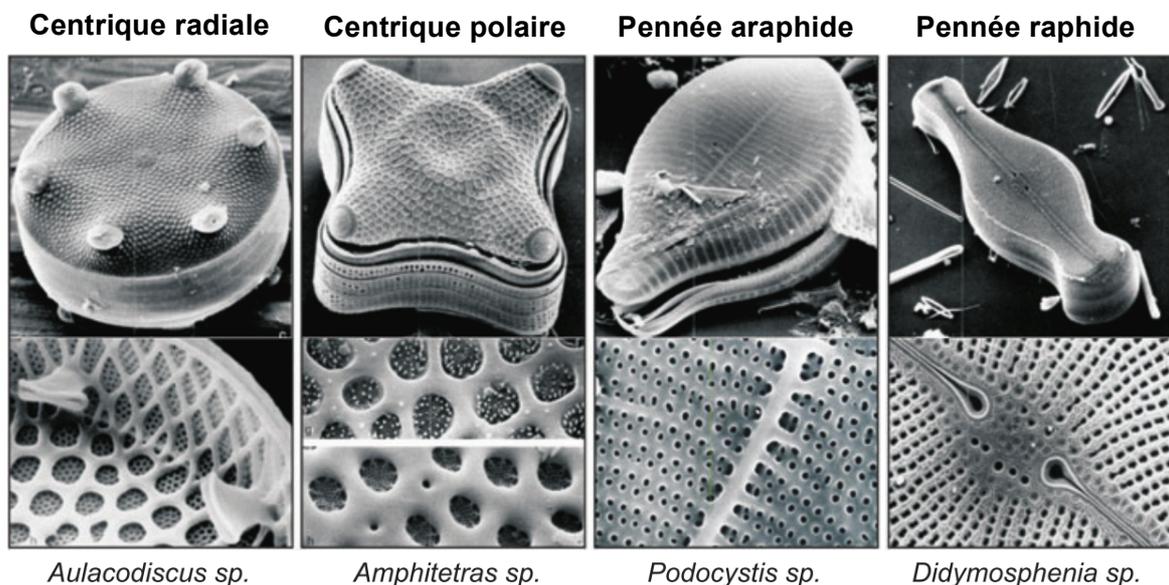


Figure 8 : Représentants des quatre grands groupes de diatomées (Round *et al.*, 1990, Kröger & Poulsen, 2008). Observations par microscopie électronique à balayage des cellules avec un détail de l'ornementation visible sur leur paroi cellulaire.

<p>Classe Bacillariophyceae (=Diatomeae)</p> <p>Subclass Bacillariophycidae (=Pennées raphides) Orders : Achnanthes, Bacillariales, Cymbellales, Dictyoneidales, Eunotiales, Eupodiscales, Lyrellales, Mastogloiales, Naviculales, Rhopalodiales, Surirellales, Thalassiophysales Subclass</p> <p>Subclass Coscinodiscophycidae (=Centriques radiales et polaires) Orders : Anaulales, Arachnoidiscales, Asterolamprales, Aulacoseirales, Biddulphiales, Chaetocerotales, Chrysanthemodiscales, Corethrales, Coscinodiscales, Cymatosirales, Ethmodiscales, Hemiaulales, Lithodesmiales, Melosirales, Orthoseirales, Paraliales, Rhizosoleniales, Stictocyclales, Stictodiscales, Thalassiosirales, Triceratiales Subclass</p> <p>Subclass Fragilariophycidae (=Pennées araphides) Orders : Ardissonaeales, Climacospheniales, Cyclophorales, Fragilariales, Licmophorales, Protoraphidales, Rhabdonematales, Rhapsoneidales, Striatellales, Tabellariales, Thalassionematales, Toxariales</p>	(a)
---	-----

<p>Division Bacillariophyta (=Diatomées)</p> <p>Subdivision Coscinodiscophytina</p> <p>Classe Coscinodiscophyceae (=centriques radiales) Ordres : Asterolamprales, Arachnoidiscales, Aulacoseirales, Chrysanthemodiscales, Corethrales, Coscinodiscales, Ethmodiscales, Melosirales, Orthoseirales, Rhizosoleniales, Stictocyclales, Stictodiscales et Leptocylindrales.</p> <p>Subdivision Bacillariophytina</p> <p>Classe Mediophyceae (=centriques polaires avec aréoles en organisation radiale) Ordres : Anaulales, Biddulphiales, Chaetocerotales, Cymatosirales, Eupodiscales/Triceratiales, Hemiaulales, Lithodesmiales, Thalassiosirales et Toxariales.</p> <p>Classe Bacillariophyceae (=pennées)</p> <p>Subclasse Urneidophycidae (=pennées araphides) Ordres : Fragilariales in part (genus : <i>Asteroplanus</i>, <i>Plagiogramma</i>, <i>Glyphodesmis</i>, <i>Psammogramma</i>, <i>Psammoneis</i>, <i>Striatella</i>, <i>Asteroplanus</i>, <i>Plagiogramma</i>, <i>Glyphodesmis</i>, <i>Neofragillaria</i>, <i>Orizaformis</i>, <i>Psammogramma</i>, <i>Psammoneis</i> et <i>Pseudostriatella</i>), Rhapsoneidales, Rhabdonematales</p> <p>Subclasse Fragilariophycidae (=pennées araphides) Ordres : Fragilariales in part, Tabellariales, Licmophorales, Thalassionematales</p> <p>Subclasse Bacillariophycidae (= pennées raphides) Ordres : Eunotiales, Lyrellales, Mastogloiales, Dictyoneidales, Cymbellales, Achnanthes, Naviculales, Thalassiophysales, Bacillariales, Rhopalodiales et Surirellales.</p>	(b)
---	-----

Figure 9 : Classifications des diatomées proposées par : (a) Ruggiero et al. (2015) et par (b) Medlin (2016)

Ces quatre grands groupes basés sur des critères morphologiques correspondent à des classes ou plutôt des sous-classes dans les classifications récentes comme la classification des organismes vivant ou « catalogue de la vie » (Ruggiero *et al.*, 2015). Ainsi les diatomées correspondraient à la classe des *Bacillariophyceae*, qui serait elle-même divisée en trois sous-classes : *Coscinodiscophycidae* (centrées radiales et polaires), *Fragilariophycidae* (pennées araphides), *Bacillariophycidae* (pennées raphides) (Figure 9a).

Cette classification est cependant différente de celle de Medlin (2016), qui se base sur les analyses moléculaires réalisées à partir d'alignements de la structure secondaire des gènes de l'ARN ribosomal et avec plusieurs « outgroups ». Medlin (2016) propose de classer les diatomées dans la division des *Bacillariophyta*, comprenant deux sous-divisions : *Coscinodiscophytina* (diatomées centrées radiales) et *Bacillariophytina* (diatomées centrées polaires, pennées araphides et pennées raphides) et plusieurs classes et sous-classes, comme décrit dans la Figure 9b.

Actuellement, parmi tous les eucaryotes phytoplanctoniques vivants dans les océans contemporains, les diatomées forment le groupe le plus diversifié. En effet, même si ces chiffres sont constamment revus (Falkowski *et al.*, 2004; Guiry, 2012; Mann & Droop, 1996), il en existerait entre 30 000 et 100 000 espèces, selon Mann & Vanormelingen (2013).

2.1.2.2. Origine des microalgues eucaryotes et des diatomées : un lien ancestral avec les bactéries

Ces différents groupes d'eucaryotes photosynthétiques ont des histoires évolutives complexes et variées, mais sont tous apparus à la suite d'endosymbioses primaires, secondaires, voire tertiaires, durant lesquelles de nombreux transferts de gènes ont eu lieu depuis l'endosymbionte vers le noyau de leur cellule hôte. Cependant, l'ensemble des microalgues eucaryotes a une origine commune qui est l'endosymbiose primaire. Ce premier événement endosymbiotique s'est produit entre une organisme eucaryote doté de mitochondries et un organisme proche des cyanobactéries, il y a environ 1,2 - 1,5 milliards d'années (Ga) (Björn & Govindjee, 2009; Yoon *et al.*, 2004). Il donna lieu à la formation de la première cellule eucaryote photosynthétique (Figure 10).

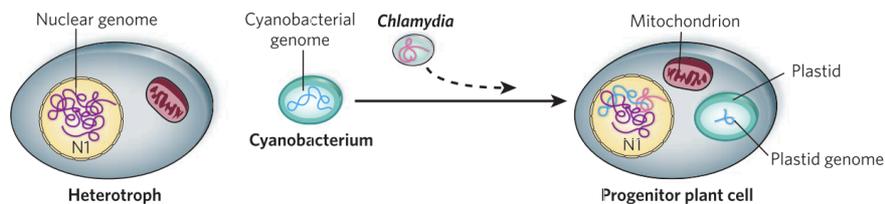


Figure 10 : Représentation de l'acquisition de plaste chez la cellule eucaryote par endosymbiose primaire d'une cyanobactérie, d'après Armbrust, 2009. Cet événement majeur dans l'histoire de la vie engendra l'apparition de la photosynthèse chez les eucaryotes, mais également l'évolution et la diversification de ces organismes par un transfert massif des gènes du symbionte (bleu) vers le noyau de son hôte (N1), et un maintien d'une minorité des gènes endosymbiotiques au sein du plaste. Des analyses récentes ont mise en évidence une potentielle invasion de l'hôte par un parasite proche de *Chlamydia* (flèche en pointillés), dont les gènes (rose) auraient été transférés jusqu'au noyau de l'hôte. La cellule végétale progénitrice ainsi formée divergea ensuite en trois lignées : la lignée rouge, la verte (qui comprend les plantes terrestres) et la bleue.

L'histoire évolutive des diatomées est particulièrement complexe, puisque leurs plastes proviendraient d'un endosymbionte de la lignée rouge, alors que les gènes qui constituent leur génome auraient pour origine la lignée verte et la lignée rouge dans des proportions qui fluctuent en fonction des études (Deschamps & Moreira, 2012; Moustafa *et al.*, 2009). L'une des hypothèses permettant d'expliquer l'origine assez complexe des diatomées serait une endosymbiose secondaire entre une cellule hétérotrophe, une algue rouge et éventuellement une algue verte, avec de nombreux transferts de gènes endosymbiotiques, mais également des transferts horizontaux de gènes provenant notamment de bactéries (Figure 11). Certaines études estiment que 70% des gènes du génome complet des diatomées proviendraient de la lignée verte, 15-20% de la lignée rouge et 5% des bactéries (Bowler *et al.*, 2008; Moustafa *et al.*, 2009). Ces proportions relatives de

gènes au sein du génome des diatomées restent cependant incertaines, puisqu'elles ne sont basées que sur l'analyse de deux génomes de diatomées et d'un génome d'algue rouge (algue extrémophile *Cyanidioschyzon merolae* ayant un génome de taille très réduite avec 16,5 Mpb et 5331 gènes) (Bowler *et al.*, 2010, Moustafa *et al.*, 2009). D'ailleurs, une étude de Deschamps & Moreira (2012) sur la contribution de la lignée verte dans les génomes de diatomées démontre que seule une poignée des 1700 gènes reportés comme provenant de la lignée verte par Moustafa *et al.* (2009) peut être attribuée de façon certaine à cette lignée. Deschamps & Moreira (2012) concluent que même si certains gènes de diatomées auraient pour possible origine la lignée verte, leur nombre est insuffisant pour affirmer qu'il y a réellement eu une endosymbiose secondaire avec une algue verte. Avec l'évolution des techniques de séquençage, de nouveaux génomes d'algues ont depuis été séquencés ou sont en cours de séquençage. Ces avancées pourraient permettre notamment de clarifier l'origine évolutive des diatomées.

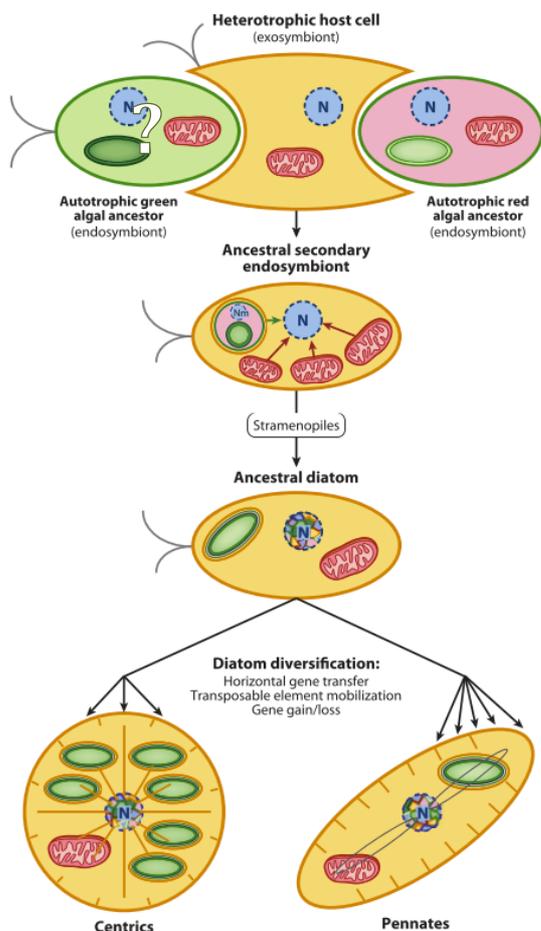


Figure 11 : Représentation schématique de l'évolution des diatomées, d'après Bowler *et al.* (2010). Le « melting pot » que constitue les génomes des diatomées trouve ses origines dans les transferts de gènes successifs qui ont suivi les endosymbioses entre une algue verte {« ? » car débattu par Deschamps & Moreira (2012)}, une algue rouge et une cellule-hôte hétérotrophe (Moustafa *et al.*, 2009). Cet événement aurait permis le transfert de gènes du noyau et des organelles de la proie vers le noyau de l'hôte. Il semblerait également que les diatomées aient acquis des gènes par transfert latéral de gènes, à la fois avant et après leur diversification en diatomées pennées et centriques. D'autres facteurs de diversification ont également été proposés, comme l'action d'éléments transposables mobiles et par l'expansion ou la perte sélective de gènes au cours de leur adaptation à une niche écologique (Bowler *et al.*, 2008). Abréviations: N, noyau; Nm, nucléomorphe.



Formation de la Terre env. - 4600

Premières Cyanobactéries = Apparition de la photosynthèse

Grande oxydation -2300 [6]

« Boring billion » [9, 10] Peu d'oxygène, pas de fossile retrouvé

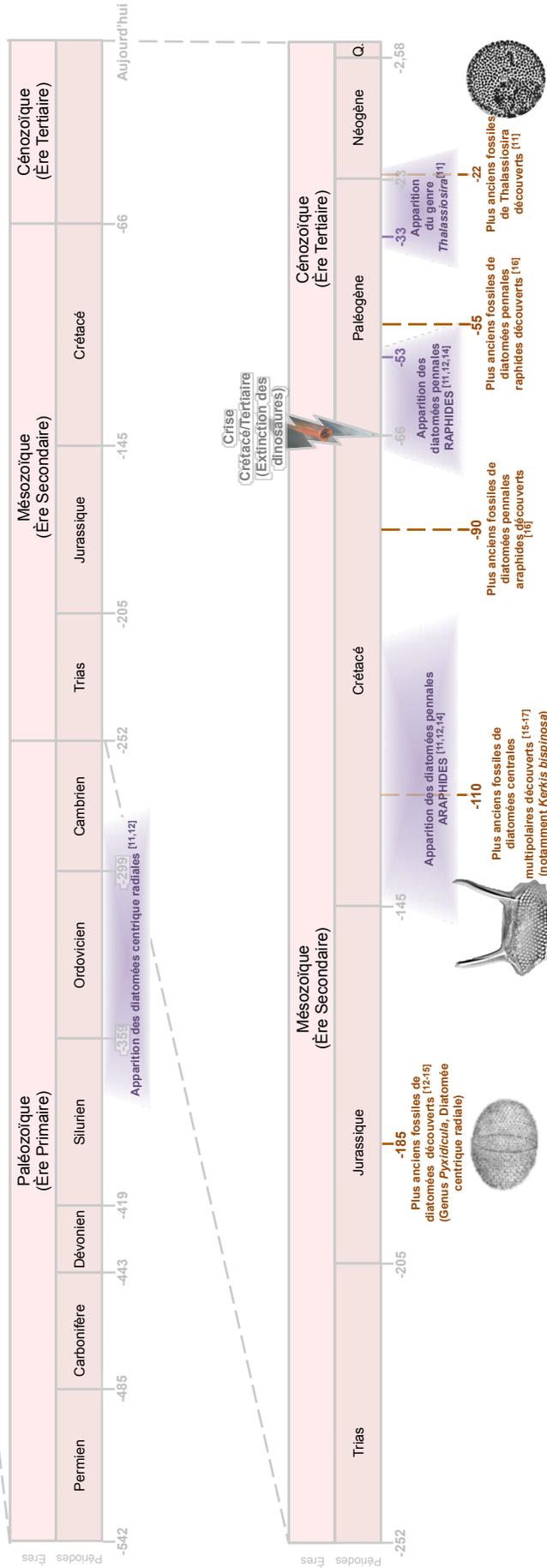
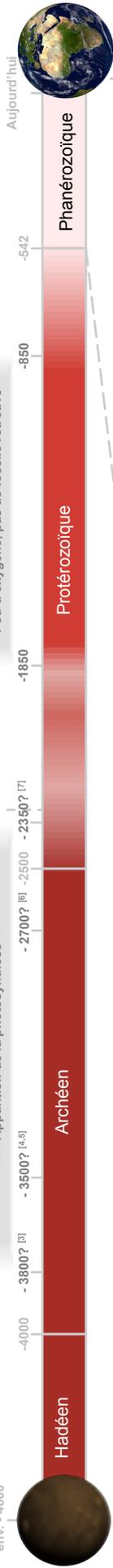


Figure 12 : Apparition des diatomées au cours de l'Histoire de la Terre et grandes étapes de l'apparition de l'oxygène. Différentes échelles de temps sont représentées depuis les Éons, jusqu'aux Périodes, avec différentes nuances de rouge en fonction de la teneur en oxygène de l'atmosphère terrestre [1,2]. L'apparition de la photosynthèse est un élément majeur dans l'histoire de l'oxygénation de l'atmosphère terrestre. Les cyanobactéries seraient les premiers organismes à réaliser la photosynthèse, même si leur datation demeure depuis longtemps source de débat [3-7]. Il y a environ 2,3 milliards d'années (MA), la Terre a connu une crise majeure appelée « grande oxydation » ou encore « crise de l'oxygène », qui s'est manifestée par une augmentation de la teneur en oxygène dans les océans et l'atmosphère terrestre. A cette époque où peu d'organismes tolèrent l'oxygène, cette oxydation génère un énorme bouleversement biologique [8]. A partir de -1,85 MA, les teneurs en oxygène fluctuent peu et restent relativement basses... pendant 1 MA! Cette longue période de stabilité environnementale, est appelée le « boring billion » (ou milliard ennuyeux) [9,10]. Les teneurs en oxygène ont ensuite augmenté durant le Phanérozoïque pour atteindre, et même dépasser, les valeurs que l'on connaît actuellement à savoir environ 21%. C'est au début de ce dernier Éon qu'apparaissent les diatomées [11-17] centriques radiales, puis centriques multipolaires, pennées araphides et enfin pennées rapides. Les datations issues de données moléculaires suivent le même ordre d'apparition que les fossiles découverts, même si les datations moléculaires restent antérieures aux découvertes de fossiles. La plupart des diatomées que l'on connaît actuellement trouvent leur origine après la crise Crétacé/Tertiaire, avec par exemple le genre *Thalassiosira*, qui serait apparu durant le Paléogène Supérieur (datation moléculaire), comme en témoigne les fossiles découverts.

Illustrations de diatomées : Fossile de *Pyxidicula* à Richmond, Virginie (Mather *et al.*, 1843) ; Fraction de cellule de *Kerkis bispinosa* (Sims *et al.*, 2006) ; *Thalassiosira irregularata* (Paléogène Supérieur ?) (Schrader & Fenner, 1976)

Références : [1] (Lyons *et al.*, 2014) ; [2] (Canfield *et al.*, 2013) ; [3] (Rosing & Frei, 2004) ; [4] (Schopf & Packer, 1987) ; [5] (Schopf, 1993) ; [6] (Blank & Sanchez-Baracaldo, 2010) ; [7] (Kirschvink & Kopp, 2008) ; [8] (Holland, 1999) ; [9] (Holland, 2006) ; [10] (Lyons *et al.*, 2014) ; [11] (Philippe *et al.*, 1994) ; [12] (Kotrc & Knoll, 2015) ; [13] (Rothpletz, 1896) ; [14] (Kooistra & Medlin, 1996) ; [15] (Sims *et al.*, 2006) ; [16] (Falkowski *et al.*, 2007) ; [17] (Gersonde & Harwood, 1990)

Remarques complémentaires : Les dates sont en millions d'années. Dernière période du Cénozoïque, correspond au Quaternaire (Q.)

D'après les datations moléculaires (Kooistra & Medlin, 1996), les diatomées seraient apparues à la fin de l'Ère Primaire, probablement après -238 ou -266 millions d'années, même si d'autres auteurs parlent d'une origine plus lointaine vers environ -500 millions d'années (Philippe *et al.*, 1994). Cependant, les premières diatomées hypothétiques n'auraient pas pu être fossilisées (en raison peut-être de la finesse de leur frustule et/ou par destruction par diagénèse)(Round *et al.*, 1990) ou n'auraient pas été retrouvées (distribution géographique trop étroite). Cela expliquerait que les plus anciens fossiles de diatomées, appartenant au genre *Pyxidicula*, auraient été retrouvés au début du Jurassique (-185 millions d'années) (Rothpletz, 1896; Sims *et al.* en 2006). On retrouve dans cette période le « stock ancestral » des diatomées, où très peu d'espèces différentes ont été découvertes. La diversité des diatomées explose plus tardivement, lors du Crétacé inférieur puis supérieur, et au début du Tertiaire, générant des groupes complexes très diversifiés qui colonisent l'ensemble de la planète, comme en témoignent les abondantes traces de diatomées fossilisées découvertes dans les sédiments postérieurs au Crétacé. Une chronologie existe dans l'apparition des grands groupes de diatomées (qui correspondent à des morphologies distinctes), avec dans un premier temps les diatomées centriques radiales puis (multi/bi)polaires, et dans un second temps les diatomées pennées araphides puis raphides (Figure 8 et Figure 12).

2.1.3. Les efflorescences algales

Dans l'environnement aquatique (eaux douces ou marines), lorsque les conditions sont favorables à un assemblage d'espèces ou à un taxon unique, on assiste à une prolifération du phytoplancton, appelée efflorescence algale (en anglais, « algal bloom »). Il se produit alors une augmentation relativement rapide de la population algale (pouvant atteindre 100 à plusieurs millions de cellules par millilitre), se traduisant généralement par une coloration de l'eau qui dépend de la pigmentation des espèces présentes (Figure 13). Même si ces efflorescences sont souvent considérées comme étant dominées par un taxon algal, une étude récente a mis en lumière l'importance de la dynamique de succession des taxons algaux durant une même efflorescence, chacun étant successivement capable de devenir dominant sur un court laps de temps (Needham & Fuhrman, 2016).

Certaines microalgues telles que le coccolithophore *Emiliania huxleyi* sont capables de former des efflorescences qui ne seraient pas nuisibles pour l'environnement (Houdan *et al.*, 2004). Cependant, lorsque les microalgues impliquées dans les efflorescences sont capables de produire des toxines, ou de perturber un écosystème (appauvrissement du milieu en oxygène, etc.), on parle alors d'efflorescences algales nuisibles (en anglais, « Harmful Algal Bloom » ou HAB). Les efflorescences toxiques peuvent avoir de graves conséquences socio-économiques, en contaminant les différents maillons de la chaîne alimentaire comme par exemple les mollusques/crustacés que nous consommons (Landsberg *et al.*, 2005). Elles sont donc particulièrement étudiées et surveillées. Les microalgues marines phares impliquées dans les efflorescences toxiques en France métropolitaine comprennent certains dinoflagellés appartenant aux genres *Dinophysis* (toxines diarrhéiques), *Alexandrium* (toxines paralysantes) et *Karenia* (toxines hémolytiques) et des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* (toxines amnésiantes) (Amzil *et al.*, 2001; Guillou *et al.*, 2002). De nombreuses autres microalgues sont également répertoriées pour leur nocivité (Anderson *et al.*, 2002; Hallegraeff, 1993; Heisler *et al.*, 2008).



Figure 13 : Photo satellite d'une efflorescence phytoplanctonique de coccolithophores, responsable de la coloration de l'eau au large de la Bretagne. Cette photo a été prise le 15 juin 2004 par la NASA (<http://visibleearth.nasa.gov/view.php?id=71344>)

De nombreuses études ont porté sur les efflorescences algales (qu'elles soient nuisibles ou non) et ont montrées que des bactéries, mais aussi des virus pouvaient jouer un rôle fondamental dans le maintien (Matteson *et al.*, 2012) ou au contraire dans leur déclin (Bratbak *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2015a; Mayali & Azam, 2004; Suttle, 2000; Wommack & Colwell, 2000). Cet impact est réciproque car les efflorescences algales sont également connues pour causer des changements importants dans les communautés bactériennes planctoniques (Needham & Fuhrman, 2016; Pinhassi *et al.*, 2004; Rink *et al.*, 2007), mettant ainsi en lumière la complexité des interactions biotiques dans les environnements aquatiques.

Les efflorescences dominées par les diatomées sont fréquentes le long des côtes océaniques et dans la zone euphotique des régions d'upwelling⁸, dans lesquelles les niveaux de nutriments (azote inorganique, phosphore, silice, fer, éléments trace) sont élevés et les températures plus fraîches, en particulier durant le printemps (Armbrust, 2009; Cushing,

⁸ L'upwelling est un phénomène océanographique consistant à une remontée d'eaux froides, qui se produit lorsque de forts vents marins (généralement des vents saisonniers) poussent l'eau de surface des océans, laissant ainsi un vide où peuvent remonter les eaux de fonds, apportant avec elles d'importantes quantités de nutriments, qui « fertilisent » les eaux de surfaces.

1989). En raison de leur fort impact dans la production primaire et dans les flux de carbone le long de la colonne d'eau (paragraphe 2.2.1 et 2.2.2), les efflorescences de diatomées affectent les réseaux trophiques des zones benthiques et pélagiques et sont indispensables au maintien des populations de poissons dans les eaux tempérées (Cushing, 1989). *A contrario*, certaines diatomées ont montré un caractère nocif sur les autres microorganismes marins et peuvent par exemple perturber la reproduction des copépodes (Brugnano *et al.*, 2016; Ianora *et al.*, 2004, 2015), et même induire la mort de mammifères comme les otaries (Scholin *et al.*, 2000).

2.2. Importance écologique du phytoplancton et des diatomées

2.2.1. Sur une courte échelle de temps (durant leur cycle de vie)

Le phytoplancton constitue un maillon trophique majeur puisqu'il est à la base de nombreuses chaînes alimentaires dans les environnements aquatiques (Figure 14). En effet, il fournit de la matière organique directement ou indirectement à presque toutes les créatures marines (zooplancton, crustacés, poissons, requins, etc.) et limite ainsi leur croissance.

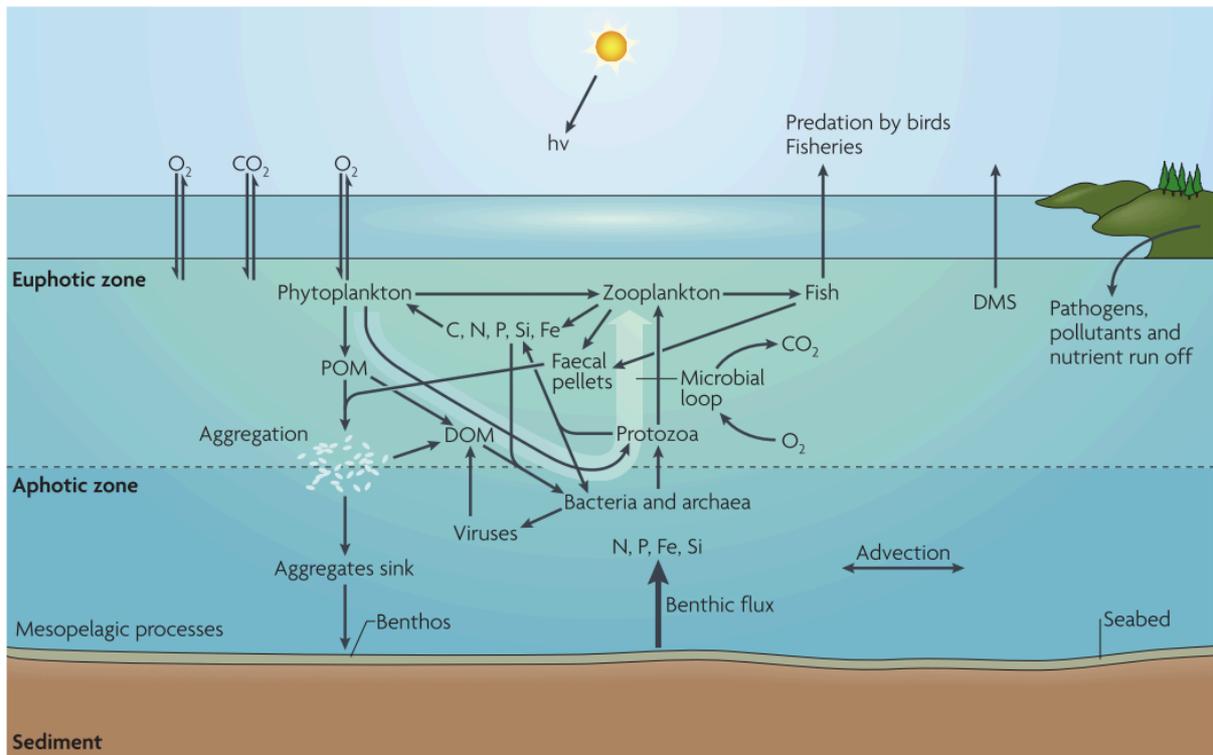


Figure 14 : Organisation des réseaux microbiens dans l'écosystème marin (Modifié d'après Azam & Malfatti, 2007). Une importante fraction de la matière organique, qui est synthétisée par les producteurs primaires, se transforme DOM qui est consommée presque exclusivement par les bactéries. La majorité de la DOM est convertie en CO₂ via la respiration, alors que la fraction restante est assimilée et réintroduite dans la chaîne alimentaire classique (phytoplancton puis zooplancton puis animaux marins dont les poissons). Les bactéries ont un rôle fondamental dans le cycle du carbone grâce au recyclage de la MOD. Cela influence les échanges gazeux à l'interface air-mer comme celui du CO₂ ou DMS. Cette boucle bactérienne influence aussi le stockage du carbone dans les fonds marins, ainsi que les transferts de carbone jusqu'aux animaux marins qui seront consommés par des animaux terrestres. hv, lumière.

On estime que la moitié de la production primaire mondiale est réalisée dans les océans (Falkowski *et al.*, 1998; Field *et al.*, 1998), grâce notamment aux microorganismes photosynthétiques dont fait partie le phytoplancton. En s'intéressant plus particulièrement aux diatomées, on estime qu'elles seraient responsables de près de 40% de cette production annuelle de matière organique des océans (Nelson *et al.*, 1995), ce qui correspondrait à une

proportion importante de la photosynthèse totale de notre planète [environ 10-20%, selon les estimations de Raven & Waite (2004)]. Cela se traduirait par une contribution des diatomées équivalente à celle de toutes les forêts tropicales réunies (Field *et al.*, 1998). Parmi tous les groupes du phytoplancton eucaryote, les diatomées seraient donc le groupe qui contribue le plus à la production primaire dans les océans contemporains (Falkowski *et al.*, 2007). Cette forte contribution fait des diatomées des acteurs clés dans le cycle du carbone mais aussi dans le cycle de la silice (Conley & Carey, 2015; Mann, 1999; Smetacek, 1999; Tréguer *et al.*, 1995). En effet, la silice entre dans la voie de biogénèse de leur frustule (Kröger & Poulsen, 2008; Scala & Bowler, 2001).

Pour comprendre pourquoi les diatomées sont devenues un des groupes les performants dans les océans contemporains, non seulement en terme de diversité, mais aussi en terme de quantité de biomasse et de contribution à la production primaire (Falkowski *et al.*, 2007), il est intéressant de connaître certains de leurs atouts clés qui sont notamment : (i) leur paroi cellulaire siliceuse, (ii) leur cycle de vie atypique, mais aussi (iii) les mécanismes cellulaires qui ont fait leur succès.

(i) Le frustule, qui présente des formes et motifs très variés (Figure 15), offre de nombreux avantages pour la cellule. En effet, la biosynthèse d'une paroi en silice est beaucoup moins énergivore pour un organisme que celle de matériaux organiques (Raven, 1983). Elle pourrait, par ailleurs, servir de bouclier de protection contre les prédateurs planctoniques (Smetacek, 1999). Des mesures ont montré l'exceptionnelle stabilité des parois cellulaires de diatomées suffisante pour résister à une attaque par les outils de broyage de la plupart des prédateurs de diatomées (Hamm *et al.*, 2003). Par ailleurs, il a été démontré que la paroi cellulaire siliceuse de la diatomée *Thalassiosira weissflogii* agissait comme un tampon à proton, qui permettrait une acquisition plus efficace du CO₂ par l'intermédiaire d'une anhydrase carbonique extracellulaire assurant la conversion enzymatique du bicarbonate en CO₂ (Milligan & Morel, 2002). La structure particulière des frustules des diatomées, organisée de façon hiérarchique (couches successives de différentes porosités) pourrait également améliorer la collecte de lumière pour la photosynthèse. En effet, elle agirait comme une paroi de cristaux photoniques (Fuhrmann *et al.*, 2004) capable de diriger et focaliser la lumière (De Stefano *et al.*, 2007), tel un « concentrateur de lumière » pour

optimiser l'utilisation des photons par les photorécepteurs contenus dans les chloroplastes intracellulaires (Gordon *et al.*, 2009; Parker & Townley, 2007). L'ensemble de ces propriétés, conférées au frustule des diatomées, contribuerait à l'important succès écologique qu'on lui reconnaît dans les océans contemporains.



TRENDS in Biotechnology

Figure 15 : Planche comprenant trois cent cellules de diatomées montées individuellement à la main. Les organismes correspondent à des diatomées d'eau douce ou marines, avec des individus récents ou fossiles. Leurs provenances sont nombreuses (Royaume-Uni, Pays-Bas, France, Nouvelle Zélande, Sulawesi, Caraïbes, Océan Indien, Floride, Maryland, Oregon, Montana, Nevada, Colombie-Britannique, Californie, Alaska, Honolulu, Russie). Pour être à l'échelle réelle, la planche devrait mesurer 1,78 x 2,30 mm. Source : Gordon *et al.*, (2009)

(ii) Comme l'illustre la Figure 16, les diatomées ont un cycle de vie assez atypique avec notamment une diminution de la taille des cellules à chaque division cellulaire par mitose (reproduction asexuée), appelée règle de Mac Donald-Pfitzer (Macdonald, 1869; Pfitzer, 1869; Werner, 1977). Cette diminution de taille a son importance, puisqu'elle gouverne le passage de la reproduction asexuée à la reproduction sexuée. En effet, lorsque la cellule atteint une fourchette de taille suffisamment basse, elle devient alors capable de réaliser

la reproduction sexuée (Chepurnov *et al.*, 2004; Werner, 1977), ce qui lui permet alors de retrouver sa taille maximale. En plus du seuil de taille, différents paramètres influent sur le passage de la reproduction asexuée à la reproduction sexuée, et notamment les paramètres environnementaux relatifs à la saison comme la durée d'ensoleillement, la température ou encore la présence de nutriments (Lewis, 1984).

En laboratoire, les conditions d'incubation des cultures de diatomées sont généralement constantes, et les intervalles entre phase de reproduction sexuée et asexuée sont imprévisibles (Armbrust & Chisholm, 1992). Pour « synchroniser » les cycles reproductifs des cellules, il est possible d'induire la reproduction sexuée en croissant de cellules monoclonales de types sexuels opposés (D'Alelio *et al.*, 2009), ou en générant un stress qui peut être osmotique (Godhe *et al.*, 2014), thermique et photique (Drebes, 1966), ou encore nutritif (Davis *et al.*, 1973).

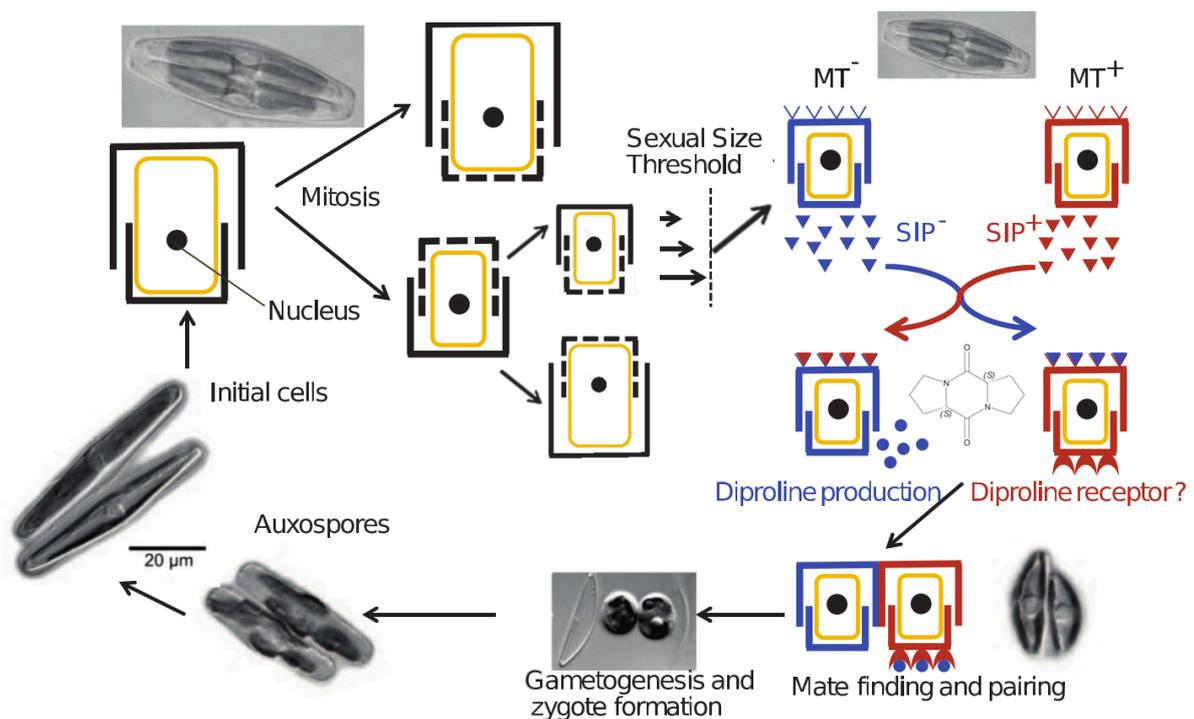


Figure 16 : Cycle de vie de la diatomée *Seminavis robusta*, modifié d'après Moeys *et al.* (2016) et Frenkel *et al.* (2014), avec des images de microscopie de Chepurnov *et al.* (2002, 2008).

Chez les diatomées, la taille des cellules diminue tout au long de la phase végétative (ou phase de reproduction asexuée) à chaque division mitotique. La reproduction sexuée n'est possible que lorsque les cellules ont atteint le seuil de taille sexuelle. A ce moment-là, les cellules de type sexuel + (MT⁺, rôle migrateur) et - (MT⁻, rôle attracteur) commencent à produire des phéromones sexuelles SIP⁺ et SIP⁻, respectivement. Sous l'influence de ces phéromones, MT⁻ sécrète une phéromone d'attraction (la diproline) et MT⁺ exprime probablement des récepteurs à cette phéromone. Les signaux induits par la diproline entraînent une attraction entre MT⁻ et MT⁺ et l'appariement des cellules, après quoi gamètes et zygotes sont formés. Le zygote spécialisé, appelé auxospore, s'allonge pour atteindre la taille initiale de la cellule qui peut alors entrer en division mitotique (reproduction asexuée).

(iii) Une étude récente visant à décrypter les mécanismes photosynthétiques des diatomées a mis en évidence que ces dernières possédaient un processus spécifique permettant une fixation de carbone et une croissance optimisées, ce qui avait probablement fortement contribué au succès écologique des diatomées dans les océans contemporains et donc à leur importante contribution dans la production primaire mondiale. En effet, chez les autres organismes photosynthétiques, la conversion efficace du CO₂ en matière organique par le biais de la photosynthèse, nécessite un contrôle étroit des ratios d'ATP/NADPH (Adénosine Triphosphate / Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit), qui repose principalement sur une série de processus localisés dans les chloroplastes (Figure 17). En revanche, les diatomées régulent le ratio ATP/NADPH par des échanges soutenus entre le chloroplaste et la mitochondrie, compartiment cellulaire dédié à la respiration (Bailleul *et al.*, 2015).

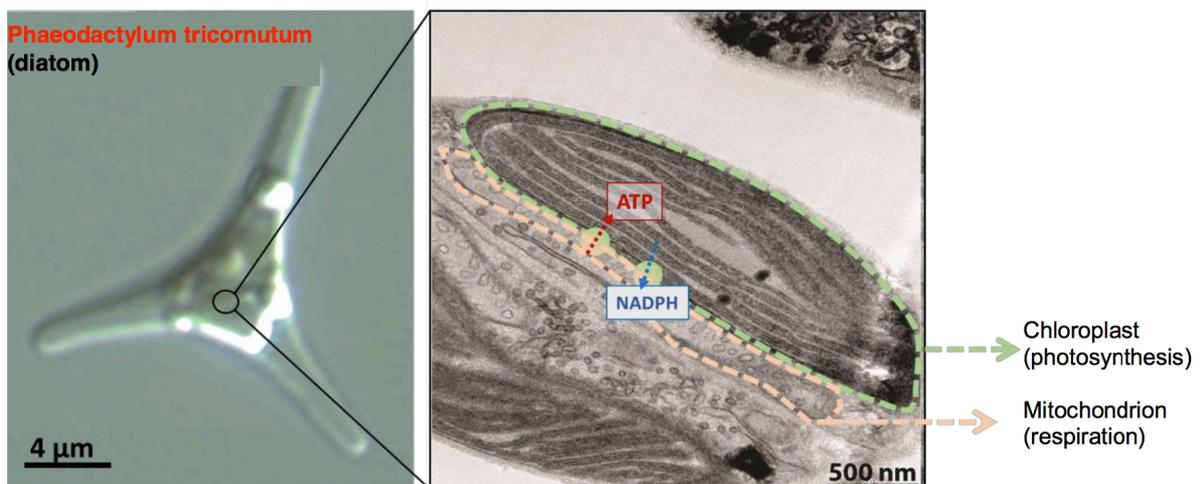


Figure 17 : Représentation d'une diatomée et des mécanismes cellulaires couplant la photosynthèse et la respiration dans cet organisme. Le chloroplaste, dans lequel le NADPH est produit par l'action de la lumière, est accolé à la mitochondrie, siège de la respiration cellulaire qui génère de l'ATP. Les deux compartiments cellulaires peuvent ainsi échanger les molécules d'ATP et de NADPH qu'elles produisent, optimisant la fixation du carbone dans la diatomée (Bailleul *et al.*, 2015).

2.2.2. A moyen terme (directement après leur cycle de vie)

Pendant et à l'issue de leur cycle de vie, certaines microalgues forment des agrégats denses appelés « neiges marines » composés de diverses communautés de phytoplancton, protozoaires et bactéries (Figure 18). Ces agrégats sédimentent d'où un mouvement de matière organique dans les océans qui peut descendre jusqu'au plateau océanique. Ce flux de carbone contribue fortement à la survie des organismes vivants dans les profondeurs. D'ailleurs, il a été démontré que des cellules toujours capables de réaliser la photosynthèse

étaient présent de façon ubiquiste dans les océans profonds jusqu'à -4000 m, générant ainsi un apport de matière organique fraîche (Agusti *et al.*, 2015). La encore, les diatomées sont des contributeurs majeurs, car ils dominent l'ensemble des organismes photosynthétiques toujours vivants dans les océans profonds (Agusti *et al.*, 2015).

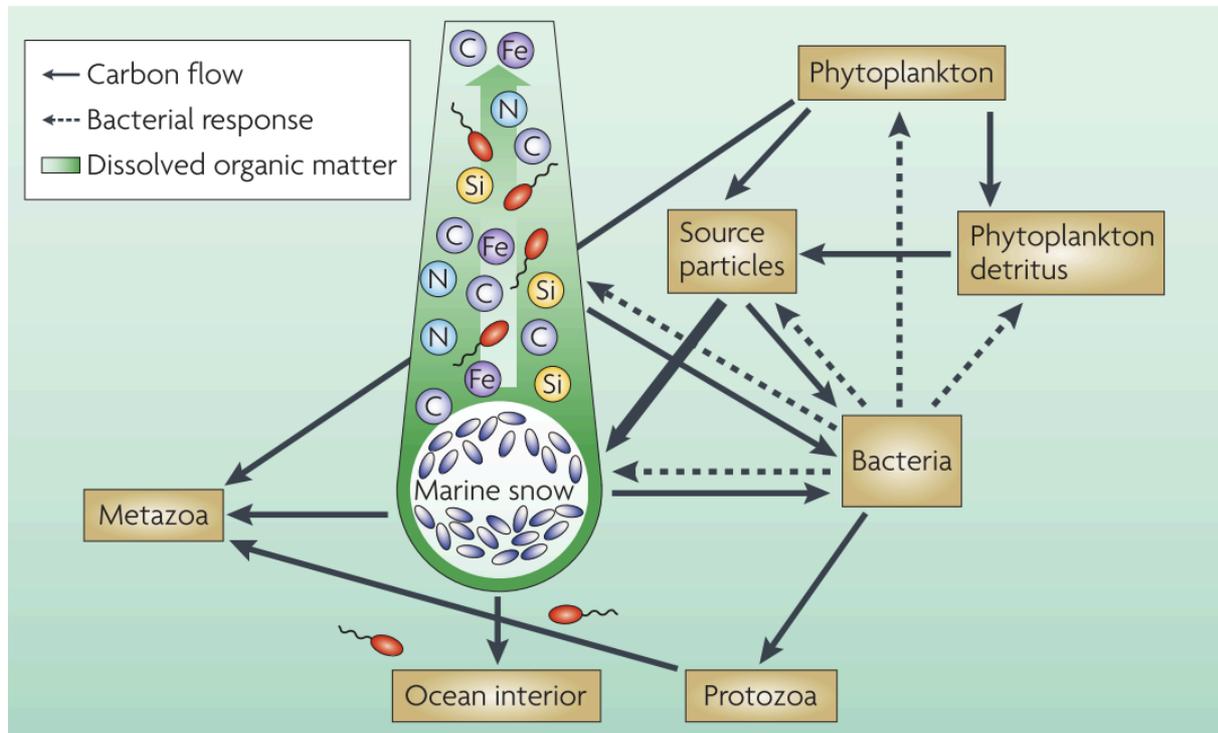


Figure 18 : Différents flux de carbone provenant de la neige marine et des microorganismes qui la compose, d'après Azam & Malfatti (2007). L'agrégation de micro-organismes et de matière organique forme la neige marine (« marine snow » en anglais), qui joue un rôle majeur dans les océans et dans la structuration des écosystèmes marins. Cette neige marine est fortement colonisée par les bactéries, probablement parce qu'elle est formée par des particules préalablement colonisées par les bactéries (comme des organismes phytoplanktoniques sénescents en cours de dégradation) qui transportent du carbone, de l'azote, du phosphore, du fer ou encore du silicium au fond de l'océan. L'importante activité enzymatique des bactéries transforme la MOP de l'agrégat en MOD qui ne sédimente plus, mais se disperse et génère des panaches dans l'océan. Des bactéries environnantes, qui sont attirées par ce genre d'environnements riches en MOD, respirent le carbone pour rejeter du CO₂, ce qui entraîne une production de biomasse capable d'alimenter les réseaux trophiques pélagiques.

2.2.3. A long terme (sur plusieurs siècles à milliards d'années)

A long et très long terme, le phytoplancton est un acteur majeur de la séquestration pérenne du carbone dans les océans et serait en grande partie à l'origine de la formation du pétrole dans les couches sédimentaires profondes. Sur les 200 derniers millions d'années, l'efficacité de la sédimentation de la matière organique dans les sédiments marins aurait été fortement accentuée par l'apparition puis le succès de phytoplancton de grande taille, comme les coccolithophoridés et les diatomées. On considère que la majorité des réserves de pétrole mondiales connues proviendraient de l'enfouissement de la biomasse produite par le phytoplancton eucaryote durant le Mésozoïque et le début du Cénozoïque au niveau des marges continentales et des mers peu profondes (Figure 12). L'augmentation du taux d'oxygène durant l'Éocène et l'Oligocène (2 époques du Paléogène) serait majoritairement due aux diatomées, qui seraient aussi responsable d'une forte part de l'enfouissement du carbone au niveau des marges continentales (Falkowski *et al.*, 2005).

2.2.4. Les microalgues : quand l'écologie inspire une économie

Actuellement, de toutes les applications qui ont été envisagées à partir des microalgues, il semblerait que ce soit la production de biocarburant de troisième génération qui suscite le plus d'intérêt, comme en témoigne le nombre croissant d'études publiées sur le sujet. Cependant la plus grosse barrière qui freine le développement d'une telle ressource reste son coût, qui est encore assez loin d'être compétitif avec le carburant utilisant les énergies fossiles telles que le pétrole. Pour diminuer ce coût, des alternatives prometteuses se développent, comme la production de microalgues à partir de co-produits industriels (bioremédiation des eaux usées domestiques ou provenant des industries, effluents agricoles, etc.). D'autres alternatives comme l'amélioration de la productivité des microalgues sont également testées, comme la recherche de nouvelles souches algales plus productives, mais aussi des techniques plus controversées, comme la modification génétique de certaines souches algales (Ghosh *et al.*, 2016). La culture, transformation et consommation de microalgues ou de leurs produits dérivés peuvent être intégrées dans un cycle capable de générer des produits de haute valeur ajoutée, mais aussi des bioénergies tels que le méthane ou les biocarburants (Figure 19). Les produits issus de la culture du phytoplancton connaissent de nombreuses applications puisqu'on le retrouve dans divers secteurs tels que les secteurs

médical, pharmaceutique, agri- et aquacole, celui des cosmétiques, des biocarburants, des nanotechnologies ou encore la production de colorants naturels (Borowitzka, 2013; Fon Sing *et al.*, 2013; Guedes & Malcata, 2012; Huang *et al.*, 2015; Johansen, 2012; Lee, 2008; Odjadjare *et al.*, 2015; Parker & Townley, 2007).

Par exemple dans le secteur de l'élevage aquacole, les réseaux trophiques issus de l'environnement naturel servent de base pour l'élaboration de l'alimentation. Ainsi, le phytoplancton est couramment utilisé pour nourrir les animaux (sous forme larvaire à adulte), puisque les microalgues fraîches présentent notamment un fort intérêt nutritionnel (Borowitzka, 1997; Brown *et al.*, 1997; Fernández-Pardo *et al.*, 2016; Hemaiswarya *et al.*, 2011; Volkman *et al.*, 1989). Parmi ces microalgues, les diatomées sont largement utilisées en aquaculture, pour leurs valeurs nutritionnelles, mais aussi pour leur facilité de culture (Coutteau & Sorgeloos, 1992; Guedes & Malcata, 2012; Robert & Trintignac, 1995).

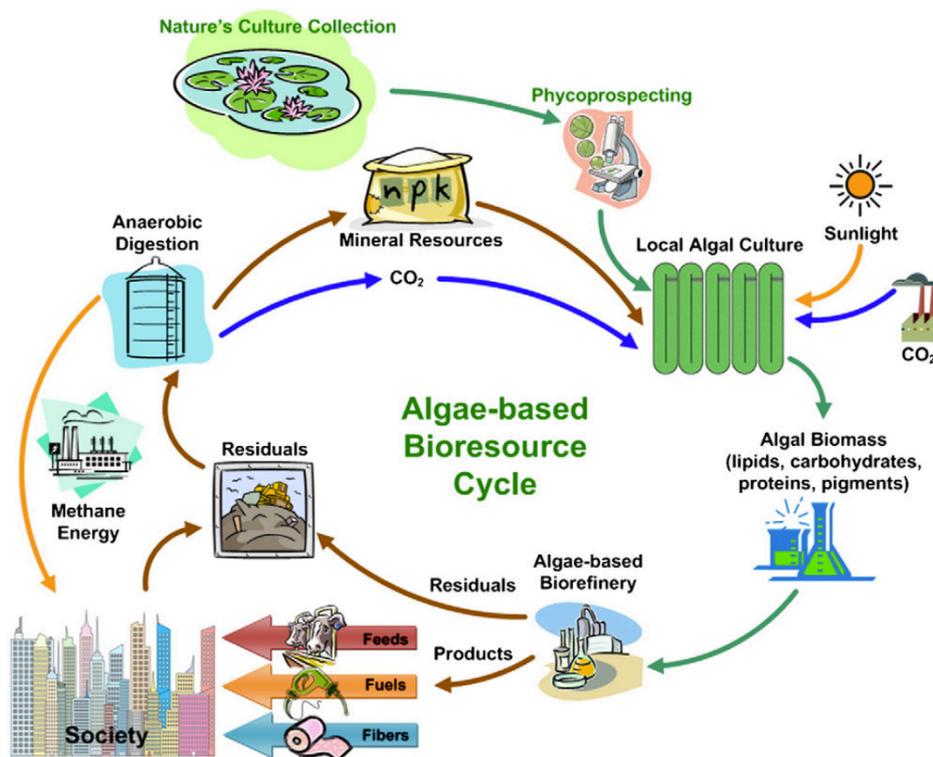


Figure 19 : Cycle de bioressources à base de microalgues. Les microalgues d'intérêt industriel sont isolées et cultivées à partir de la flore locale, générant de la biomasse algale qui est ensuite transformée en bioraffineries pour devenir de produits de consommation. L'action conjuguée de la lumière, de l'apport en CO₂ et de nutriments, permet la croissance des microalgues. Les résidus carbonés résultant de la transformation et la consommation des microalgues sont recyclés par digestion anaérobie ce qui produit de l'énergie et de éléments reminéralisés nécessaires à la culture de microalgues. D'après Wilkie *et al.* (2011).

En plus de leur large contribution à la production primaire mais aussi aux cycles du carbone et de la silice, les diatomées présentent de nombreux intérêts écologiques annexes. Certaines associations d'espèces sont caractéristiques des eaux de bonne qualité alors que d'autres sont plus rencontrées dans les eaux de qualité plus médiocre, ce qui en font de bons témoins et indicateurs de la qualité des eaux. Les diatomées sont couramment utilisées en micropaléontologie car ce sont des fossiles stratigraphiques intéressants (forte abondance et aires de répartition larges) permettant de faire le lien entre des régions éloignées et ont également la propriété de conserver les fossiles d'autres organismes tels les plantes. Les aires de fortes accumulations de fossiles de diatomées forment une roche légère, poreuse et friable appelée diatomite ou terre de diatomée et ont majoritairement été formées au cours du Miocène (Première ère du Néogène). Ces gisements peuvent être d'origine marine (accumulation de diatomées dans les zones d'up-welling) ou continentale (zones lacustres ou volcaniques). Plusieurs mines ou carrières de diatomites sont exploitées industriellement pour en extraire cette diatomite, qui sera utilisée comme abrasif léger (dans les dentifrices par exemple), comme adjuvant de filtration, comme absorbant (dans les litières pour animaux domestiques par exemple), comme isolant, comme stabilisant de la nitroglycérine dans la dynamite, ou encore comme insecticide. En 2015, la production annuelle de diatomite s'élevait à 75 000 tonnes en France, et 2,29 millions de tonnes dans le monde (Source de référence pour la production mondiale de minéraux et utilisée par Smol & Stoermer (2010), mise à jour chaque année : <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2016/mcs2016.pdf>)

De par leur abondance et leur faible coût de production (aquaculture de diatomées ou carrières de diatomites), ainsi que leur diversité et leur biocompatibilité, les diatomées offrent une multitude de possibilités en science des matériaux pour développer des biomatériaux micro- et nanostructurés (Bismuto *et al.*, 2008; Chandrasekaran *et al.*, 2014; De-Bashan & Bashan, 2010; Delalat *et al.*, 2015; Fuhrmann *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2015; Kröger & Poulsen, 2008; Mostafa, 2012; Parker & Townley, 2007; Sanchez, 2015). Il est ainsi possible de les trouver dans les domaines de la santé (fabrication de vecteurs contenant un principe actif thérapeutique, sondes, etc.), de la cosmétique, de l'environnement (capteurs à gaz/volatile en utilisant la photoluminescence intrinsèque de la diatomée, filtres, catalyse, adsorbants de métaux lourds) et dans le domaine de l'énergie (batteries, électrodes négative à base de silicium, photoélectrodes, etc.).

3. Interactions entre microalgues et bactéries

De très nombreuses microalgues telles que les diatomées et les dinoflagellés hébergent des bactéries à leur surface ou à l'intérieur des cellules, et l'on parle alors d'épibiontes ou d'endosymbiontes, respectivement. Des relations très étroites peuvent se mettre en place, et affecter positivement ou négativement chacun des partenaires. Les interactions entre microalgues et bactéries font parti des photosymbioses⁹ et ont fait l'objet de nombreuses études, en particulier dans le cadre d'efflorescences algales nuisibles, qui peuvent être provoquées par différents groupes de microalgues. Dans ce contexte, deux thèmes sont principalement étudiés. Le premier s'inscrit dans un registre fondamental et vise à déterminer le rôle des bactéries dans la prolifération des algues et la production de toxines (Doucette, 1995; Hold *et al.*, 2001b; Martins *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2015). Le second thème, mêlant vision fondamentale et appliquée, s'intéresse à l'effet algicide des bactéries responsable du déclin des efflorescences, dans l'optique de dégager des solutions pour lutter contre ces efflorescences nuisibles (Cho, 2012; Imai *et al.*, 1993; Lovejoy *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2016; Nagasaki *et al.*, 2000; Skerratt *et al.*, 2002; Yoshinaga *et al.*, 1998). Cependant, un grand nombre d'études visant à caractériser et comprendre le rôle des communautés bactériennes associées à des cultures de microalgues (Hold *et al.*, 2001a; Nicolas *et al.*, 2004), ou à des efflorescences environnementales non nuisibles ont également été menées (Bunse *et al.*, 2016; Farnelid *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2013; Mayali *et al.*, 2011; Teeling *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2015a). Dans cette partie, les différents types d'interactions seront expliqués et une étude de la diversité bactérienne et algale connue pour présenter d'éventuelles interactions sera présenté dans le but de définir les grandes tendances qui gouvernent les interactions entre bactéries et microalgues.

⁹ Les photosymbioses concernent les interactions entre deux organismes dont l'un des deux au moins est photosynthétique. Les photosymbioses pélagiques sont plus amplement décrites dans le document en annexe de ce manuscrit. Il s'agit du chapitre d'un livre à paraître prochainement chez Springer, et auquel j'ai contribué. Il a été écrit dans le cadre du projet européen MaCuMBA.

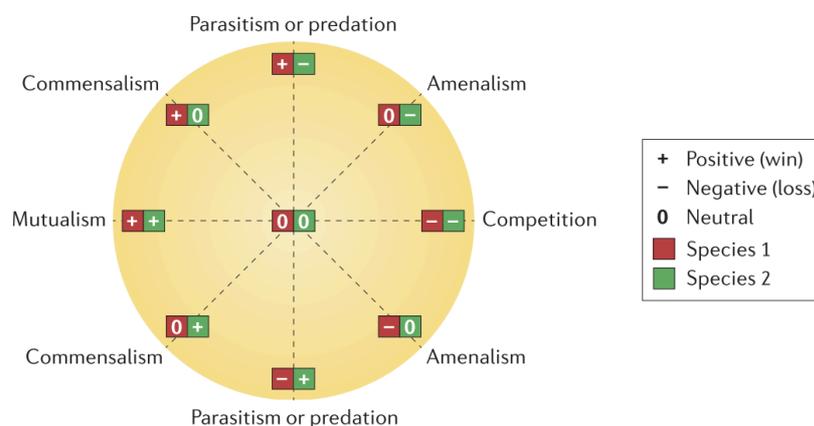


Figure 20 : Combinaisons des différentes interactions écologiques possibles entre deux organismes, d'après Faust & Raes (2012). La représentation sous forme de roue a été introduite par Lidicker, (1979) et a été adaptée pour résumer toutes les interactions possibles par paire. Pour chaque partenaire, il y a trois résultats possibles : positif (+), négatif (-) et neutre (0). Par exemple, dans le parasitisme, le parasite tire profit de la relation (+) tandis que l'hôte est lésé (-), cette relation se traduit ici par les symboles (+ -).

Tableau 1 : Définition des différents types d'interactions écologiques selon Prescott *et al.*, (2003) et Faust & Raes (2012)

Type d'interaction	Définition
Mutualisme	Une interaction entre deux espèces, dans laquelle chaque espèce tire un avantage. Certains auteurs parlent aussi de coopération ou de symbiose; cependant le terme mutualisme est préférable ici, car le mot 'symbiose' peut être utilisé dans un sens plus large pour inclure toutes les relations écologiques, et 'coopération' peut être utilisé pour désigner le mutualisme entre des organismes plutôt que des populations.
Commensalisme	Une des espèces profite de la présence de l'autre. Le commensalisme est souvent trouvé dans le cas de biodégradation, dans lequel l'organisme commensal se nourrit de composés qui sont produits par d'autres membres de la communauté.
Parasitisme et prédation	Le parasitisme est l'une des interactions microbiennes les plus complexes, la frontière entre parasitisme et prédation s'avérant difficile à établir. Il s'agit d'une relation où l'un des deux partenaires tire profit de l'autre et où l'hôte est habituellement lésé. Cela peut comprendre un prélèvement de nourriture sur l'hôte, et/ou l'installation physique dans ou sur l'hôte. Dans le parasitisme, parasite et hôte coexistent en association jusqu'à un certain degré. Selon l'équilibre établi entre les deux organismes, cette coexistence peut varier et passer d'une relation parasite stable à une relation pathogène qui peut être considérée comme une prédation.
Amensalisme	Relation dans laquelle un partenaire est lésé, sans qu'aucun avantage ne profite à l'autre. Il s'agit d'un processus unidirectionnel, basé sur la production par un organisme d'un composé spécifique qui agit négativement sur un autre organisme.
Compétition	Le terme de compétition s'applique quand deux espèces de niche similaire s'excluent entre elles. La compétition s'installe lorsque différents organismes d'une population ou d'une communauté cherchent à s'approprier une même ressource, qu'il s'agisse d'occuper un endroit physique, ou de consommer un aliment limitant particulier.

3.1. Nature des interactions : « pour le meilleur et pour le pire ? »

Les microorganismes (incluant virus, bactéries, archées et protistes) n'existent pas de façon isolée dans l'environnement mais forment des réseaux d'interactions écologiques complexes. Les interactions peuvent soit avoir un impact (positif ou négatif), soit ne pas avoir d'impact sur les espèces impliquées (neutre). La Figure 20 schématise les nombreuses interactions écologiques possibles entre deux espèces : mutualisme, commensalisme, parasitisme (ou prédation), amensalisme et compétition (Définitions détaillées dans le Tableau 1).

Les interactions entre plantes et bactéries au niveau de la rhizosphère sont bien documentées, et de nombreux échanges ont été décrits entre le système racinaire des plantes et les bactéries du sol (Lambers *et al.*, 2009). Le concept de « phycosphère » a été introduit comme l'équivalent pélagique de la rhizosphère (Bell & Mitchell, 1972). Il s'agit de la zone entourant la cellule algale, et dans laquelle des interactions entre bactéries et microalgues peuvent se produire. La phycosphère, qui est chimiquement distincte de l'eau de mer, se caractérise par l'émission de produits extracellulaires algaux, qui peuvent avoir un impact sur les organismes environnants et notamment les bactéries. L'étude des interactions spécifiques entre certains couples microalgues-bactéries ont permis de mettre en lumière différents échanges de métabolites qui sont résumés dans la Figure 21. Les bactéries peuvent avoir une action algicide conduisant à une inhibition voire une lyse cellulaire (Guan *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2007a). Elles peuvent aussi stimuler la croissance algale (Amin *et al.*, 2015; Ferrier *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2008), influencer sur la production ou la modulation de la toxicité (Gallacher *et al.*, 1997; Kopp *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 2003) ou encore inhiber ou promouvoir la formation de kystes ainsi que leur survie après germination (Adachi *et al.*, 2003; Bolch *et al.*, 2011). Les bactéries hétérotrophes peuvent également médier des interactions allelopathiques avec différentes espèces algales en altérant ou métabolisant les composés allélochimiques produits par les algues ou en émettant des substances antibiotiques ou stimulantes de par leur propre métabolisme (Cole, 1982). A l'inverse, les algues peuvent elles aussi exercer des actions sur les bactéries, comme des activités bactéricides conduisant à une inhibition voire une lyse cellulaire (Legrand *et al.*, 2003; Naviner *et al.*, 1999; Senhorinh *et al.*, 2015), ou encore la stimulation de la croissance bactérienne (Bell *et al.*, 1974; Bell & Mitchell,

1972; Johnson *et al.*, 2016) en agissant par exemple sur le quorum sensing (QS) et la production d'homosérines lactones acylées (HLA).

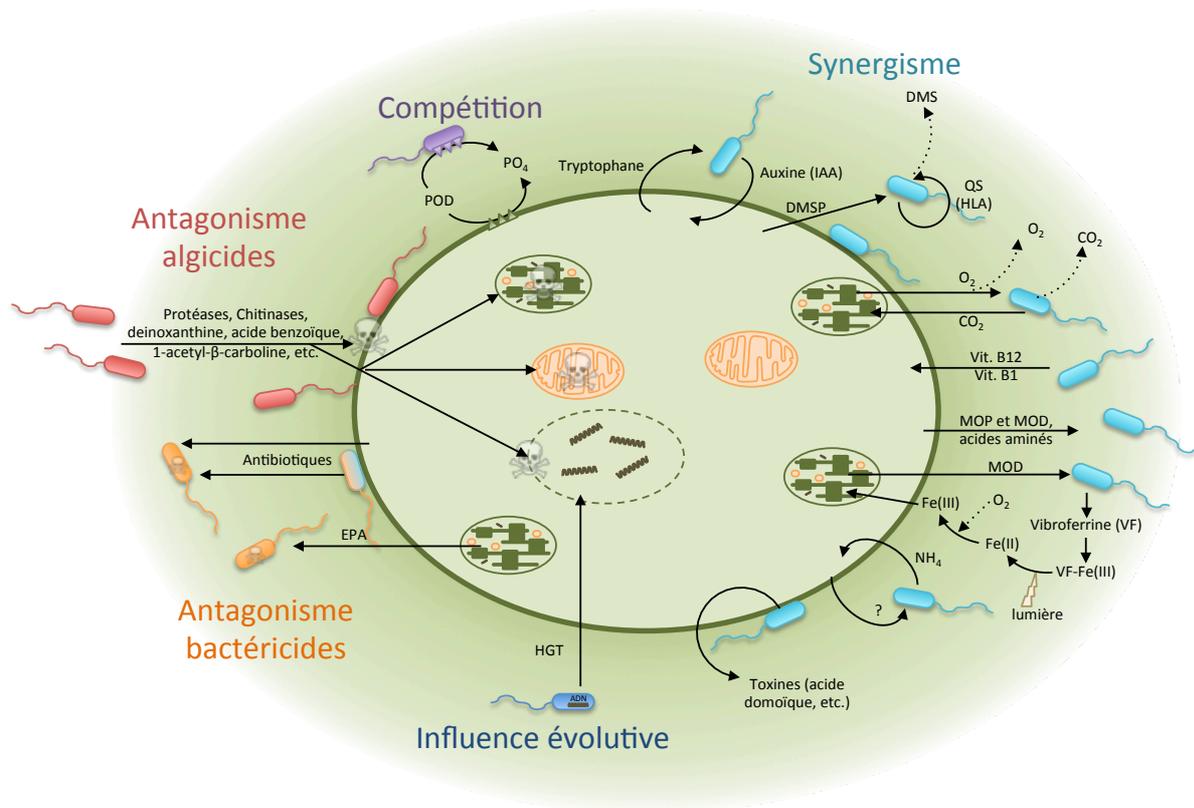


Figure 21 : Différentes interactions mises en évidence entre les bactéries et les microalgues. Ces interactions ont différentes natures : antagonisme (rouge et orange), compétition (mauve) et synergisme ou mutualisme (bleu clair). Le gradient de vert qui entoure la cellule algale représente la phycosphère. Un exemple de transfert horizontal de gène (HGT), témoignant des associations passées entre microalgues et bactéries, est également indiqué (bleu foncé). Les petits batonnets avec flagelle représentent les bactéries ; le grand cercle vert au centre représente une cellule de microalgue renfermant un noyau (cercle en pointillé), des mitochondries (beige) et des chloroplastes. L'activité antagoniste des bactéries contre les microalgues s'exerce par l'intermédiaire de composés algicides de différentes natures. Il peut s'agir de protéases (Lee *et al.*, 2000; Paul & Pohnert, 2011, 2013), chitinases (Li *et al.*, 2016b), deinoxanthine (Li *et al.*, 2015), 1-acétyl-β-carboline (Kim *et al.*, 2015a) ou encore d'acide benzoïque (Lu *et al.*, 2016). Les microalgues peuvent exercer également une activité antagoniste vis-à-vis des bactéries par la synthèse de différents antibiotiques (Desbois *et al.*, 2008, 2009; Ghasemi *et al.*, 2007; Metting & Pyne, 1986; Senhorinh *et al.*, 2015). Dans les régions océaniques pauvres en nutriments, les bactéries et microalgues se heurtent souvent à des ressources limitées pour lesquelles une compétition peut s'établir. Par exemple, bactéries et diatomées produisent des enzymes membranaires, tels que la phosphatase alcaline et des nucléotidase-5' (triangles), qui permettent la dégradation du phosphore organique dissous (PO₄). Cette réaction produit de l'orthophosphate (PO₄) qui est directement absorbé par l'organisme qui catabolise la réaction (réactions couplées) ou libéré dans l'environnement entraînant une compétition des deux organismes pour son absorption, qui est dominée par les bactéries (Thingstad *et al.*, 1993). Les différentes interactions synergiques correspondent à différents échanges métabolites détaillés plus loin dans le chapitre. Les abréviations sont également décrites dans le texte de ce chapitre. Figure adaptée d'Amin *et al.* (2012).

Cependant, le type d'interaction qui existe entre deux espèces n'est pas figé et peut évoluer dans le temps ou varier selon les paramètres biotiques et abiotiques de l'environnement (Faust & Raes, 2012). Par exemple, il a été observé que les bactéries *Pseudomonas* sp. SP48 ou *Cytophaga* sp. AMA-01, *Ruegeria atlantica* AMA-03 et

Pseudomonas sp. AMA-02 produisaient un composé algicide contre les dinoflagellés *Alexandrium tamarense* et *A. catenella*, respectivement, uniquement lorsque le milieu était riche en nutriments, passant du commensalisme (en milieu pauvre) à du parasitisme (en milieu riche) (Amaro *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2007a). Il a également été montré que la même bactérie pouvait soit stimuler, soit inhiber la croissance algale, en fonction de l'état physiologique de l'algue (Grossart, 1999; Seyedsayamdost *et al.*, 2011a). Une autre étude a mis en évidence que la présence d'autres bactéries dans le milieu de culture empêchait une bactérie algicide d'exercer son activité. En effet, les bactéries en question s'excluaient mutuellement par compétition pour les nutriments présents, empêchant la bactérie algicide d'atteindre sa densité cellulaire de lyse (Mayali & Doucette, 2002). Enfin, il a également été démontré que la production de métabolites fortement cytotoxiques pouvait être induite chez la microalgue *Chlorella* sp. lorsque le milieu était carencé en fer. Ces métabolites étaient capables d'empêcher l'inhibition de la microalgue par certaines bactéries pathogènes (Bagwell *et al.*, 2016).

Le mode d'action est souvent étudié pour essayer de comprendre les interactions entre bactéries et microalgues. Soit l'effet d'un organisme sur un autre nécessite un contact et/ou attachement, il s'agit alors d'une action directe. Soit l'effet se produit par le biais d'un composé diffusible, auquel cas l'action est indirecte. Par exemple, la souche *Saprospira* sp. SS98-5 (Bacteroidetes) exerce un effet algicide (prédation) contre *Chaetoceros ceratosporum* par action directe en s'attachant à la cellule algale pour la lyser (Furusawa *et al.*, 2003). Une autre souche algicide, *Pseudomonas* sp. A28, produit une sérine protéase extracellulaire, agissant quant à elle, par action indirecte sur différentes diatomées, notamment *Skeletonema costatum* NIES-324 (Kato *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000). Pour une même bactérie, ce mécanisme d'action pourrait être dépendant de l'hôte, puisqu'il a été démontré qu'une même souche bactérienne (*Aquimarina salinaria* antisso-27) exerçait son activité algicide soit par action directe, soit par action indirecte selon qu'elle agisse sur le chlorophyte *Chlorella vulgaris* 211-31 ou sur la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* MTY01, respectivement (Chen *et al.*, 2012). Enfin, il est également possible que la bactérie utilise les deux modes d'actions (direct et indirect) contre une même microalgue, comme c'est le cas pour *Pseudoalteromonas nigrifaciens* S1 contre le dinoflagellé *Akashiwa sanguinea* (Sun *et al.*, 2016).

L'action que peut exercer une bactérie sur une microalgue et inversement, n'est souvent possible qu'à partir d'une certaine proximité ou densité cellulaire, dans le cas des actions directes ou indirectes, respectivement. Pour être dans ces conditions, les organismes s'appuient sur des mécanismes cellulaires tels que le chimiotactisme associé à la mobilité afin d'atteindre par exemple des « concentrations cellulaires algicides » autour des organismes cibles (Lovejoy *et al.*, 1998). Parfois, cette forte densité cellulaire est atteinte lorsque des bactéries s'attachent à des particules et s'y développent, générant un microenvironnement avec une forte concentration en métabolites (Skerratt *et al.*, 2002). Il est également possible d'observer la formation d'un mucilage (pouvant s'apparenter à un réseau de polysaccharides), permettant de piéger, tel un filet ou un « papier tue-mouche », un autre organisme (Lewin, 1997). Les bactéries glissantes (ou « gliding bacteria ») sont connues pour s'attacher directement à une autre cellule (action directe) et se déplacent par glissement, sans utiliser de flagelles. Ce mécanisme cellulaire est commun aux cyanobactéries et aux *Bacteroidetes* (*Cytophaga* spp., *Kordia* spp., *Flavobacteria* spp., etc.), qui sont connues pour avoir une action directe sur les microalgues (Jarrell & McBride, 2008; Spormann, 1999; Wadhams & Armitage, 2004; Yoshinaga *et al.*, 1998). Peu d'études ont permis d'isoler et de décrire les composés actifs responsables de l'action (bénéfique ou néfaste) d'un organisme sur son hôte et la plupart des études ont utilisé une méthode relativement succincte pour décrire le spectre d'action des composés actifs avec souvent une seule concentration testée d'un composé généralement non purifié. Cependant ce travail s'avère être indispensable dans l'établissement du réel spectre d'action de ces molécules, car bien souvent l'effet est dépendant du couple concentration / durée d'exposition à la molécule. Ainsi, l'étude de Cho (2012) montre l'importance de réaliser des tests de toxicité dans le cadre de l'étude sur les bactéries algicides, afin d'identifier les molécules actives et de déterminer précisément leurs concentrations d'action (dose létale 50% et 100%, dose sans effet toxique observable, etc.) sur différents organismes qui seraient susceptibles de rencontrer cette bactérie algicide dans l'environnement ou dans les systèmes d'élevage aquacole (microalgues toxiques, microalgues non toxiques, formes larvaires et adultes de poissons, mollusques et crustacés, etc.).

Des études récentes ont mis en évidence l'importance de molécules de signal produites par les bactéries que ce soit lors d'interactions directes (contact entre cellule bactérienne et microalgue) ou indirectes. Chez les bactéries, les signaux inter-cellulaires font

couramment référence au QS. Cependant, les signaux impliqués dans le QS ne sont pas restreint à la communication entre bactéries, mais peuvent aussi permettre la communication entre la bactérie et son hôte, c'est ce que l'on appelle la communication inter-règne ou « inter-kingdom signalling » (Hughes & Sperandio, 2008). C'est le cas de *Pseudomonas piscida*, qui est responsable d'une inhibition de la croissance pouvant entrainer la mort chez le coccolithophore *Emiliania huxleyi*, par l'intermédiaire du 2-heptyl-4-quinolone (HHQ), (Harvey *et al.*, 2016). Le HHQ est le précurseur du 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline ou PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) et ils appartiennent à la famille des 4-hydroxy-2-alkylquinolines ou HAQs, molécules impliquées dans le QS (Déziel *et al.*, 2004; Dulcey *et al.*, 2013). Le HHQ et le PQS sont produits durant la phase stationnaire de croissance de la bactérie, agissent comme molécules signaux de la communication cellulaire, mais aussi comme antibiotiques. Ils sont ainsi capables de moduler le comportement de nombreux organismes au sein d'une même espèce, mais aussi chez des espèces très éloignées phylogénétiquement avec notamment un impact sur la virulence, l'apoptose et la viabilité de nombreuses cellules (Bredenbruch *et al.*, 2005; Calfee *et al.*, 2005; Reen *et al.*, 2011). Le HHQ est auto-inductible et peut diffuser de façon passive dans le milieu externe aqueux (Déziel *et al.*, 2004). Il entraîne alors sa propre production par les bactéries (coopération cellulaire) jusqu'à atteindre un seuil critique qui engendre l'activation transcriptionnelle des gènes contrôlant le QS. Son impact est donc important car le QS est un élément clé dans la formation de biofilm, la production de facteurs de virulence (Bredenbruch *et al.*, 2005), et de métabolites secondaires, et peut aussi impacter la mobilité (Reen *et al.*, 2011) et la pathogénèse (Zaborin *et al.*, 2009).

Le DMSP, composé soufré produit notamment par le phytoplancton, est transformé selon deux voies métaboliques par les bactéries (notamment celles du clade des *Roseobacter*), conduisant à la formation de DMS et d'acrylate ou de méthaneéthiol (MeSH) (Figure 23). Le DMS est volatile et est émis dans l'atmosphère, où il contribue à la formation de nuages, alors que l'acrylate est utilisé comme source de carbone par les bactéries. Le MeSH est également une source de carbone, à partir duquel est dérivé du soufre réduit. Une étude récente de W. M. Johnson *et al.*, (2016) montre que des molécules impliquées dans le QS peuvent être synthétisées de façon plus importante par la bactérie *Ruegeria pomeroyi* à la suite d'un contact avec du DMSP, une molécule produite notamment par le phytoplancton. Outre cette

stimulation des molécules du QS, le DMSP induit chez cette bactérie d'importants changements métaboliques qui correspondaient à une façon de s'adapter à un mode de vie coopératif, en prévision des nutriments d'origine phytoplanctonique et d'une densité bactérienne plus forte. La présence de DMSP entraîne par exemple une diminution de la concentration intracellulaire en glutamine, une augmentation de celle de vitamines (B1 phosphorylé et B2) et de métabolites extracellulaires de haute valeur énergétique (alpha-ribazole, riboflavine, shikimate, etc.) et la sécrétion de métabolites soufrés issus de la transformation du DMSP (MeSH, DMS, MTA¹⁰, etc.). Ce comportement est susceptible de se produire dans des « neiges marines » (Partie 2.2.2), ce qui indique que cette réponse peut influencer sur le devenir de la matière organique. Par ailleurs, le fait que les Alphaproteobacteria soient particulièrement abondantes dans les océans (Figure 3), et que le DMSP soit produit par des microalgues très diverses [incluant la diatomée *Thalassiosira pseudonana*, le coccolithophore *E. huxleyi*, la chlorophyte *Tetraselmis* sp. (Gage *et al.*, 1997; Kettles *et al.*, 2014)], il est possible que le comportement observé chez *R. pomeroyi* soit également rencontré chez d'autres membres de cette classe, conférant au DMSP un rôle déterminant dans la signalisation inter-règne du microbiote océanique.

La production de méthanol est une faculté largement répandue parmi les organismes phytoplanctoniques marins tels que certaines cyanobactéries, diatomées ou encore certains coccolithophores (Mincer & Aicher, 2016). En plus d'être un composé d'intérêt climatologique, le méthanol est aussi un substrat particulièrement prisé des bactéries méthylophiles. En effet, différents groupes bactériens majeurs ne se développent qu'en présence de méthanol (méthylophiles obligatoires), comme l'un des membres des bêtaproteobactéries appartenant au clade OM43 (Giovannoni *et al.*, 2008). Ce métabolisme justifierait leur détection quasi exclusive dans les écosystèmes océaniques côtiers productifs (Connon & Giovannoni, 2002; Cottrell & Kirchman, 2000; Rappé *et al.*, 1997, 2000; Song *et al.*, 2009), notamment durant les efflorescences phytoplanctoniques (Mayali *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2015a) et également dans des cultures de microalgues (Alavi *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2015).

¹⁰ Le MTA correspond au 5'-désoxy-5'-(méthylsulfanyl)adénosine et est notamment un co-produit de la synthèse d'HLA qui est une molécule impliquée dans le QS.

D'autres métabolismes associant microalgues et bactéries ont également été mis en évidence, comme ceux impliquant la fixation d'azote. En effet, les microalgues eucaryotes sont capables d'utiliser l'azote atmosphérique N₂ uniquement lorsqu'elles sont associées à des bactéries diazotrophes (Krupke *et al.*, 2014; Raven & Giordano, 2016; Usher *et al.*, 2007).

Différentes approches ont récemment été utilisées pour caractériser les interactions entre bactéries et microalgues (Figure 22). Il est clairement établi que des interactions se produisent au niveau de la phycosphère entourant les cellules algales, qui est un lieu riche en MOD, particulièrement prisée des bactéries hétérotrophes. Des outils de base tels que les analyses biochimiques et microbiologiques standards, utilisés depuis plusieurs décennies, ont permis de mettre en évidence la production de nombreux micronutriments produits par les bactéries dans le cadre d'interactions, tels que des hormones de croissance (auxines¹¹), des vitamines (B1, B12) ou encore des antibiotiques et des composés algicides (Croft *et al.*, 2005; Haines & Guillard, 1974; Seyedsayamdost *et al.*, 2011a; Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Plus récemment, les avancées de la biologie moléculaire ont fait naître un arsenal de « techniques -omiques » (métabolomique, métagénomique, transcriptomique, protéomique, génomique etc.) qui ont permis de décrire plus précisément les mécanismes impliqués dans différentes interactions (Amin *et al.*, 2015; Beliaev *et al.*, 2014; Guan *et al.*, 2015; Krupke *et al.*, 2014; Paul *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2016).

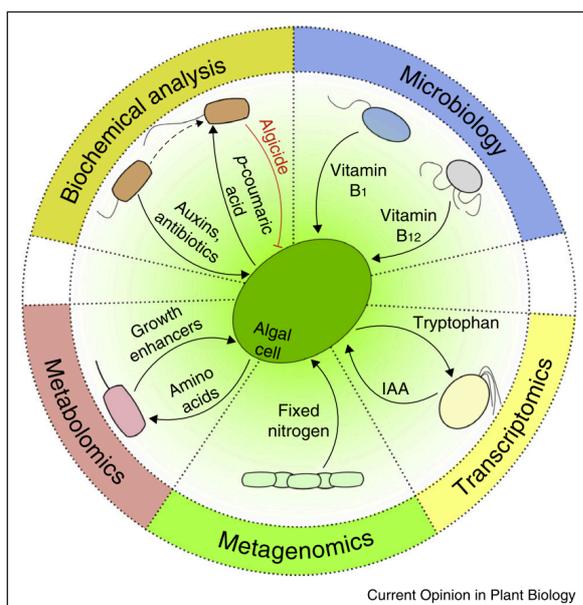


Figure 22 : D'après Cooper & Smith (2015), inventaire des approches utilisées pour étudier les interactions microalgues-bactéries et principaux échanges de métabolites décelés.

¹¹ La forme majoritaire de l'auxine est l'acide 3-indole-acétique (AIA ou IAA en anglais)

3.2. Bactéries couramment associées aux microalgues et tendances dans la nature de leurs actions

Le microbiote océanique est dominé par des bactéries oligotrophes (stratégies K¹²), dont la croissance lente est adaptée à des faibles concentrations en nutriments et sont caractérisées par des génomes simplifiés (Giovannoni *et al.*, 2014; Grote *et al.*, 2012; Swan *et al.*, 2013). Lorsqu'une efflorescence phytoplanctonique se produit, un changement de la diversité bactérienne survient, se traduisant par une dominance de bactéries copiotrophes (stratégies R⁸) dont la croissance est rapide et adaptée à des environnements riches en nutriments. Ce sont également ce type de bactéries qui sont les plus communément cultivées en laboratoire (Milici *et al.*, 2016). Il n'est alors pas surprenant de constater une diminution de la richesse en OTUs dans les zones d'efflorescences algales par rapport aux zones sans efflorescence (Rink *et al.*, 2007; Teeling *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015a). Ainsi, dans le cas particulier des études sur les interactions avec le phytoplancton dans l'environnement, les communautés bactériennes associées aux efflorescences algales sont généralement dominées par un nombre limité de lignées de bactéries hétérotrophes (Buchan *et al.*, 2014). Ce sont principalement des membres de *Flavobacteriia*, des *Alphaproteobacteria* (incluant des membres des *Rhodobacteraceae* tels que les membres du clade des *Roseobacter*) et des *Gammaproteobacteria* (comme des membres des *Alteromonadaceae*).

Même s'il est délicat de déterminer quelles actions sont spécifiques à une souche, une espèce bactérienne ou à un groupe bactérien, il est tout de même possible de dégager des tendances en se basant sur les données disponibles.

Parmi les bactéries exerçant un effet algicide, il est courant de retrouver des genres appartenant aux (i) **gammaproteobactéries** tels qu'*Alteromonas* (Cho, 2012; Imai *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1999; Nagai & Imai, 1999; Yoshinaga *et al.*, 1995, 1998), *Pseudoalteromonas* (Amaro *et al.*, 2005; Holmström & Kjelleberg, 1999; Kato *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Lovejoy

¹² Chez les êtres vivants, il est possible de distinguer 2 stratégies opposées liées à leur reproduction. Les stratégies K correspondent aux organismes dont le taux de reproduction est faible et le temps de vie est généralement long lié à une adaptation à des conditions de vie stables (approvisionnement régulier en ressources, taux de mortalité faible). A l'opposé, les stratégies R ont un fort taux de reproduction et de croissance lié à des conditions de vie instables et qui compense un fort taux de mortalité.

et al., 1998; Mitsutani *et al.*, 2001; Skerratt *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2007a; Yoshinaga *et al.*, 1997), ***Pseudomonas*** (Afi *et al.*, 1996; Baker & Herson, 1978; Delucca & Mccracken, 1977; Hold *et al.*, 2001a; Lee & Park, 1998), ***Bowmanella*** (Jiang *et al.*, 2014), ***Vibrio*** (Yoshinaga *et al.*, 1997), ***Acinetobacter*** (Su *et al.*, 2016; Yoshinaga *et al.*, 1997) et ***Xanthomonas*** (Delucca & Mccracken, 1977), (ii) aux ***Bacteroidetes*** avec les genres ***Cytophaga*** (Amaro *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 1997; Furuki & Kabayashi, 1991; Furuki, 1992; Imai *et al.*, 1991, 1993; Mitsutani *et al.*, 1992; Nagasaki *et al.*, 2000; Rashidan & Bird, 2001; Stewart & Brown, 1969; Toncheva-Panova & Ivanova, 1997; Yoshinaga *et al.*, 1998), ***Flavobacterium*** (Afi *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1997; Delucca & Mccracken, 1977; Doucette *et al.*, 1999; Fukami *et al.*, 1992; Mayali & Doucette, 2002; Yoshinaga *et al.*, 1997), ***Saprospira*** (Furusawa *et al.*, 2003; Sakata & Yasumoto, 1991; Sakata, 1990; Sakata *et al.*, 1991), ***Aquamarina*** (Chen *et al.*, 2011, 2012), ***Cellulophaga*** (Skerratt *et al.*, 2002), ***Zobellia*** (Skerratt *et al.*, 2002) et ***Kordia*** (Skerratt *et al.*, 2002; Yoshinaga *et al.*, 1998), (iii) aux **alphaproteobactéries** avec le genre ***Ruegeria*** (Amaro *et al.*, 2005), (iv) aux ***Bacilli*** avec les genres ***Bacillus*** (Fulbright, 2015; Guan *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2009; Mu *et al.*, 2007; Sawayama *et al.*, 1991; Skerratt *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2015b) et ***Planomicrobium*** (Skerratt *et al.*, 2002) et (v) aux ***Actinobacteria*** avec les genres ***Micrococcus*** (Park *et al.*, 1998) et ***Streptomyces*** (Cai *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014).

En ce qui concerne les bactéries qui améliorent la croissance des microalgues, on retrouve de nombreuses bactéries connues pour leur production de vitamine B₁₂, avec principalement des **alphaproteobactéries** telles que ***Mesorhizobium loti*** (Grant *et al.*, 2014; Kazamia *et al.*, 2012), ***Ensifer meliloti*** (Xie *et al.*, 2013) et ***Dinoroseobacter shibae*** (Wagner-Döbler *et al.*, 2010) ou **gammaproteobactéries** comme ***Halomonas sp.*** (Croft *et al.*, 2005). D'autres bactéries améliorant la croissance algale, sans lien direct avec la production de vitamine, ont également été identifiées avec par exemple les **gammaproteobactéries** ***Citrobacter sp.*** (Ahamed *et al.*, 2015), ***Alteromonas sp.*** (Le Chevanton *et al.*, 2013), et ***Pseudomonas sp.*** et ***Xanthomonas sp.*** (Delucca & Mccracken, 1977), la **flavobactérie** ***Muricauda sp.*** (Le Chevanton *et al.*, 2013) et ***Flavobacterium sp.*** (Delucca & Mccracken, 1977) ou encore ***Bacillus sp.*** (***Bacilli***) (Liu *et al.*, 2008).

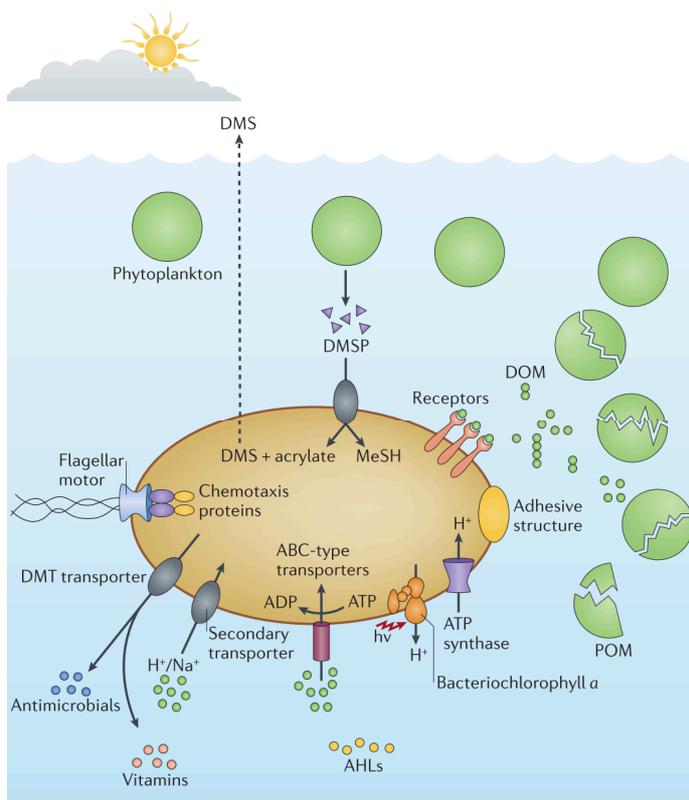
La nature des actions que peuvent exercer les bactéries vis-à-vis des microalgues reste cependant délicate à définir pour chaque taxon bactérien individuellement. Des études ont

montré une certaine spécificité des associations bactéries-microalgues, où les bactéries seraient spécifiques et adaptées aux microalgues avec lesquelles elles cohabitent en exerçant une action positive sur leur hôte, et parfois inhiberaient même les autres microalgues (Amin *et al.*, 2012; Bagatini *et al.*, 2014; Bunse *et al.*, 2016; Delucca & Mccracken, 1977; Eigemann *et al.*, 2013; Guannel *et al.*, 2011; Jasti *et al.*, 2005; Needham & Fuhrman, 2016; Sison-Mangus *et al.*, 2014). Cette spécificité est cependant discutée dans d'autres études (Hold *et al.*, 2001a; Sapp *et al.*, 2007b).

Parfois, certaines bactéries associées aux microalgues peuvent ne pas impacter directement la microalgue (neutralisme vis-à-vis de l'algue), mais elles peuvent avoir un rôle dans l'inhibition des autres bactéries comme des bactéries algicides et dans ce cas apportent une protection à l'algue qui en retour lui apporte des substrats nutritifs (mutualisme) (Sison-Mangus *et al.*, 2014). L'inhibition d'une bactérie par une autre bactérie est appelée antagonisme inter-bactérien. En se basant sur l'étude de l'activité de 86 isolats bactériens, Long & Azam (2001) ont étudié les interactions antagonistes inter-bactéries et ont observé qu'il était plus courant d'observer un comportement antagoniste chez les bactéries capable de s'attacher à des particules que chez les bactéries vivant sous forme libre. L'exemple le plus frappant est celui des alphaproteobactéries, pour lesquelles la production de composés antagonistes était très majoritairement rencontrée chez les bactéries attachées (plus forts spectres d'inhibition chez les genres *Phaeobacter* et *Leisingera*). Par ailleurs, ils ont mis en évidence que les gammaproteobactéries (*Marinomonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Vibrio* sp. et *Photobacterium* sp.) étaient les bactéries qui produisaient le plus de composés inhibiteurs, mais aussi qui étaient les plus résistantes à ces composés. En revanche, les *Bacteroidetes*, qui étaient les moins productifs, étaient aussi les plus sensibles lors d'interactions antagonistes.

De nombreuses études ont identifié des associations spécifiques entre le phytoplancton et certaines espèces du clade des *Roseobacter* et de la famille des *Flavobacteriia*. Ainsi, ces deux groupes d'organismes sont apparus comme les principaux modèles pour l'étude des interactions entre bactéries et microalgues. Différents mécanismes cellulaires liés à ces bactéries ont été mis en évidence, comme l'illustre les Figure 23 et Figure 24, et sont décrits dans les paragraphes suivants (Buchan *et al.*, 2014).

Comme présenté sur la Figure 23 les membres du clade des *Roseobacter* utilisent une large gamme de produits de bas poids moléculaire dérivés du phytoplancton comme source de carbone, d'azote et de phosphore (représenté ici par la DOM). Un chimiotactisme en direction de plusieurs de ces composés dérivés du phytoplancton a été démontré (Miller *et al.*, 2004) et les *Roseobacter* possèdent plusieurs systèmes de transport qui pourraient servir à l'absorption de petites molécules, incluant des transporteurs dépendant de l'ATP [tels les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette)] et des transporteurs secondaires qui peuvent utiliser les gradients électrochimiques pour la translocation membranaire, tels que les TRAP (tripartite ATP-independant periplasmic) et les systèmes permettant l'émission de métabolites tels que les DMT (Drug-metabolite Transporter). Les TRAP permettent d'importer des acides carboxyliques alors que les DMT permettent d'exporter des métabolites secondaires, incluant des facteurs de croissance pour le phytoplancton (tels que l'auxine ou les vitamines) et des composés antimicrobiens qui peuvent fournir un avantage compétitif aux *Roseobacter* lors de la colonisation de la surface du phytoplancton. Les molécules signaux du QS, typiquement les HLA, sont produites par de nombreuses souches de *Roseobacter* et ont montré un rôle dans la régulation de la production de composés antimicrobiens en fonction de la densité cellulaire. En plus de l'oxydation de la matière organique, de nombreux génomes de *Roseobacter* possèdent les gènes pour des pompes à protons à base de bactériochlorophylle *a* qui sont activés par la lumière et qui contribuent au gradient électrochimique de la membrane,



électrochimique de la membrane, pouvant générer de l'ATP via des ATP synthases, ce qui facilite le transport ou actionne les moteurs flagellaires. Des structures adhésives pour l'attachement à des surfaces sont également couramment observées dans les isolats de *Roseobacter* (Buchan *et al.*, 2014).

Figure 23 : Caractéristiques physiologiques des bactéries appartenant au clade des *Roseobacter* impliqués dans leur association avec le phytoplancton et les matériaux phytodétritaux (Buchan *et al.*, 2014). Abréviations décrites dans le texte.

Les génomes de bactéries appartenant aux *Flavobacteriia* codent pour des enzymes hydrolytiques extracellulaires associées à la membrane (Figure 24) comme les laminarinases et les β -D-fucosidases qui dégradent des composés de haut poids moléculaire qui ne peuvent pas passer à travers les membranes bactériennes. Les *Flavobacteriia* ont des systèmes multiprotéiques extracellulaires très efficaces qui se lient aux grosses molécules, les digèrent par voie enzymatique, et transportent les produits formés via des transporteurs spécifiques tels que le système TBDT (TonB-dependent transporter). Les *Flavobacteriia* ont des transporteurs supplémentaires qui dépendent de l'ATP de type ABC ou qui ne dépendent pas de l'ATP comme les transporteurs secondaires qui facilitent l'absorption de composés de bas poids moléculaire provenant de la MOD du phytoplancton. Certaines souches possèdent des adhésines de mobilité à leur surface cellulaire, comme les SprB et les RemA, qui sont nécessaires à la mobilité de surface par de type gliding. D'autres protéines de surface, qui pourraient être des adhésines, en raison de la présence de motifs peptidiques répétés et conservés, peuvent faciliter l'attachement à des surfaces vivantes ou mortes telles que la MOP. Des facteurs de virulence comme les protéases, sont codés dans certains génomes de *Flavobacteriia* et peuvent avoir des activités algicides. De nombreux génomes de *Flavobacteriia* codent également pour des rhodopsines qui fonctionnent comme des pompes à ions (H^+ , Cl^- ou Na^+) activées par la lumière. Bien que leurs fonctions durant les efflorescences de phytoplancton n'aient pas encore été élucidées, les gradients de H^+ et de Na^+ peuvent être utilisés pour conduire la translocation de substrat ou la production d'ATP via des ATP synthases, tandis que les pompes à Cl^- sont probablement impliquées dans le maintien d'un équilibre ionique intracellulaire approprié (Buchan *et al.*, 2014).

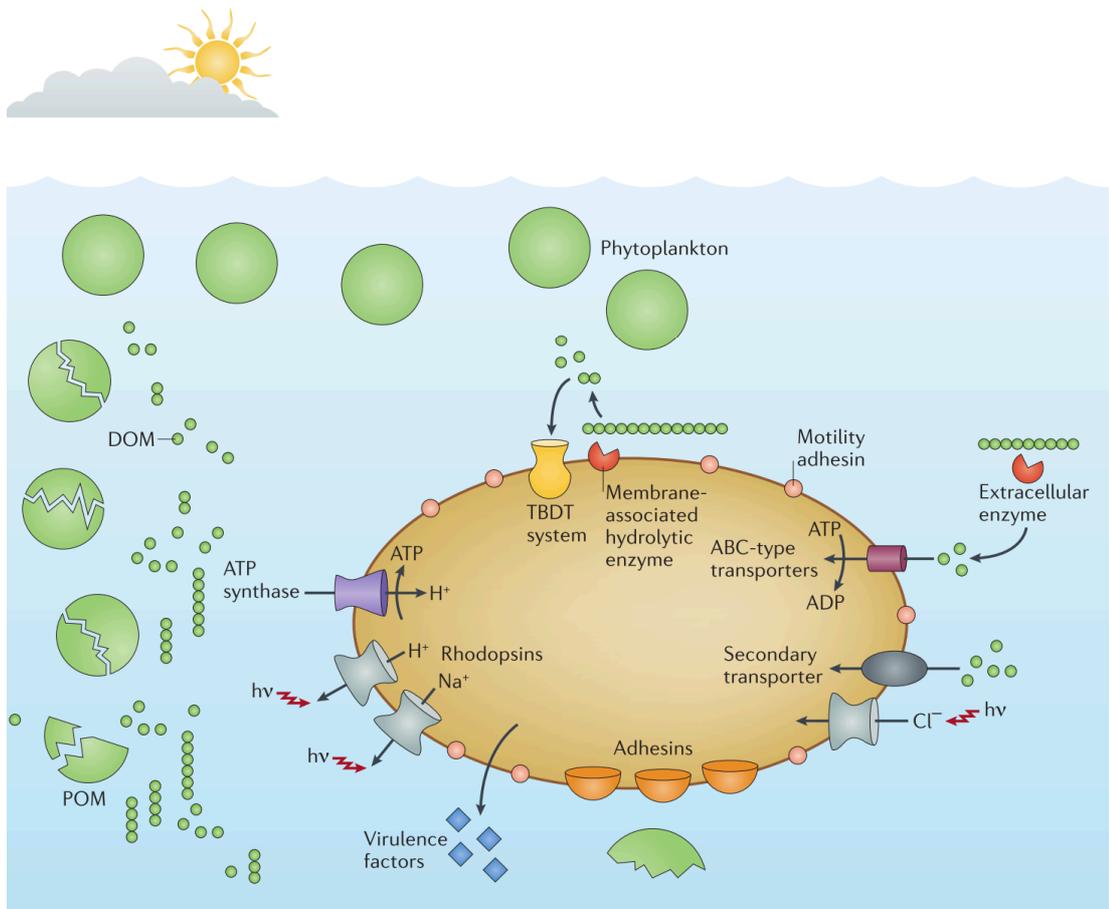


Figure 24 : Caractéristiques physiologiques des *Flavobacteriia* impliquées dans leur association avec le phytoplancton et la matière organique dérivée du phytoplancton (Buchan *et al.*, 2014). Abréviations décrites dans le texte.

Cet inventaire des bactéries exerçant un effet sur les microalgues n'est pas exhaustif, car tous les cas d'interactions n'ont pas été étudiés (tâche impossible au vu de l'immense diversité des bactéries et des microalgues marines et de leur perpétuelle évolution), mais aussi car certaines bactéries présentées dans les études d'interactions n'ont qu'une identification approximative (par exemple Haines & Guillard, 1974) ou n'ont pas été encore décrites. En revanche, depuis une vingtaine d'années, on assiste à une explosion de l'utilisation d'outils de biologie moléculaire à laquelle s'ajoute la description de nouveaux taxons bactériens, ce qui génère un enrichissement progressif des bases de données, apportant plus de précision sur l'identité des organismes étudiés, mais aussi sur les mécanismes impliqués dans les interactions.

3.3. Spécificité des interactions entre bactéries et microalgues eucaryotes

Des études récentes ont documenté les relations complexes qui existent entre les bactéries hétérotrophes et les producteurs primaires que sont les microalgues (par exemple S A Amin *et al.*, 2015, Durham *et al.*, 2015). L'ensemble des effets (allant du mutualisme à la compétition), qu'ils soient exercés par action directe ou indirecte, est aussi caractérisé par un spectre d'action. Le spectre d'action se définit par l'ensemble des espèces qui sont atteintes par l'action d'une autre espèce. Plus ce spectre d'action est grand, plus l'espèce aura une action généraliste, qui concernera plusieurs espèces au sein d'un taxon, voire différentes espèces de différents groupes. A l'inverse, plus il sera petit, plus l'espèce exercera une action spécifique. Pour la *Cytophaga* sp. A5Y (*Bacteroidetes*), il a été démontré qu'elle exerçait une action algicide en lysant les diatomées *Dytilum brightwellii*, *Skeletonema costatum* NIES-324, et *Thalassiosira* sp. ainsi que le raphidophyte *Chatonella antiqua* NIES-1, mais ne pouvait lyser ni la diatomée *Chaetoceros didymum* ni le dinoflagellé *Gymnodinium nagasakiense* G303-AX2 (Mitsutani *et al.*, 1992). Dans les prochains paragraphes, quelques exemples d'interactions entre bactéries et les principaux groupes de microalgues (cyanobactéries, raphidophytes, dinoflagellés et diatomées) sont présentés.

3.3.1. Interactions avec les cyanobactéries

Il est courant de constater que des communautés bactériennes hétérotrophes très diversifiées coexistent avec les efflorescences de cyanobactéries que ce soit en eaux douces ou en mer (Berg *et al.*, 2009). Comme les cyanobactéries d'eau douce font l'objet d'un plus grand nombre d'études que les cyanobactéries marines, la quasi-totalité des études traitant des interactions entre cyanobactéries et bactéries hétérotrophes concernent les environnements d'eau douce (Bagatini *et al.*, 2014; Christoffersen *et al.*, 1990; Dziallas & Grossart, 2011; Eiler & Bertilsson, 2004; Rashidan & Bird, 2001). La diversité bactérienne associée aux cyanobactéries inclut des *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Firmicutes* ou encore *Deinococcus-Thermus*. Certaines cyanobactéries produisent des toxines pouvant avoir un rôle dans l'attraction de bactéries mutualistes (Kaebernick & Neilan, 2001) et dans la communication inter-cellulaire (Makower *et al.*, 2015). Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* est attiré par chimiotactisme par la

cyanobactérie *Anabaena* et ces organismes interagissent alors dans une relation mutualiste en partageant l'azote fixé disponible. *Microcystis aeruginosa* montre un meilleur taux de fixation du CO₂ lorsqu'il est associé à des bactéries et des protistes brouteurs et il a été suggéré que ces hôtes étaient attirés par l'intermédiaire de cyanotoxines (Paerl & Millie, 1996). Une étude récente a décrit l'activité algicide de la souche bactérienne *Acinetobacter* sp. J25 contre *Microcystis aeruginosa*, une cyanobactérie responsable d'efflorescences algales nuisibles. Des métabolites très stables (résistants aux radiations, à la pression, à la stérilisation thermique) sécrétés par la bactérie induisent une lyse de la cyanobactérie. Cette lyse est due à une interaction indirecte puisqu'elle ne dépend pas de la bactérie elle-même, mais des métabolites qu'elle sécrète (Su *et al.*, 2016). Une autre molécule antagoniste sécrétée par la cyanobactérie *Lyngbya majuscula* et identifiée comme étant un malyngolide, interfère dans la communication cellulaire des bactéries hétérotrophes en inhibant le QS (Dobretsov *et al.*, 2010). Une revue a fait état de l'ensemble des bactéries présentant un effet antagoniste vis-à-vis de la cyanobactérie *Microcystis*, incluant des taxons appartenant aux *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* (Van Wichelen *et al.*, 2016). Quelques modes d'actions ont été élucidés comme la production de différents composés algicides, mais de très nombreuses actions algicides ne sont que très brièvement analysées avec uniquement une description du mode d'action direct/indirect, selon qu'il s'agisse d'une action nécessitant un contact cellulaire ou non.

Parmi les quelques études réalisées sur interactions entre cyanobactéries marines et bactéries hétérotrophes, celle de Beliaev *et al.* (2014) a permis de mettre en évidence la complexité des interactions entre la cyanobactérie *Synechococcus* sp. PCC 7002 et l'hétérotrophe *Shewanella putrefaciens* W3-18-1, grâce à une analyse transcriptomique. De potentielles nouvelles interactions ont été suggérées entre les deux souches, notamment des échanges de métabolites spécifiques (methionine, alanine, fer disponible) et une protection par la cyanobactérie contre le stress oxydatif. Par une approche protéomique, Christie-Oleza *et al.* (2015) ont identifié toute une gamme d'enzymes hydrolytiques sécrétées par des bactéries appartenant au clade des *Roseobacter* pour dégrader les molécules produites par *Synechococcus*.

Une étude sur un autre genre de cyanobactéries marines, *Prochlorococcus*, co-cultivé avec plus d'une centaine de bactéries hétérotrophes a permis de mettre en évidence une

grande diversité d'interactions (Sher *et al.*, 2011). La majorité des co-cultures avait un effet promoteur sur la croissance de la cyanobactérie, et se manifestait principalement par l'intermédiaire de composés diffusibles. Cependant des réactions antagonistes et des interactions nécessitant une forte proximité cellulaire ont également été observées. Enfin, parmi la centaine de souches bactériennes testées, celles qui présentaient une forte proximité phylogénétique entre elles semblaient exercer la même action lors des co-cultures.

Une étude traitant de la diversité des bactéries hétérotrophes associées aux cyanobactéries a identifié 89 souches bactériennes capables d'améliorer la croissance des cyanobactéries et 19 souches inhibant sa croissance (Berg *et al.*, 2009). Ce qui laisse présager la découverte de très nombreux mécanismes régissant ces interactions.

3.3.2. Interactions avec les haptophytes

Peu d'études traitent des interactions entre bactéries et microalgues appartenant aux haptophytes. Cependant, une étude récente a montré l'action algicide d'un composé produit par la bactérie *Streptomyces alboflavus* RPS (*Actinobacteria*) contre la microalgue toxique *Phaeocystis globosa* mais aussi contre d'autres groupes de microalgues (Zhang *et al.*, 2014). Pour aller plus loin, Cai *et al.*, (2016) ont réalisé des expériences en microcosmes simulant le déclin d'efflorescences de *P. globosa*, qui ont permis de proposer un mécanisme d'action potentiel du composé algicide induisant la lyse de la microalgue qui est synthétisé dans la Figure 25. Le composé algicide pourrait d'abord influencer l'échange de matière au niveau de la membrane plasmique en jouant sur sa perméabilité (a). Cet effet peut se propager rapidement aux autres organites, tels que les chloroplastes qui sont le siège de la machinerie photosynthétique et dont le fonctionnement dépend fortement de l'intégrité membranaire de la cellule (b). Une forte concentration en composé algicide et/ou une forte sensibilité de la microalgue peut entraîner la mort par lyse cellulaire (c). Si les cellules algales survivent aux étapes précédentes, elles peuvent aussi subir de forts stress oxydatifs provenant d'une activité anormale de l'appareil photosynthétique (d). Les glutathions réduits (GSH) sont consommés en permanence pour éliminer les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)(e). Ceci génère des vacuolisations, endommage les organites, conduisant à la mort cellulaire (f), malgré une action des enzymes antioxydantes, tels que la superoxyde dismutase (SOD) ou la

catalase (CAT)(g). Ce scénario hypothétique pourrait également expliquer la diminution de la toxicité de la culture algale après la lyse cellulaire par le composé algicide. En effet, les antioxydants (SOD et CAT dans cette étude) sont fortement exprimés en toute fin du processus de mort cellulaire. Cependant, la mort cellulaire n'est plus réversible à ce stade, car la membrane plasmique est devenue de plus en plus perméable, entraînant une rupture rapide des cellules et libérant ces antioxydants dans l'environnement (étape h de la Figure 25). Une fois ces antioxydants dans le milieu extracellulaire, la CAT pourrait agir comme « antidote » en piégeant les radicaux libres ou en aidant les autres organismes à résister au stress oxydatif provoqué par diverses toxines extracellulaires (étape i), expliquant la diminution de la toxicité des cultures de microalgues traitées par la composé algicide (toxicité évaluée ici en analysant l'activité bactéricide de la microalgue contre une *Gammaproteobacteria* du genre *Photobacterium*). Des études complémentaires sont en cours pour mieux comprendre les mécanismes en jeu (analyse d'un spectre plus large d'organismes pour tester la spécificité du composé algicide, combinaison d'analyses transcriptomiques/protéomiques/métabolomiques pour déterminer précisément les changements dans les voies métaboliques chez les cellules algales, etc.).

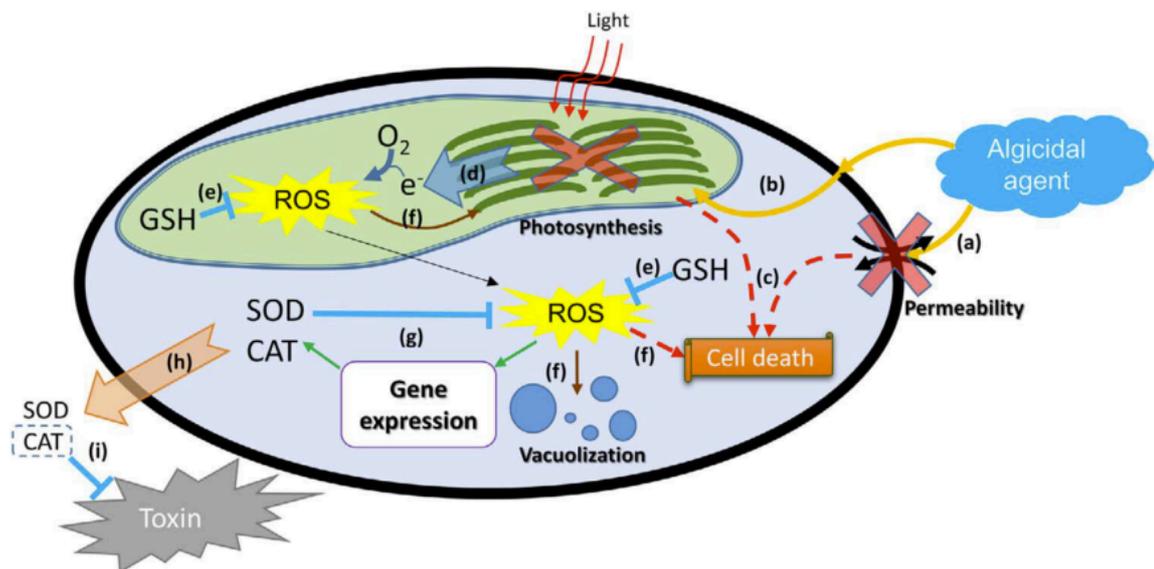


Figure 25 : Un possible mécanisme expliquant la lyse de *P. globosa* par le composé algicide produit par l'actinobactérie *S. alboflavus* RPS. Les étapes (a) à (i) correspondent aux différents stades du processus de lyse décrits dans ce paragraphe. Figure originale de Cai *et al.*, (2016).

Une autre étude a mis en évidence l'importance de la communication chimique dans les interactions entre le coccolithophore *Emiliania huxleyi* et la bactérie *Phaeobacter*

gallaecienis. Cette bactérie peut avoir un rôle promoteur (sécrétion d'antibiotiques, d'auxines), mais lorsque *E. huxleyi* émet des composés caractéristiques de microalgues senescentes (l'acide p-coumarique), la bactérie module son métabolisme en produisant des composés algicides appelés roseobacticides et devient un pathogène opportuniste (Seyedsayamdost *et al.*, 2011a). Ce style de vie, façon « Jekyll and Hyde », comme le suggère cette étude a été également rencontré chez d'autres bactéries du groupe des *Roseobacter* (Wang *et al.*, 2014).

3.3.3. Interactions avec les dinoflagellés

Parmi l'ensemble des microalgues eucaryotes, ce sont les dinoflagellés qui sont les plus connus pour leur capacité à produire des phycotoxines, qui peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et éventuellement causer des empoisonnements chez l'Homme. Dans ce contexte, les dinoflagellés sont particulièrement étudiés dans le but de comprendre et contrôler la prolifération des espèces potentiellement nocives. Le rôle que peuvent avoir les bactéries dans la prolifération, la toxicité et le contrôle des efflorescences algales toxiques a fait l'objet de très nombreuses études (Cho, 2012; Hold *et al.*, 2001a, b; Kim *et al.*, 2009; Lee & Park, 1998; Lovejoy *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2016; Nagasaki *et al.*, 2000; Park *et al.*, 1999, 1998; Skerratt *et al.*, 2002). La production de toxines par certains dinoflagellés a, d'ailleurs, été remise en question puisque la production autonome de certaines toxines a été détectée chez des bactéries (*Pseudomonas stutzeri* et *P. diminuta*) isolées de dinoflagellés (Martins *et al.*, 2003). Les dinoflagellés sont des microalgues qui peuvent, selon les espèces et le stade de vie, être dotées d'une thèque, comme indiqué dans le Tableau 2. La présence ou absence de thèque semble jouer un rôle primordial dans leurs interactions avec les bactéries. Les dinoflagellés avec une thèque semblent plus résistants à l'action algicide des bactéries que les dinoflagellés sans thèque (Lovejoy *et al.*, 1998). Il a été cependant montré récemment qu'un composé produit par l'actinobactérie *Brachybacterium* sp. YS-3 exerçait une action létale contre *Alexandrium catenella*, outrepassant l'effet protecteur de sa thèque (Kim *et al.*, 2015b).

Tableau 2 : Quelques dinoflagellés impliqués dans des efflorescences algales qui ont été étudiés dans le cadre d'interactions avec des bactéries

Dinoflagellé		Toxicité ¹	Référence
Avec thèque ?	Espèce		
Non	<i>Gymnodinium catenatum</i>	PSP	(Lovejoy <i>et al.</i> , 1998; Skerratt <i>et al.</i> , 2002)
Non	<i>Gymnodinium nagasakiense</i>	PSP	(Imai <i>et al.</i> , 1993)
Non	<i>Gymnodinium sanguineum</i>	PSP	(Lovejoy <i>et al.</i> , 1998)
Non	<i>Gyrodinium sp.</i>	NSP	(Lovejoy <i>et al.</i> , 1998)
Non	<i>Gyrodinium cf. uncatenum</i>	NSP	(Lovejoy <i>et al.</i> , 1998)
Non	<i>Karenia mikimotoi</i>	Gymnocyn, NSP, AZP	(Lu <i>et al.</i> , 2016)
Oui	<i>Alexandrium minutum</i>	Saxitoxines (PSP)	(Lovejoy <i>et al.</i> , 1998)
Oui	<i>Alexandrium catenella</i>	Saxitoxines (PSP)	(Kim <i>et al.</i> , 2015b; Lovejoy <i>et al.</i> , 1998)
Oui	<i>Alexandrium tamarense</i>	Saxitoxines (PSP)	(Cho, 2012; Hold <i>et al.</i> , 2001a, b)
Oui	<i>Alexandrium affine</i>	Saxitoxines (PSP) mais faible toxicité	(Hold <i>et al.</i> , 2001a)
Oui	<i>Alexandrium lusitanicum</i>	Saxitoxines (PSP)	(Hold <i>et al.</i> , 2001a, b)
Oui	<i>Heterocapsa circularisquama</i>	Toxine hémolytique photosensible	(Nagasaki <i>et al.</i> , 2000)
Oui et Non (dépend du stade de vie)	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	Toxine non déterminée, notamment létale pour les poissons	(Cho, 2012; Kim <i>et al.</i> , 2009; Lee & Park, 1998; Park <i>et al.</i> , 1999, 1998)
Oui	<i>Prorocentrum lima</i>	DSP et autres toxines	(Wagner-Döbler <i>et al.</i> , 2010)

¹: PSP = Paralytic Shellfish Poisoning (Intoxication par phycotoxine paralysante), NSP = Neurotoxic Shellfish Poisoning (Intoxication par phycotoxine neurotoxique), AZP = AZspiracid shellfish Poisoning (Intoxication par phycotoxine azaspiracide, qui a des effets diarrhéiques)

Des bactéries appartenant aux genres *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Antarctobacter*, *Roseovarius* ou encore *Sulfitobacter* ont montré un caractère assez généraliste puisqu'elles ont été retrouvées dans différentes cultures de dinoflagellés Hold, Smith, Rappé, *et al.*, (2001). Cependant, la majorité des isolats bactériens n'a été détecté que chez une des sept cultures algales testées. Par exemple des souches représentant le genre *Sulfitobacter* ont été dans les cultures d'*A. tamarense* PCC173a et *Scrippsiella trochoidea* NEPCC15, alors que les *Alphaproteobacteria* des genres *Kordia sp.*, *Ahrensia sp.* et *Stappia sp.* ont été retrouvées uniquement chez *A. lusitanicum* NEPCC253. Par ailleurs, cette étude a montré que la majorité des bactéries décrites étaient détectées à la fois en début et en fin de phase logarithmique, mais aussi pendant la phase stationnaire de croissance de l'algue (i.e. pas de variation chez *A. lusitanicum* NEPCC253). Ceci pourrait indiquer que la composition de la communauté bactérienne d'une culture algale serait assez stable durant la croissance algale. Une étude complémentaire sur les dinoflagellés *A. lusitanicum* NEPCC253 et *A. tamarense* NEPCC407, produisant des toxines paralysantes, a mis en évidence que les bactéries présentes pouvaient influencer la production de toxines (Hold *et al.*, 2001b). Les mécanismes impliqués ne sont pas

clairement établis, mais il a été cependant prouvé que certaines bactéries proches des genres *Stappia* (Kopp *et al.*, 1997) ou encore *Alteromonas/Pseudomonas* (genres détectés chez *A. lusitanicum* NEPCC253 et *A. tamarense* NEPCC407) pouvaient produire ces toxines de façon autonome (Kodama, 2010; Kopp *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 2003).

De plus en plus d'études visent à comprendre les mécanismes impliqués dans les interactions entre bactéries et microalgues. Cela passe bien souvent par la description des molécules actives intervenant dans ces interactions. C'est le cas par exemple dans l'interaction entre la bactérie algicide *Thalassospira* sp. ZR-2 et le dinoflagellé *Karenia mikimotoi*, où la molécule algicide a été décrite comme correspondant à un acide benzoïque thermostable (Lu *et al.*, 2016). Alors que l'activité de la bactérie algicide *Chitinimonas prasina* LY03 sur *S. trochoidea* et *A. tamarense* est due à une chitinase (Li *et al.*, 2016b). La bactérie *Deinococcus xiangnanensis* Y35 a montré une forte activité algicide contre *A. tamarense* par l'intermédiaire de la deinoxanthine, un pigment rouge générant une surproduction de ROS qui endommage la structure des chloroplastes et mitochondries du dinoflagellé (Li *et al.*, 2015). Une étude s'intéressant à l'action mutualiste des bactéries sur le dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum* a montré que la croissance de cette microalgue dépendait obligatoirement d'une source exogène de vitamines B₁ et B₁₂, qui pouvait être apportée par des bactéries associées à l'algue (Cruz-López & Maske, 2016). Parmi les bactéries majoritairement présentes dans la culture non supplémentée en vitamines et qui seraient donc de potentielles bactéries mutualistes apportant les vitamines à la microalgue, on retrouve les genres *Marivita* (74,9%), *Pelagibaca* (9,1%) et *Maricaulis* (7,1%).

Le séquençage des génomes de quatre bactéries associées à des dinoflagellés ont été récemment séquencés et a permis de mieux comprendre les interactions existant entre ces organismes (Jeong *et al.*, 2005; Wagner-Döbler *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016). Celle dont le génome a été séquencé en premier est *Hahella chejuensis* (*Gammaproteobacteria*), isolée du sédiment marin et capable de tuer le dinoflagellé *Cochlodinium polykrikoides*, par l'intermédiaire d'un pigment lytique, la prodigiosine (Jeong *et al.*, 2005). A l'inverse, l'analyse du génome d'une bactérie *Dinoroseobacter shibae* DFL12 (*Alphaproteobacteria*), isolée de *Prorocentrum lima* a permis notamment de décrire le

caractère mutualiste des relations entre ces organismes via la biosynthèse de vitamine B₁₂, essentielle à la croissance de l'hôte algal (Wagner-Döbler *et al.*, 2010).

Parmi les symbioses se produisant dans les océans, celles concernant les coraux et certains dinoflagellés appartenant au genre *Symbiodinium* font l'objet d'une attention particulière. Ces symbioses semblent relativement sensibles aux changements environnementaux et peuvent être très vulnérables face à des bactéries relatives au genre *Vibrio*. Lorsque les températures augmentent, ces bactéries peuvent générer une diminution de la chlorophylle et provoquer jusqu'à la lyse cellulaire chez *Symbiodinium* par action de protéases extracellulaires (Ben-haim *et al.*, 2003; Cervino *et al.*, 2004; Littman *et al.*, 2010). Plus récemment, une étude a mis en évidence l'action néfaste d'une zinc-métalloprotéase produite par *Vibrio*, capable d'inactiver le photosystème II et de créer des lésions dans les tissus des coraux (Sussman *et al.*, 2009). Par ailleurs, lorsque *Symbiodinium* vit à l'extérieur de son hôte, sous forme libre, il peut former des sphérulites d'aragonite, appelés symbiolites. C'est le produit d'un phénomène d'organominéralisation (Dupraz *et al.*, 2009) nécessitant la présence conjointe de *Symbiodinium* et de bactéries qui apportent des EPS (Frommlet *et al.*, 2015).

3.3.4. Interactions avec les raphidophytes

Certains membres des raphidophytes ont la capacité de produire des toxines et peuvent former des efflorescences algales nuisibles. Il s'agit principalement d'espèces algales appartenant aux genres *Chattonella*, *Heterosigma* et *Fibrocapsa*. Les interactions entre des bactéries hétérotrophes et des raphidophytes nocives ont fait l'objet de quelques études (Cho, 2012; Imai *et al.*, 1991, 1993; Inaba *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2009; Lovejoy *et al.*, 1998; Mayali & Azam, 2004; Yoshinaga *et al.*, 1998), principalement dans le but de trouver des moyens de contrôle de ces efflorescences. Une autre étude a montré l'effet promoteur d'une bactérie (*Bacillus* sp. BBB25) sur différents raphidophytes et autres membres du phytoplancton eucaryote qui pourrait jouer un rôle important dans la formation des efflorescences (Liu *et al.*, 2008). Il a également été montré que les raphidophytes tels que *Heterosigma* spp. et *Chattonella* spp. pouvaient se nourrir de bactéries hétérotrophes et de cyanobactéries (Jeong *et al.*, 2010; Nygaard & Tobiesen, 1993; Seong *et al.*, 2006)

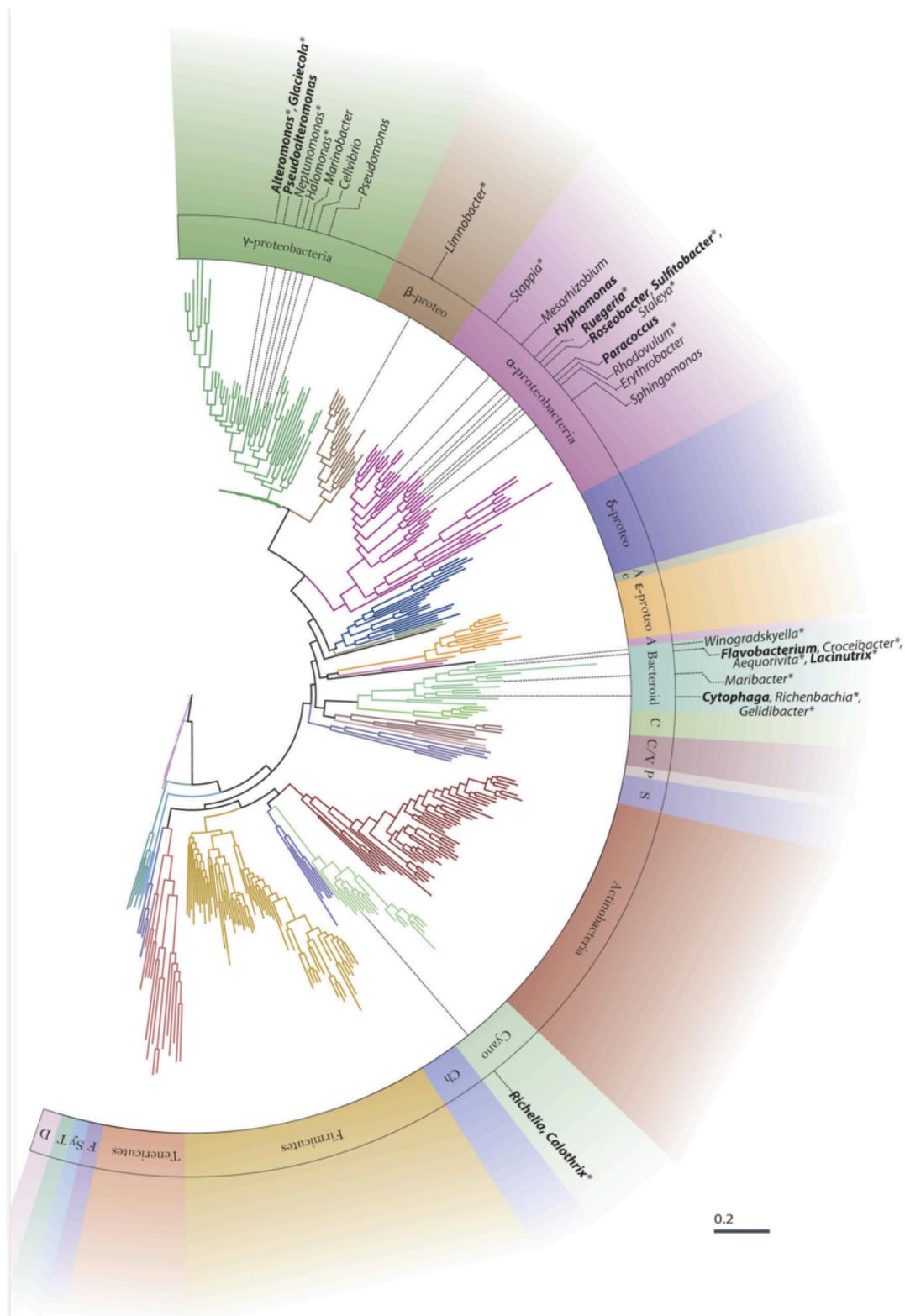


Figure 26 : Arbre phylogénétique représentant le domaine des bactéries et mettant en avant les taxons hétérotrophes les plus communément rencontrés dans les associations avec des diatomées (cercle extérieur). Des membres des bactéries autotrophes fixatrices d'azote (*Cyanobacteria*) sont également rencontrés dans les associations avec les bactéries. L'arbre a été construit avec la méthode du maximum de vraisemblance (maximum-likelihood) à partir d'un alignement de 31 protéines prédites conservées de 350 espèces bactériennes avec des séquences du génome entier (Wu *et al.*, 2009) Les genres indiqués en gras ont été retrouvés dans au moins deux études indépendantes.. Les astérisques indiquent les positions taxonomiques qui sont estimées à partir de la séquence de l'ARNr 16S du plus proche voisin, car ces taxons n'étaient pas inclus dans l'alignement d'origine. Se référer à S. A. Amin *et al.* (2012) pour l'identité des plus proches voisins. Abréviations: β-proteo, *Betaproteobacteria*; δ-proteo, *Deltaproteobacteria*; Ac, *Acidobacteria*; ε-proteo, *Epsilonproteobacteria*; A, *Aquificae*; Bacteroid, *Bacteroidetes*; C, *Chlorobi*; C/V, *Chlamydiae* and *Verrucomicrobia*; P, *Planctomycetes*; S, *Spirochaetes*; Cyano, *Cyanobacteria*; Ch, *Chloroflexi*; F, *Fusobacteria*; Sy, *Synergistetes*; T, *Thermotogae*; and D, *Deinococcus-Thermus*. Figure modifiée par S. A. Amin *et al.* (2012) d'après une représentation de Toft & Andersson (2010).

3.3.1. Interactions avec les diatomées

Tout comme chez les dinoflagellés et les raphidophytes, il est possible de rencontrer des diatomées responsables d'efflorescences algales nuisibles. Les espèces souvent mises en cause appartiennent au genre *Pseudo-Nitzschia*, qui comprend une douzaine d'espèces capables de produire de l'acide domoïque, une neurotoxine responsable d'empoisonnements amnésiques (Silver *et al.*, 2010). Les bactéries associées aux diatomées nuisibles ont donc fait l'objet de nombreuses études (Amin *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 1995, 2004; Kaczmarska *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2009; Lelong *et al.*, 2012; Sison-Mangus *et al.*, 2014; Stewart, 2008). A l'inverse, certaines diatomées ne sont pas nuisibles et sont même communément utilisées en aquaculture en tant qu'aliment pour les larves et juvéniles de différents poissons, mollusques et crustacés (Guedes & Malcata, 2012). Les interactions entre les bactéries et ces diatomées d'intérêt agronomique font également l'objet de plusieurs études (Baker & Herson, 1978; Naviner *et al.*, 1999; Prasetya *et al.*, 2015). Dans un contexte plus écologique, la réponse du bactérioplancton à certaines efflorescences environnementales de diatomées, qui ne présentent pas de nuisance particulière, a été analysée en détail par Teeling *et al.* (2012) et Sapp, Wichels, Wiltshire, *et al.*, (2007).

La description de différents exemples d'interactions entre des diatomées et leurs bactéries associées sont disponibles dans la revue récente d'Amin *et al.* (2012). Amin *et al.* (2012) rapportent que les bactéries associées aux diatomées semblent limitées à un petit nombre de genres représentés dans la Figure 26.

De nombreuses études s'intéressant aux communautés bactériennes présentes dans des cultures de diatomées ont démontré que les protéobactéries et les *Bacteroidetes* étaient les principaux groupes bactériens associées aux diatomées. Au sein de ces groupes, des genres spécifiques tels que *Sulfitobacter*, *Roseobacter*, *Alteromonas*, et *Flavobacterium* semblent être plus fortement associés aux diatomées, comme en témoigne les nombreuses études indépendantes qui les mentionnent (Grossart *et al.*, 2005; Hünken *et al.*, 2008; Kaczmarska *et al.*, 2005; Sapp *et al.*, 2007a, b, c). Une analyse moléculaire de la diversité bactérienne associée à six cultures de diatomées (*Ditylum*, *Thalassiosira*, *Asterionella*, *Chaetoceros*, *Leptocylindrus* et *Coscinodiscus*) révèle des phylotypes bactériens différents pour

chaque genre algal. Des *Alphaproteobacteria* (genre *Sulfitobacter*, *Roseobacter*, *Ruegeria*, and *Erythrobacter*), des *Bacteroidetes* et dans une moindre mesure des *Betaproteobacteria* faisaient partie des bactéries les plus dominantes parmi toutes les cultures (Schäfer *et al.*, 2002 et la Figure 26). Une autre étude a montré que deux espèces de *Pseudo-nitzschia* partageaient des bactéries appartenant aux mêmes grands groupes bactériens tels que les *Alphaproteobacteria* (genres *Roseobacter* et *Sulfitobacter*), *Gammaproteobacteria* (genres *Alteromonas* et *Neptunomonas*) et *Flavobacteriia* (genres proches de *Persicivirga* et *Winogradskyella*), mais que les genres bactériens semblaient spécifiques à chaque culture algale (Guannel *et al.*, 2011 et la Figure 26). Des associations cohérentes entre des isolats de *Pseudo-nitzschia multiseriis* de différents océans et des bactéries appartenant aux *Alphaproteobacteria* (*Sulfitobacter*), *Gammaproteobacteria* (*Marinobacter*), *Betaproteobacteria* (*Limnobacter*), et *Bacteroidetes* (*Croceibacter*) ont été observées (Amin *et al.*, 2012).

Dans l'environnement marin, la formation de biofilms sur différentes surfaces est très souvent due à des diatomées et bactéries. Ces biofilms ont été analysés afin de comprendre leur dynamique et leur composition, mais aussi pour expliquer les interactions entre les différents microorganismes qui s'y développent (Agogué *et al.*, 2014; Khandeparker *et al.*, 2014; Orvain *et al.*, 2003; Salta *et al.*, 2013). Les bactéries sont souvent les premières colonisatrices des surfaces immergées vierges, puis les diatomées viennent coloniser à leur tour ces surfaces. Cette colonisation par des microorganismes est appelée « microfouling » et est habituellement associée à une forte augmentation de la biomasse du biofilm. Les interactions entre les diatomées et bactéries jouent un rôle important dans la progression du biofilm qui deviendra le point d'ancrage et de développement de divers bivalves, algues, etc. (Patil & Anil, 2005; Salta *et al.*, 2013).

En plus de décrire la diversité des interactions entre bactérie et diatomées, certaines études ont montré que ces interactions pouvaient avoir une influence sur l'abondance algale et ses performances (Mayali & Azam, 2004; Paul & Pohnert, 2011; Teeling *et al.*, 2012), allant parfois jusqu'à décrire les métabolismes impliqués dans ces interactions (Amin *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 1995; Durham *et al.*, 2015; Kobayashi *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2013). Par exemple, la production de certaines toxines comme l'acide domoïque chez *Pseudo-*

nitzschia multiseriis peut être stimulée par l'ajout de bactéries (Bates *et al.*, 1995). Une expérience de co-culture a révélé qu'un contact cellulaire était nécessaire entre microalgues et bactérie pour que la stimulation de production d'acide domoïque ait lieu (Kobayashi *et al.*, 2009). Une autre étude sur *P. multiseriis* a révélé qu'une souche bactérienne appartenant au genre *Sulfitobacter* améliorait la division cellulaire de l'algue par sécrétion d'AIA, qui est produite à la fois avec du tryptophane sécrété par l'algue et du tryptophane endogène. Le tryptophane et l'AIA servent de molécules de signal dans un échange complexe de nutriments, incluant les composés organosulfurés émis par la diatomée et l'ammonium (NH₄) produit par la bactérie (Amin *et al.*, 2015). Des expériences avec la diatomée *Thalassiosira pseudonana* ont montré une augmentation de sa production d'acides aminés intra-cellulaire en réponse à une co-culture sans contact avec la bactérie *D. shibae*, ainsi qu'une amélioration d'environ 30% de la densité cellulaire algale à partir du 4^{ème} et 5^{ème} jour de co-culture (Paul *et al.*, 2013). Des interactions négatives ont été rapportées entre bactéries et diatomées, avec l'activité algicide de *Pseudoalteromonas* sp. strain A28 sur *Skeletonema costatum*, qui serait due à une protéase sérine extracellulaire sécrétée par la bactérie (Lee *et al.*, 2000) ou encore celle de *Kordia algicida* qui agirait également par l'intermédiaire d'une protéase sur *S. costatum*, *Thalassiosira weissflogii*, *Phaeodactylum tricornutum*, mais n'aurait pas d'effet sur *Chaetoceros didymus* (Paul & Pohnert, 2011, 2013). Enfin, plus récemment, une activité algicide de la bactérie *Chitinimonas prasina* LY03 (*Betaproteobacteria*) sur *T. pseudonana* a été décrite comme étant liée à l'action d'une chitinase bactérienne (Li *et al.*, 2016b). Cette enzyme dégrade la chitine dont est composée la paroi cellulaire de nombreuses diatomées (Durkin *et al.*, 2009; Hernández-Becerril *et al.*, 2009). La bactérie algicide a un mode d'action direct, avec une attraction de la bactérie vers l'algue par chimiotactisme, puis la bactérie se fixe sur la cellule algale grâce à ses flagelles, et enfin produit la chitinase pour dégrader la paroi cellulaire algale entraînant la lyse et la mort de la diatomée (Li *et al.*, 2016b). Cette capacité à dégrader la chitine a été détectée chez différents autres groupes bactériens marins qui seraient donc de potentiels bactéries algicides de diatomées comme notamment les *Acidobacteria*, les *Actinobacteria*, les *Gammaproteobacteria* appartenant à l'ordre des *Alteromonadales*, les *Deltaproteobacteria* appartenant à l'ordre des *Myxococcales* ou encore certaines *Bacteroidetes* de la classe des *Cytophagia* et *Sphingobacteriia* (Yilmaz *et al.*, 2016).

Certains composés produits et sécrétés par les diatomées auraient une activité bactéricide, ce qui leur permet de se protéger contre des bactéries indésirées et/ou algicides, influençant la structure de la communauté bactérienne à sa surface et dans un environnement proche (Lebeau & Robert, 2003). Les composés antibactériens décrits correspondent à substances lipophiles (Cooper *et al.*, 1983; Gauthier *et al.*, 1978), et plus précisément des acides gras et des esters (Desbois *et al.*, 2008, 2009; Findlay & Patil, 1984), qui sont hydrophobes et donc faiblement solubles, leur permettant ainsi de traverser passivement les membranes des bactéries à proximité. Ces antibactériens, produits principalement durant la phase stationnaire de croissance algale, exercent des actions contre différentes bactéries marines. L'acide eicosapentaénoïque (EPA) a, par exemple, montré une inhibition de la croissance de quelques bactéries marines (Desbois *et al.*, 2009), comme illustré dans la Figure 21. En raison des enjeux sociétaux, ils sont souvent testés sur des souches pathogènes de l'homme ou affectant l'aquaculture.

3.4. Exemples d'applications biotechnologiques inspirées des interactions entre bactéries et microalgues

Les études sur les interactions entre bactéries et microalgues inspirent également des applications, qui peuvent avoir un intérêt économique et écologique. C'est notamment le cas du traitement des efflorescences algales nocives (production de toxines, appauvrissement de l'eau en oxygène, etc.) par l'intermédiaire de bactéries algicides directement ou d'un extrait bactérien algicide. Par exemple, une étude a démontré que la bactérie *Streptomyces alboflavus* RPS (*Actinobacteria*) produisait un composé algicide capable de lyser la microalgue toxique *P.globosa* (Shen *et al.*, 2004). Une étude en microcosme a montré que la concentration à laquelle le composé algicide lysait *P. globosa* n'était pas toxique pour les autres organismes aquatiques et que la toxicité des exsudats de *P. globosa* était également très faible après ce traitement, laissant envisager une utilisation de ce composé algicide dans le contrôle des efflorescences environnementales de *P. globosa* (Cai *et al.*, 2016).

Un autre exemple d'application concerne la mono-culture de microalgues en systèmes ouverts qui peut se révéler très instable en raison du fort risque de contamination par des espèces plus compétitives que la microalgue, mais aussi par le risque de prédation, ou encore la forte sensibilité de certaines microalgues aux perturbations environnementales abiotiques

(lumière, température, disponibilité en nutriments). Pour pallier à ces problèmes, des solutions inspirées des observations écologiques faites dans les écosystèmes naturels pourraient permettre de produire de façon pérenne des microalgues dans des structures intensives et à grande échelle (Fouilland, 2012). Ainsi, il est notamment possible de coupler la culture de microalgues à celle de bactéries hétérotrophes, qui permet par exemple de traiter plus efficacement les eaux usées ou d'éliminer les polluants organiques et inorganiques présents dans les eaux, comme en témoignent les exemples fournis dans la revue de Subashchandrabose *et al.*, (2011).

D'autres applications sont également à l'étude comme la capture des déversements pétroliers par formation de neige marine par les microalgues et bactéries (van Eenennaam *et al.*, 2016), mais aussi le contrôle de la formation de biofilms de diatomées avec l'utilisation d'inhibiteurs du QS (Yang *et al.*, 2016), le traitement des eaux usées et coproduits industriels (Xia & Murphy, 2016; Zhu *et al.*, 2016), l'utilisation de microalgue phagotrophe (ochrophyte) avec des boues activées pour un recyclage rapide de la matière organique (Li *et al.*, 2016a), la bioremédiation de polluants par des biofilms (Mitra & Mukhopadhyay, 2016), le développement d'outils induisant la lyse cellulaire de microalgues (Demuez *et al.*, 2015) ou encore la production de biocarburants (Canter *et al.*, 2015; Milano *et al.*, 2016).

Les microalgues sont très couramment utilisées en aquaculture pour nourrir les juvéniles de poissons, de mollusques ou crustacés (partie 2.2.4). Pour garantir la qualité microbiologiques des organismes produits, il est essentiel de s'assurer que les microalgues n'apportent pas de bactéries pathogènes (telles que *Vibrio*) qui pourraient soit causer des pertes dans la ferme aquacole, soit rendre les produits impropres à la consommation, car nocifs pour l'homme (Dubert *et al.*, 2015). Pour prévenir l'apparition de bactéries pathogènes, l'utilisation de microalgues exerçant une activité antibactérienne spécifique peut également être envisagée. C'est le cas notamment de microalgues telles que *Chlorella* sp. *Isochrysis* sp., *T. suecica*, *Nannochloropsis* sp. *P. tricornutum* ou *S. costatum*, qui peuvent inhiber certaines espèces pathogènes comme *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* et *V. splendidus* (Austin *et al.*, 1992; Desbois *et al.*, 2009; Kokou *et al.*, 2012; Naviner *et al.*, 1999; Tendencia & Dela Peña, 2003). L'hypothèse de stratégies coopératives entre bactéries et microalgues a également été avancée pour justifier l'amplification de l'effet antibactérien

de l'algue *Nannochloropsis oculata* et de bactéries du clade des *Roseobacter* contre le pathogène *V. anguillarum* (Sharifah & Eguchi, 2011). Une autre solution pour prévenir l'apport de bactéries pathogènes par les microalgues est d'utiliser des microalgues d'eau douce pour alimenter les aquacultures marines, car la pression osmotique exercée par l'eau douce réduit fortement le risque de développement de bactéries pathogènes marines (Freire *et al.*, 2016).

La protection de certaines techniques de cultures employant microalgues et bactéries est devenue aujourd'hui un enjeu important pour les entreprises, qui déposent des brevets dans une souci de conservation de leur savoir-faire acquis après de longs efforts de recherche et développement. Par exemple, un brevet concerne l'amélioration de la croissance (+30% de la concentration en chlorophylle) de la microalgue *Botryococcus braunii* (*Chlorophyta*) par l'alphaproteobactérie *Rhizobium* sp. KB10, et surtout l'augmentation du contenu cellulaire algal en différents acides gras et particulièrement en oléate (+900%), qui permettrait de produire des biocarburants de haute qualité (Oh *et al.*, 2015).

4. Objectifs de la thèse

L'importante contribution des bactéries et microalgues marines dans les cycles biogéochimiques mondiaux est largement reconnue et permet de dire qu'ils constituent des acteurs clés du fonctionnement des écosystèmes océaniques avec aussi un fort impact sur l'environnement terrestre. Pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes, il est indispensable de considérer les différents organismes qui y vivent, mais aussi de comprendre les interactions qui existent entre les organismes. Etant donné leur importance écologique, de plus en plus d'études se consacrent aux interactions se produisant entre les bactéries et microalgues. Les interactions entre ces microorganismes se produisent généralement au sein de la phycosphère, et nécessitent donc une forte proximité souvent rendue possible grâce à une certaine mobilité cellulaire combinée au chimiotactisme et à divers mécanismes d'attachement intercellulaire. Pour étudier ces interactions, il est courant d'analyser les bactéries associées aux microalgues en les séparant des bactéries libres par des méthodes de filtration. Or la filtration est une méthode qui ne permet pas de réaliser une séparation fine, puisque des bactéries libres peuvent se retrouver dans la fraction associée et inversement. Très peu d'études ont utilisés des méthodes plus fines permettant l'isolement exclusif des bactéries attachées. Ainsi, il existe peu d'informations concernant les interactions entre microalgues et leurs bactéries attachées.

Le but de cette thèse était de mieux comprendre les interactions entre différentes microalgues eucaryotes et leurs bactéries attachées afin de répondre aux questions suivantes :

- [1] Quelle est la diversité des bactéries attachées aux cellules de différentes microalgues? Existe-il une spécificité de la diversité des bactéries épibiontes vis-à-vis de leur hôte algal ? Les bactéries issues des interactions à court terme (microalgues isolées directement d'échantillons environnementaux) sont elles différentes de celles issues des interactions à long terme (microalgues de cultures) ?
- [2] Les microalgues sont-elles la source de bactéries présentant une nouveauté taxonomique ?
- [3] Les microalgues testées peuvent-elles se développer sans leur microbiote ? Quel est l'impact des bactéries sur la croissance de leur hôte algal d'origine et sur un autre hôte

algal ? Quelles sont les bactéries présentant un impact fort (positif ou négatif) sur la croissance algale?

Pour répondre à ces questions, une stratégie alliant diverses approches culturelles et moléculaires a été développée et utilisée au cours de cette thèse. Cette thèse correspond à une thématique nouvelle dans l'équipe (pas de précédents travaux par l'équipe sur les interactions bactéries-microalgues) et a donc une vision très exploratoire.

Une étape préliminaire (**Chapitre 2**) a été effectuée afin de sélectionner les microalgues les plus appropriées au contexte de l'étude et aux objectifs visés (questions [1], [2] et [3]). Afin de décrire la diversité des bactéries épibiontes (**Chapitre 2**), le premier objectif de cette thèse a été de développer une stratégie d'isolement individuel des cellules de microalgues permettant à la fois leur visualisation (identification morphologique de la microalgue) et leur manipulation dans un environnement stérile. Cette stratégie devait nous permettre de mettre en culture (ou de faire une analyse moléculaire directe) chaque cellule de microalgue avec ses bactéries attachées, tout en éliminant les bactéries vivant sous forme libre et sans apporter de contaminant extérieur.

En microbiologie, il existe un constat historique, mais qui fait toujours office, et qui fait désormais l'unanimité. Il s'agit du manque cruel de représentants cultivés de la diversité microbienne réelle. Le second objectif de la thèse a donc été de déterminer l'intérêt taxonomique des bactéries épibiontes (**Chapitre 3**). Cette étude a été réalisée en comparant les souches isolées dans le cadre de l'étude de diversité (**Chapitre 2**) avec celles existant dans les bases de données publiques. L'analyse phylogénétique de certaines souches présentant un potentiel intérêt taxonomique a été réalisée afin de les classer. Parmi ces taxons, une souche correspondant à un nouveau genre a été complètement caractérisée, en collaboration avec la DSMZ.

Le troisième objectif de cette thèse a été de déterminer la nature des interactions entre les microalgues et leurs bactéries épibiontes (**Chapitre 4**). Pour parvenir à répondre aux questions posées, il a fallu dans un premier temps, axéniser les microalgues qui servaient de modèle à notre thèse. Pour y parvenir, j'ai suivi une formation spécifique à la collection de

culture d'Oban (CCAP). Les microalgues axénisées ont ensuite été confrontées aux différentes bactéries épibiontes isolées dans l'étude de la diversité (**Chapitre 2**) en réalisant des co-cultures, afin de déterminer l'impact des bactéries épibiontes sur la croissance des microalgues. La finalité de ces tests de co-culture étant d'identifier une ou des bactérie(s) candidate(s) pour réaliser une analyse transcriptomique permettant de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans ces interactions.

Les résultats issus des différentes analyses ont été discutés dans le **chapitre 5**, ouvrant la voie à diverses perspectives.

CHAPITRE 2

Diversité des bactéries épibiontes isolées de deux genres de diatomées : *Chaetoceros* et *Thalassiosira*

1. Contexte de l'étude

Diverses études sur les interactions entre bactéries et microalgues ont montré qu'il existait une forte spécificité des bactéries associées aux microalgues (Jasti *et al.*, 2005; Sison-Mangus *et al.*, 2014). D'ailleurs, dans l'environnement naturel, il a été démontré que les efflorescences phytoplanctoniques induisent une modification de la diversité bactérienne environnante (Bunse *et al.*, 2016; Zubkov *et al.*, 2001). La première étape de cette thèse a consisté à décrire la diversité des bactéries associées à différentes microalgues en s'intéressant tout particulièrement aux bactéries physiquement attachées (épibiontes) aux microalgues. La particularité de ce travail a consisté à sélectionner les bactéries physiquement attachées aux cellules algales, par isolement individuel de cellules algales. Nous avons choisi de comparer les communautés bactériennes issues d'associations à long terme avec celles issues d'associations à court terme. Pour cela, nous avons d'une part identifié les bactéries issues des cultures algales et d'autre part les bactéries issues de microalgues de l'environnement. Les ambitions de ce travail étaient de répondre à plusieurs questions à savoir : quelle est la diversité des bactéries attachées à différentes cellules de microalgues? Existe-t-il une spécificité des bactéries épibiontes vis-à-vis de leur hôte algal ? Les bactéries issues des interactions à court terme (microalgues environnementales) sont-elles différentes de celles issues des interactions à long terme (microalgues de cultures) ?

1.1. Pourquoi s'intéresser aux bactéries physiquement attachées aux cellules algales ?

Lorsque l'on s'intéresse aux interactions entre bactéries et microalgues, une forte spécificité de la communauté bactérienne associée à une microalgue donnée est souvent observée. De plus, il a été démontré que la phycosphère était un environnement distinct de l'eau de mer, pouvant être considéré comme une niche écologique et dans laquelle diverses interactions pouvaient se produire (Bell & Mitchell, 1972; Ramanan *et al.*, 2015; Sapp *et al.*, 2007b). Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc émis l'hypothèse que les bactéries susceptibles d'être attachées à la microalgue étaient celles qui devraient avoir la plus forte spécificité avec ces dernières et qui pouvaient présenter des interactions fortes. Parmi les études s'intéressant aux interactions entre bactéries et microalgues, certaines ont analysé

l'ensemble des bactéries présentes dans l'environnement dans lequel se trouvaient les microalgues (Abby *et al.*, 2014; Berg *et al.*, 2009; Hünken *et al.*, 2008; Schäfer *et al.*, 2002), ou ont séparé les bactéries libres des bactéries attachées aux microalgues principalement par des méthodes de filtration (Baker & Kemp, 2014; Grossart *et al.*, 2005; Guannel *et al.*, 2011; Kaczmarska *et al.*, 2005; Sapp *et al.*, 2007a, c) ou plus rarement par centrifugation (Green *et al.*, 2004). Les méthodes de filtration ou de centrifugation présentent cependant des limites car la séparation des communautés est partielle. En effet, pour la filtration par exemple, la fraction contenant les bactéries associées peut également contenir des bactéries libres restées fixées au filtre. En revanche, il existe très peu d'études qui se sont intéressées aux bactéries physiquement attachées aux cellules algales par une méthode plus rigoureuse comme des isollements de cellules algales en *single-cell*. Une étude a cependant travaillé à partir de cultures de microalgues issues d'un isolement par micropipetages successifs, afin de limiter l'apport de bactéries libres (Sapp *et al.*, 2007b).

Par ailleurs, de nombreuses études ont remarqué que les bactéries capables de s'attacher à des surfaces (qu'elles soient biotiques ou abiotiques) étaient celles qui présentaient la plus forte activité métabolique (Crump *et al.*, 1998; Grossart, 2010; Riemann *et al.*, 2000), comme par exemple une plus forte production de composés antagonistes (Long & Azam, 2001). D'ailleurs, les agrégats, quels qu'ils soient, sont souvent considérés comme des « hot spot » d'activité microbienne (Simon *et al.*, 2002). Lorsque l'on considère les interactions entre bactéries et microalgues, de très nombreuses études ont mis en évidence qu'il existait une certaine spécificité des interactions entre bactéries et microalgues dans l'environnement (Bagatini *et al.*, 2014; Mitsutani *et al.*, 1992; Sison-Mangus *et al.*, 2014).

Dans le cadre notre étude, s'intéresser aux bactéries physiquement attachées aux cellules algales en isolant individuellement chaque cellule algale, c'est donc faire le choix d'analyser les bactéries qui possèdent une potentielle forte activité métabolique, mais aussi qui présentent des interactions fortes avec les microalgues.

1.2. Pourquoi comparer les communautés bactériennes épibiontes issues d'interactions à long terme avec celles issues d'interactions à court terme ?

Dans les cultures de microalgues, la croissance des communautés bactériennes dépend principalement de l'algue. En effet, pour qu'une cohabitation pérenne s'installe, il faut que ces microorganismes associés ne subissent pas d'action antagoniste de la part de l'algue et qu'ils soient capables de se développer à partir d'exsudats de la microalgue, qui sont les seuls apports de carbone dans le milieu. Il s'agit donc d'interactions à long terme. Dans l'environnement, d'autres paramètres biotiques et abiotiques peuvent moduler les associations, qui peuvent donc être plus transitoires. Il s'agit là d'interactions à court terme.

Pour une espèce algale donnée, il a été démontré que la communauté bactérienne qui y était associée pouvait être différente selon qu'il s'agisse d'une microalgue issue de cultures ou d'une microalgue provenant de l'environnement naturel (Garcés *et al.*, 2007). Cependant, dans cette étude, les environnements où étaient échantillonnés les microalgues étaient très divers (port, baie, plages semi-fermées) et éloignés géographiquement (littoral méditerranéen espagnol et italien), ce qui pourrait être un élément expliquant les différences rencontrées dans la composition des communautés bactériennes. Dans notre analyse, nous avons choisi d'étudier des microalgues issues de cultures et d'autres issues de l'environnement naturel en ne sélectionnant que des souches ayant la même origine géographique, à savoir les eaux côtières de Roscoff.

1.3. Différentes méthodes testées pour l'isolement des bactéries attachées aux microalgues

Différentes stratégies d'isolement ont été envisagées et testées pour permettre d'isoler les cellules microalgales afin d'identifier les bactéries qui y étaient attachées.

La première stratégie testée faisait appel à une technologie de pinces optiques en cours de développement à l'Université Heriot Watt (Edimbourg, Ecosse) qui est partenaire du projet européen MaCuMBA, dans lequel s'inscrit cette thèse. Cette technique devait nous permettre d'isoler rapidement des cellules tout en les visualisant et donc en les sélectionnant. En testant en conditions réelles cette technique sur des échantillons de microalgues (à partir de cultures de microalgues et d'eau de mer naturelle), nous nous sommes rendus compte de l'inadéquation entre l'outil, notre modèle d'étude et nos contraintes microbiologiques. En effet, le milieu dans lequel évoluent les microalgues (eau de mer ou milieu de culture) contient un certain nombre de particules et de polymères formant des maillages qui gêne la progression de la cellule algale lorsqu'elle est captée par la pince optique. Ce qui rend presque impossible le cheminement de la cellule vers le capillaire de verre dans lequel elle doit être isolée (Figure 27). Par ailleurs, le dispositif de pinces optiques développé par l'Université Heriot Watt est un système très volumineux fonctionnant de manière ouverte, et qui ne correspond pas aux règles de stérilité que nécessite notre projet (impossible à disposer dans une hotte à flux laminaire, impossible à stériliser). Nous avons donc écarté cette stratégie inappropriée à notre étude.

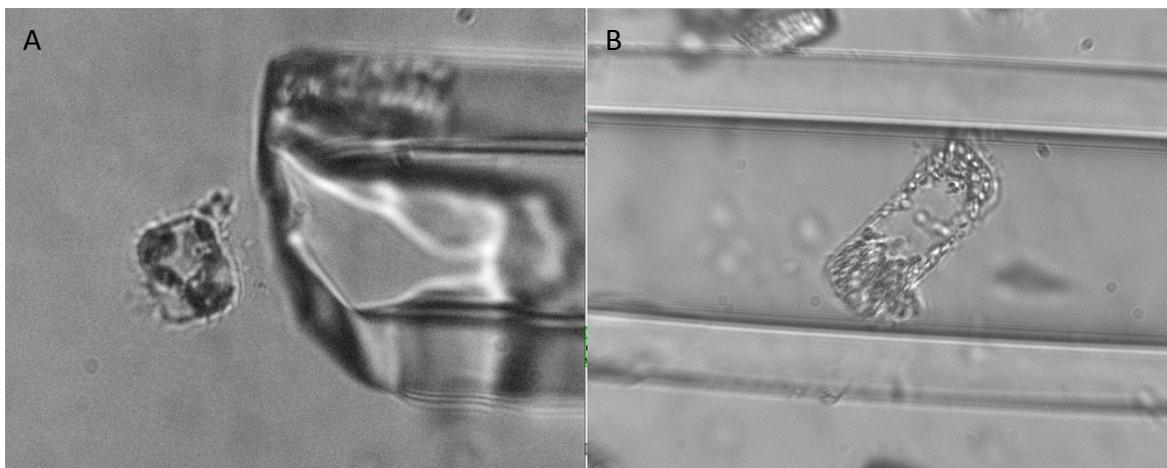


Figure 27 : Isolement de cellules de diatomées par pinces optiques. (A) Cellule à l'embouchure d'un capillaire en verre. (B) Cellule à l'intérieur du capillaire en verre.

La seconde stratégie mise en œuvre a consisté à faire du tri cellulaire à l'aide d'un cytomètre en flux (BD FACSria™) en s'appuyant sur l'autofluorescence naturelle de la chlorophylle contenue dans les cellules. Cet outil, très performant notamment en terme de débit, ne permettait cependant pas de visualiser les cellules algales isolées et donc rendait impossible la sélection des espèces ou genres algaux. De plus, la puissance du laser dirigé contre la cellule algale pouvait endommager les cellules bactériennes qui y seraient attachées et réduire la cultivabilité de ces microorganismes. Cet outil aurait été très intéressant à utiliser dans le cadre d'isolement de bactéries épibiontes provenant de microalgues capables de dominer très fortement des efflorescences naturelles (identité des cellules algales connues). Cet outil aurait également pu être utilisé si la stratégie d'isolement des bactéries épibiontes consistait à cultiver dans un premier temps les cellules algales, puis d'isoler les bactéries présentes dans la culture algale, auquel cas les microalgues isolées auraient été identifiées.

La troisième stratégie alors mise en œuvre s'est appuyée sur la méthode classique d'isolement à la micropipette de cellules phytoplanctoniques, que nous avons adaptée à nos contraintes microbiologiques en réalisant des micropipetages successifs et en prenant les précautions nécessaires pour travailler en conditions stériles. Cette stratégie est détaillée dans le paragraphe 2.

1.4. Approches utilisées pour identifier les bactéries épibiontes

Deux approches ont été employées afin d'identifier les bactéries épibiontes. Les cellules algales isolées par micropipetages successifs ont été soit analysées directement par biologie moléculaire (lyse cellulaire, amplification par WGA puis par PCR sur les gènes permettant l'identification des bactéries et des microalgues, et clonage-séquençage de ces gènes), soit mise en culture dans un milieu pour bactéries hétérotrophes marines, qui étaient ensuite purifiées, dé-répliquées et identifiées par analyse du gène codant l'ARNr 16S.

Les Figure 28 et Figure 29 schématisent et mettent en parallèle les stratégies adoptées pour étudier d'une part les bactéries épibiontes cultivables et d'autre part les bactéries épibiontes totales.

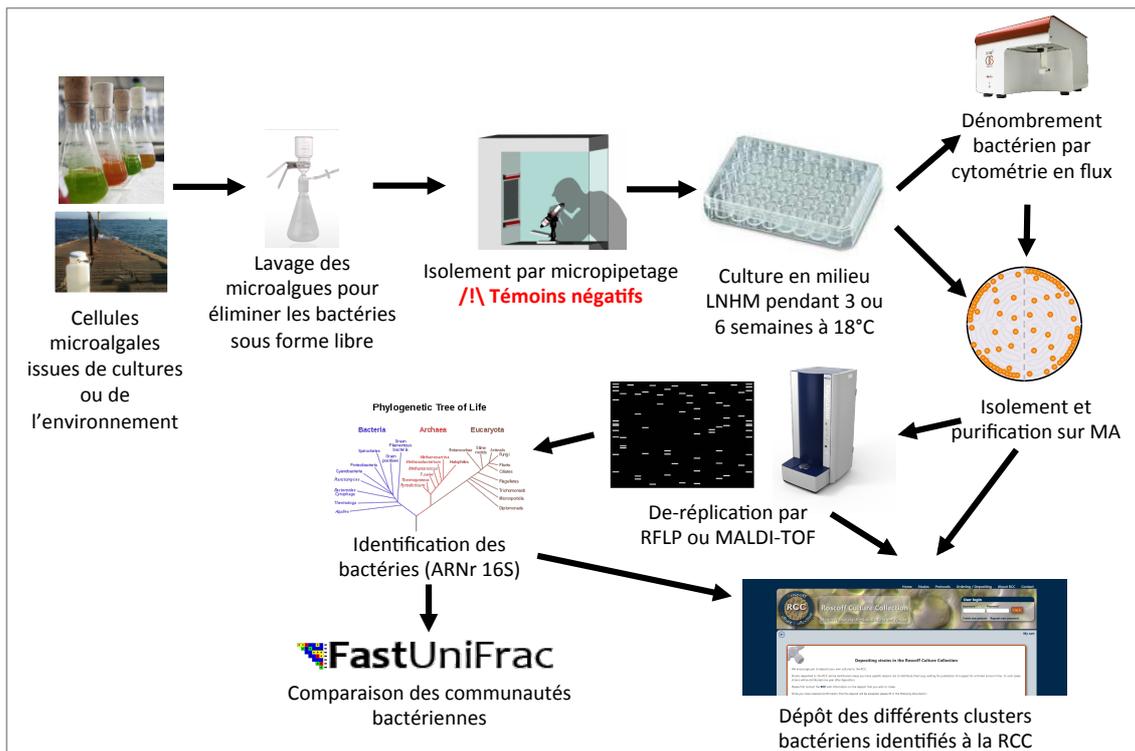


Figure 28 : Stratégie mise en place dans l'approche culturelle d'étude de la diversité des bactéries attachées à la surface des cellules algales.

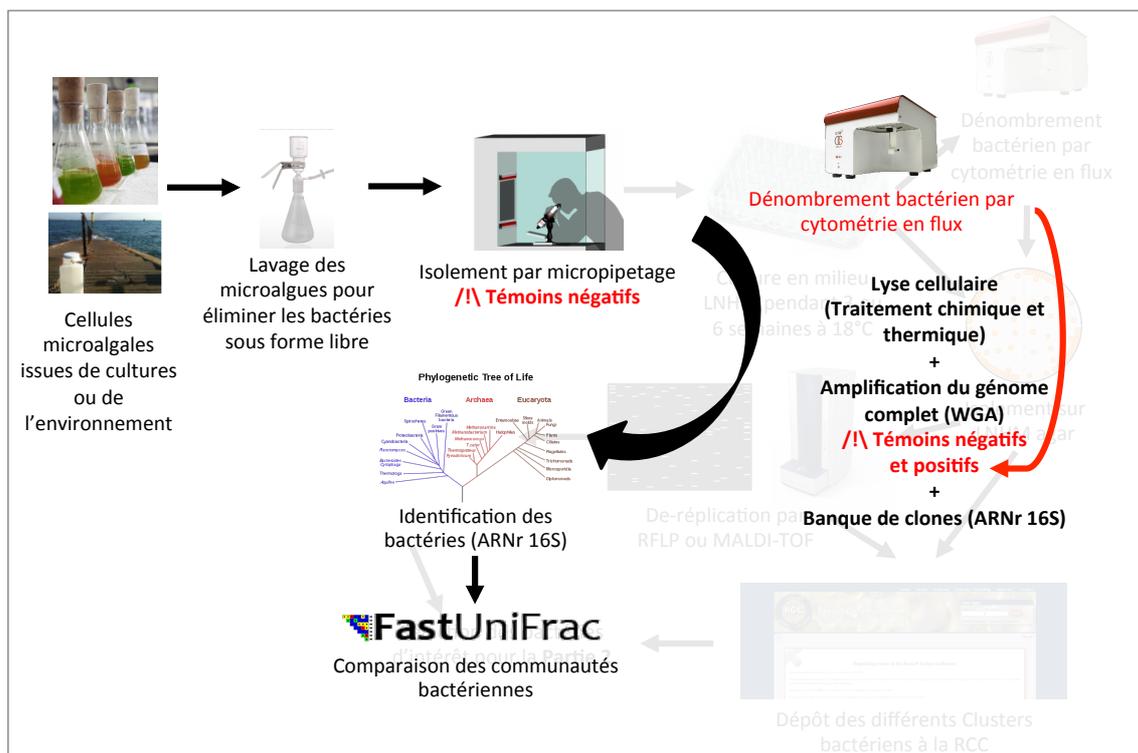


Figure 29 : Stratégie mise en place dans l'approche moléculaire d'étude de la diversité des bactéries attachées à la surface des cellules algales.

2. Points techniques

2.1. Isolement de bactéries épibiontes à partir de microalgues, par micropipetages successifs

Le but du protocole décrit ci-dessous est d'isoler les cellules de microalgues afin de cultiver les bactéries attachées à leur surface. Ce protocole a été conçu pour limiter le nombre de bactéries vivant sous forme libre à partir d'échantillons d'eau de mer naturelle ou de cultures d'algues.

2.1.1. Préparation de pipettes Pasteur effilées

Habituellement, l'isolement des cellules de microalgues est effectué en utilisant des pipettes Pasteur en verre. Cependant, l'extrémité effilée de ces pipettes sont trop grande (diamètre d'environ 1 mm) par rapport à la taille d'une seule cellule (généralement de 5 à 50 μm). Par conséquent, il est nécessaire d'effiler plus finement la pipette Pasteur en utilisant un bec Bunsen comme illustré sur la Figure 30. Ensuite, les pipettes Pasteur effilées sont placées verticalement dans une boîte pour la stérilisation.



Figure 30 : Préparation des pipettes pasteurs effilées. Une pipette Pasteur est brûlée sur son extrémité la plus fine jusqu'à ce que le verre se ramollisse, elle est ensuite mise en dehors de la flamme pour pouvoir être étirée à l'aide de la pince à dissection pour former un capillaire plus fin. Les pipettes Pasteur effilées sont ensuite placées dans une boîte afin d'être stérilisées.

2.1.2. Stérilisation du matériel

Tout le matériel utilisé pour les différentes étapes d'isolement a été stérilisé de la manière suivante. Avec des pinces à filtres, les filtres nylon (11 μm de porosité, 47mm de diamètre) ont été transférés dans une boîte de Petri et stérilisés pendant 90s par traitement UV dans un cross linker (BioRad GS Gene Linker UV Chamber Crosslinker). Les systèmes de filtration ont été décontaminés avec HCl 1% (v/v), rincés à l'eau distillée, puis autoclavés (20

min à 121°C). L'eau de mer a été autoclavée puis filtrée à 0,22µm. Les pipettes Pasteur effilées ont été autoclavées dans une boîte de stérilisation (ici, nous avons utilisé deux fonds de boîte de cône de 1mL, comme présenté sur la Figure 30). Le microscope inversé a été désinfecté à l'éthanol, avant être placé dans la hotte à flux laminaire. Enfin, les lames de microscope et les pinces à filtres ont été désinfectées à l'éthanol puis flambées, juste avant usage.

2.1.3. Préparation des milieux de culture

1) Milieu LNHM, modifié

Le milieu liquide oligotrophe pour hétérotrophe ou « Low Nutrient Heterotrophic Medium » (LNHM) a été préparé selon Cho & Giovannoni (2004), avec les modifications faites par Stingl *et al.* (2007) et Carini *et al.* (2013). Ici, l'eau de mer naturelle est remplacée par de l'eau de mer reconstituée composée d'eau distillée et de Red Sea Salts (Houston, Texas, USA) afin d'obtenir la salinité moyenne des eaux côtières de Roscoff et le pH du milieu est ajusté à 7. La composition du milieu est décrite dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Composition du milieu LNHM modifié. Signification des notes : ¹% (wt/vol), ²% (vol/vol)

Ingrédients	Concentration dans la solution stock initiale	Concentration dans la solution finale (milieu fini)	Volume de solution stock à ajouter au milieu	
Eau de mer reconstituée	35 ppt	35 ppt	1000 mL	
NH ₄ Cl	1 M	10 µM	10 µL	
KH ₂ PO ₄	100 mM	1 µM	10 µL	
Sources de carbone	D-glucose	1% ²	0.001% ¹	1 mL
	D-ribose	1% ¹	0.001% ¹	1 mL
	Méthylamine	1% ¹	0.001% ¹	1 mL
	Acide succinique	1% ¹	0.001% ¹	1 mL
	Acide pyruvique	1% ¹	0.001% ¹	1 mL
	Glycérol	1% ¹	0.001% ¹	1 mL
	N-acétyl D-glucosamine	1% ¹	0.001% ¹	1 mL
	éthanol	10% ²	0.002% ²	2 mL
Solution of 20 acides aminés		10 mM	1 µM	100 µL
Solution de vitamines (Tableau 4)			1 mL	
Solution d'oligo-éléments (Tableau 5)			1 mL	
DMSP		30 mM	100 nM	3.3 µL

Tableau 4 : Solution de vitamines

Ingrédients	Quantité
Eau distillée	1 L
Vitamine B1 (Thiamine : 6 mM)	2 g
Vitamine B3 (Nicotinamide : 0.8 mM)	0.1 g
Vitamine B 5 (Pantothénate de calcium : 0.425 mM)	0.1 g
Vitamine B6 (Pyridoxine : 0.5 mM)	0.000976 g
Vitamine B7 (Biotine : 4 µM)	0.001764 g
Vitamine B9 (Acide folique : 4 µM)	0.1 g
Vitamine B12 (Cobalamine : 0.7 µM)	0.00095 g
Myo-inositol (6 mM)	1.08 g
Acide 4 aminobenzoïque (60 µM)	0.00822 g
Vitamine B2 (Riboflavine)	0.005 g

Tableau 5 : Solution d'oligo-éléments

Ingrédients	Quantité
Eau distillée	1 L
FeCl ₃ .6H ₂ O (117 µM)	0.03 g
MnCl ₂ .4H ₂ O (9 µM)	0.0018 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O (0.8 µM)	0.00023 g
CoCl ₂ .6H ₂ O (0.5 µM)	0.00012 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (0.3 µM)	0.0000726 g
Na ₂ SeO ₃ (1 µM)	0.0001729 g
NiCl ₂ . 6H ₂ O (1 µM)	0.0002377 g

2) Milieu Marine Broth dilué au 1/5 (MB/5), modifié

Le milieu MB/5 a été réalisé à partir d'eau de mer reconstituée (comme pour le LNHM modifié) contenant 1g de peptone (BD Bacto™ Peptone) et 0,2 g d'extrait de levure (BD Yeast Extract) par litre. Des proportions d'acides aminés, d'oligo-éléments et de vitamines, identiques à celles du milieu LNHM y ont été ajoutées.

2.1.4. Isolement de cellules de microalgues (« single cell »)

Les bactéries sont généralement de 10 à 1000 fois plus abondantes que les microalgues dans le milieu naturel et dans les cultures. Il est donc impossible d'isoler individuellement des cellules de microalgues par dilution sériée sans isoler les bactéries sous

forme libre qui y sont associées. C'est pourquoi la méthode d'isolement par micropipetage est la plus couramment employée pour isoler le phytoplancton. Ici, nous souhaitons isoler les bactéries attachées aux microalgues sans isoler les bactéries vivant sous forme libre. Pour optimiser cet isolement, il a donc été nécessaire de rincer les cultures de microalgues pour limiter le nombre de bactéries libres avant l'isolement des algues par micropipetage. Les échantillons utilisés étaient des cultures de microalgues ou de l'eau de mer naturelle et la technique est adaptée aux cellules algales de plus de 15 μm . Les cellules de taille inférieure, comme *Skeletonema* sp. RCC 1866, qui mesure 5 μm , sont difficiles à distinguer des débris contenus dans l'échantillon, en particulier lorsqu'elles sont micropipetées de façons successives.

Le rinçage des cultures de microalgues est effectué dans la hotte à flux laminaire en filtrant 5mL de culture en début de phase stationnaire¹³ (filtre nylon 11 μm de porosité, 47 mm de diamètre) et en rinçant par 3 volumes de 50 mL d'eau de mer reconstituée stérile. Le filtre est ensuite déposé sur 1 mL d'eau de mer stérile pour obtenir une suspension dense de microalgues.

L'isolement des cellules de microalgues est réalisé au moyen d'un microscope inversé placé dans une hotte à flux laminaire (Figure 31). Une goutte de suspension de microalgues rincée est déposée sur une lame de microscope stérile déjà placée sur la platine du microscope. A l'aide d'une pipette Pasteur effilée stérile et remplie d'eau de mer stérile (ou de PBS 1 X pour l'isolement de cellules destinées à subir une analyse moléculaire directe), une cellule algale est aspirée. Le contenu de la pipette (2-3 μL) est déposé sur la même lame pour former une deuxième goutte. A l'aide d'une nouvelle pipette Pasteur effilée stérile et remplie d'eau de mer stérile (ou de PBS 1X), la même cellule algale est aspirée puis déposée sur la lame pour former une troisième goutte. Cette étape de lavage est répétée 3-4 fois pour éliminer les bactéries vivant sous forme libre.

¹³ Les cultures de microalgues présentent différentes phases, principalement la phase exponentielle de croissance, la phase stationnaire et la phase de déclin. Afin de travailler sur des cellules en bon état physiologique, il est important de sélectionner des cellules qui sont en phase exponentielle de croissance ou en début de phase stationnaire.

Selon la stratégie employée pour identifier les bactéries attachées, la cellule algale est traitée de 2 façons différentes :

- Identification directe par biologie moléculaire : Après le dernier lavage, la cellule algale est transférée dans un puits d'une barrette 8 puits sur glace. Pour chaque cellule algale isolée, la totalité du volume d'eau de mer de la dernière goutte de lavage est également transférée dans un puits de la barrette sur glace. Cette eau constituera le contrôle du lavage de la cellule algale. A l'issue de l'isolement, les échantillons sont immédiatement traités avec une extraction d'ADN puis une réaction de WGA et les produits de WGA sont soit stockés à -20°C, soit utilisés directement pour les étapes suivantes de PCR (Cf. méthode détaillée au paragraphe 2.4).

- Identification après culture : Après le dernier lavage, la cellule algale est transférée dans une microplaque 48 puits contenant 500 µl de milieu LNHM. Pour chaque cellule algale isolée, la totalité du volume d'eau de mer de la dernière goutte est également transférée dans 500 µl de milieu liquide LNHM pour servir de témoin de lavage. La microplaque 48 puits est fermée par un film adhésif et incubée à 19 ° C pendant au moins 6 semaines.



Figure 31 : Isolement de cellules microalgales au microscope inversé par micropipetage à l'aide d'une pipette Pasteur et dans un environnement stérile (hotte à flux laminaire, instruments stérilisés)

2.2. Analyse des cultures par cytométrie en flux et purification des bactéries épibiontes cultivées

Après incubation, les cultures positives sont criblées au format microplaque 96 puits par cytométrie en flux (BD Accuri™ C6). Les cellules sont fixées avec du glutaraldéhyde (0,25% ; Sigma-Aldrich® G5882), colorées avec du SYBR® Green (1X ; Invitrogen™ S7585) et traitées au Pluronic® (0,01% ; Sigma-Aldrich® P5556), un surfactant qui limite l'adhérence des cellules aux plastiques. Les comptages ont ensuite été effectués en débit lent (14 µL/min) sur une durée de 1 min. Il s'agit de la méthode utilisée pour tous les dénombrements de bactéries réalisés durant cette thèse.

Les cultures positives sont purifiées en striant une goutte (environ 10 µL) sur des boîtes contenant du milieu LNHM gélosé incubées à température ambiante, jusqu'à observation d'une croissance bactérienne (incubation jusqu'à 6 semaines). Les colonies sont observées avec un microscope binoculaire. Une ou plusieurs colonies (en fonction du nombre de phénotypes observés) sont sélectionnées et purifiées par stries sur milieu gélosé.

Les bactéries purifiées sont ensuite inoculées dans du milieu liquide MB/5 et incubées à température ambiante avant d'être congelées à -80°C dans du DMSO (7,5% ; Invitrogen™ S7585).

2.3. Déréplication des cultures de bactéries épibiontes par MALDI-TOF

La déréplication a consisté à éliminer les dupliquas de souches bactériennes en utilisant le système MALDI BioTyper™ (Bruker Daltonics), comme illustré dans la Figure 32. Il s'agit d'un système automatisé de spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI pour « Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation ») et d'un analyseur de temps de vol (TOF pour « time-of-flight mass spectrometry »). Il permet de mesurer l'empreinte moléculaire d'un organisme en se basant sur l'analyse des protéines de forte abondance, (incluant de nombreuses protéines ribosomiques) allant de 2 000 à 20 000 Daltons. Cet outil est couramment employé pour réaliser un diagnostic rapide des microorganismes provenant d'échantillons cliniques (identification jusqu'à l'espèce automatique par comparaison des empreintes moléculaires à une base de donnée ouverte couvrant la majorité des bactéries d'intérêt clinique). Nous avons utilisé l'appareil dont dispose le laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier Régionale et Universitaire de la Cavale Blanche à Brest (UBO-LUBEM).



Figure 32 : Maldi Biotyper™ utilisé pour établir une empreinte moléculaire des différentes bactéries cultivées isolées.

La base de données à laquelle sont comparés les profils protéiques obtenus contient très peu de bactéries isolées du milieu marin. C'est pourquoi nous n'avons pas utilisé cette technique pour obtenir des identifications mais pour comparer les profils de nos isolats entre eux. Les profils ont été comparés à l'aide du logiciel Bionumerics 7.0 (Applied Maths) permettant de regrouper les profils sous forme d'un dendrogramme.

2.4. Identification des bactéries

Les isolats (microalgues et bactéries attachées) directement traités par biologie moléculaire subissent une lyse cellulaire suivie d'une réaction d'amplification par WGA (amplification du génome complet ou « Whole Genome Amplification »). Les gènes permettant l'identification des bactéries et des microalgues ont ensuite été amplifiés par PCR. Les produits PCR eucaryotes ont été séquencés directement par la méthode de Sanger alors que les produits PCR bactériens ont été clonés avant de subir un séquençage par la même méthode.

Les bactéries cultivées ont été identifiées par lyse cellulaire d'une colonie bactérienne et amplification du gène codant l'ARNr 16S. Les produits PCR sont ensuite séquencés par méthode de Sanger. Les séquences nucléotidiques ainsi obtenues ont été analysées pour permettre l'identification des bactéries et des microalgues. Les détails des conditions d'extraction d'ADN, de WGA, de PCR et d'analyse des séquences sont donnés dans les paragraphes ci-dessous.

2.4.1. Lyse bactérienne par traitement chimique et thermique

La solution PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich® P3744-12PAK) servant à resuspendre les cellules algales avant analyse moléculaire est préparée selon les instructions du fabricant et autoclavée (20 min à 121°C). Les tampons de lyse (400 mM KOH, 100 mM DTT, 10 mM EDTA) et de neutralisation (400 mM HCl, 600 mM Tris-HCl, pH 7.5) sont préparés sous hotte de biologie moléculaire (UV3 HEPA PCR Workstation, UVP). Les tampons sont filtrés à 0,2 µm, répartis en aliquotes (tubes de 200 µL), traités aux UV pendant 90 sec et stockés à -20°C. Chaque aliquote n'est congelée/décongelée qu'une seule fois, lors de son utilisation. Si l'intégralité d'une aliquote n'est pas utilisée le même jour, l'excédent est jeté, pour éviter de congeler/décongeler plusieurs fois et pour éviter les contaminations.

La lyse cellulaire des bactéries se fait sous hotte de biologie moléculaire dans laquelle les différents tampons et tubes ont été stérilisés aux UV pendant 30 min avant utilisation.

A partir des cultures de bactéries, une colonie bactérienne est resuspendue dans 10 µL de PBS 1 X, avant de subir la lyse par ajout de 2 µL de tampon de lyse, suivie d'une incubation en thermocycleur de 10 min à 4°C, 1 min à 95°C, puis 4°C pendant 30 sec. Enfin, l'échantillon est neutralisé avec 2 µL de tampon de neutralisation et incubé au moins 3 min à 4°C.

A partir des isolats (microalgues et ses bactéries épibiontes), le volume de liquide où sont obtenues les isolats correspondent à environ 2,5 µL, auquel est ajouté 0,5 µL de tampon de lyse, suivie de la même incubation que ci-dessus. Enfin, l'échantillon est neutralisé avec 0,5 µL de tampon de neutralisation et incubé, comme précédemment, au moins 3 min à 4°C.

L'absence de bactéries dans les réactifs utilisés est vérifiée en faisant une lyse sur le PBS utilisé (contrôle du PBS) et une lyse sans PBS (contrôle des tampons de lyse et de neutralisation).

Les lysats cellulaires sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à l'étape suivante.

2.4.2. Amplification par PCR du gène codant l'ARNr 16S

L'identification des bactéries est réalisée sur la base du gène codant pour l'ARNr 16S, qui est le gène le plus souvent analysé chez les bactéries (Cf. partie 1.1 du Chapitre 1). Pour chaque bactérie, ce gène a été amplifié par PCR à l'aide des amorces universelles 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'). Le mélange réactionnel de 25 µL se compose d'un µL de produit d'extraction d'ADN, 0,1 mM de chaque désoxynucléoside triphosphate (dNTP), Green GoTaq Flexi Buffer 1 X, MgCl₂ 2,0 mM, 0,2 µM de chaque amorce, et 0,75 U de GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, USA). Les conditions d'amplification PCR sont les suivantes : 10 min à 95°C, 35 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 55°C et 30 sec à 72°C puis une extension finale de 10 min à 72°C.

2.4.3. Amplification par PCR des gènes codant pour l'ARNr 18S, la région D1-D3 du LSU et la région *rbcl*

Analogue eucaryote du gène codant l'ARNr 16S, le gène codant l'ARNr 18S est la cible moléculaire la plus couramment analysée chez les microalgues eucaryotes. Pour amplifier ce gène, les amorces universelles 63F (5'-ACGCTTGTCTCAAAGATTA-3') et 1818R (5'-ACGGAAACCTTGTTACGA-3') ont été utilisées. Le mélange réactionnel a été fait pour des volumes de 15 µL, contenant 1 µL d'ADN extrait, 0,1 mM de chaque désoxynucléoside triphosphate (dNTP), Green GoTaq Flexi Buffer 1 X, MgCl₂ 2,0 mM, 0,2 µM de chaque amorce, et 0,75 U de GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, USA). Les conditions d'amplification PCR sont les suivantes : 5 min à 94°C, 40 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 50°C et 1 min à 72°C puis une extension finale de 7 min à 72°C.

Deux autres régions ont été séquencées : le LSU D1-D3 et le *rbcl*-3P. La région LSU D1-D3 correspond au domaine D1-D3 du gène codant la grande sous-unité de l'ARN ribosomique. Cette région hypervariable est facilement amplifiable et son analyse phylogénétique permet très souvent de distinguer différentes espèces au sein d'un même genre (Kooistra *et al.*, 2010; Sarno *et al.*, 2005). Le gène *rbcl*-3P est un gène plastidial codant pour la grande sous-unité de la Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) qui présente également un fort pouvoir discriminant inter-espèce. Ces deux régions sont régulièrement analysées dans le cadre d'analyses taxonomiques, notamment sur les genres *Thalassiosira* et *Chaetoceros* (Alverson *et al.*, 2007; Hamsher *et al.*, 2013; Kooistra *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2010a; Sarno *et al.*, 2005). De plus, près de 70% des espèces des genres *Chaetoceros* et *Thalassiosira* présentes dans les eaux côtières de Roscoff ont une séquence nucléotidique codant les régions *rbcl*-3P et LSU D1-D3 dans la base de données NCBI. Les amorces CfD (5'-CCRTTYATGCGTTGGAGAGA-3' ; Hamsher *et al.*, 2011) et DPrbcl7(5'-AARCAACCTTGTAAGTCT-3' ; Jones *et al.*, 2005) ainsi que D1R (5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3' ; Scholin *et al.*, 1994) et D3Ca (5'-ACGAACGATTTGCACGTCAG-3' ; Scholin *et al.*, 1994) ont été utilisées pour amplifier respectivement les gènes *rbcl*-3P et LSU D1-D3. Le même mélange réactionnel ainsi que les mêmes conditions d'amplification par PCR, que pour le gène codant l'ARNr 18S, ont été utilisés avec une température d'hybridation de 50°C pour le LSU D1-D3 et le *rbcl*-3P.

2.4.4. Séquençage par la méthode de Sanger

Le séquençage des gènes d'ARNr 16S, ARNr 18S, *rbcL*-3P et LSU D1-D3 a été réalisé en utilisant la méthode de Sanger à l'aide d'un séquenceur capillaire 3130xl (Applied Biosystems, USA) de la plateforme Génome de Roscoff (Biogenouest), selon les recommandations de la plateforme. Le séquençage a été réalisé en utilisant les mêmes amorces que celles employées pour les amplifications par PCR. Pour le gène codant l'ARNr 16S deux amorces internes ont également été utilisées [518F et 802R, dont les séquences sont respectivement 5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3' et 5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'].

2.4.5. Analyse des séquences nucléotidiques et phylogénie

Les séquences nucléotidiques obtenues ont été nettoyées et assemblées en contig sous Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) en utilisant la fonction 'CAP contig assembly program'. Les séquences de référence les plus proches ont été obtenues par BLASTn sur le NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) à partir des bases de données '*Nucleotide collection (nr/nt)*' (séquence d'organismes cultivés et incultivés) et '*16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)*' (séquences des souches types). L'alignement des séquences d'ARNr 16S obtenues dans cette étude et des séquences d'intérêt identifiées par BLASTn a été réalisé sous Bioedit avec la fonction '*ClustalW multiple alignment*' et les arbres phylogénétiques ont été construits avec MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) en utilisant les approches par *neighbour-joining*, maximum de parcimonie, maximum de vraisemblance et un nombre important de ré-échantillonnages (*bootstrap* de 1000 répliquas) afin de générer un arbre consensus. Le pourcentage d'identité entre deux séquences est donné sur la base d'un alignement fait entre ces deux séquences, suivi d'une troncature ne conservant que le fragment commun aux deux séquences sous Bioedit avec la fonction '*ClustalW multiple alignment*'. Enfin, la fonction 'Pairwise alignment – Calculate identity/similarity for two sequences' sous Bioedit est utilisée pour déterminer le pourcentage d'identité entre les deux séquences en fonction de la longueur analysée (par exemple : 95,7% d'identité sur 1305 pb).

2.4.6. Comparaison des communautés bactériennes à l'aide du logiciel Fast Unifrac

Le logiciel Fast Unifrac est une amélioration du logiciel Unifrac, deux outils développés par le laboratoire de Rob Knight (Hamady *et al.*, 2010; Lozupone *et al.*, 2006) et qui fonctionnent sur Galaxy. Ce logiciel permet de comparer des communautés biologiques sur la base de la distribution phylogénétique des membres qui constituent ces communautés. Trois fichiers doivent alimenter l'analyse : un arbre phylogénétique avec outgroup au format Newick représentant l'ensemble des organismes de chaque communauté, un tableau reprenant l'ensemble des organismes et leur attribuant une communauté (communauté 1, communauté 2, etc.) au format tab, et un tableau définissant chacune des communautés au format tab. Différentes analyses statistiques sont ensuite proposées par le logiciel, notamment une analyse en coordonnées principales (PCoA) pour visualiser si différentes communautés sont séparées dans différentes dimensions et des tests de significativité (P Test Significance, Unifrac Significance).

3. Etude préliminaire : quelles microalgues choisir?

Pour réaliser l'étude envisagée dans les paragraphes précédents, il était donc nécessaire de sélectionner des microalgues à la fois présentes dans les eaux côtières de Roscoff, et disponibles sous forme de culture à la collection de culture de Roscoff (RCC). Pour cela, nous nous sommes appuyés sur la base de données des suivis de phytoplancton à SOMLIT-Astan réalisés entre 2000 et 2013 (Guilloux *et al.*, 2013 et la base de données complète de 2000 à 2013) et sur le catalogue des souches phytoplanctoniques disponibles à la RCC (<http://roscoff-culture-collection.org>). Différentes cultures de microalgues ont ensuite été analysées par microscopie pour identifier celles qui présentaient le plus fort taux de bactéries attachées à la surface de leurs cellules. Enfin les meilleurs candidats ont ensuite été utilisés pour cultiver et identifier leurs épibiontes bactériens.

Les microalgues analysées pour détecter la présence de bactéries attachées à leur paroi étaient les diatomées *Thalassiosira delicatula* (RCC 2560), *Chaetoceros danicus* (RCC 2565), *Skeletonema* sp. (RCC 1866), *Pseudo-nitzschia pungens* (RCC 3098 et RCC 3104), *P. fraudulenta* (RCC 3103), *P. delicatissima* (RCC 3096), *P. multiseriis* (RCC 3097), *Guinardia*

delicatula (RCC 3079), *G. flaccida* (RCC 3087) et *G. striata* (RCC 3078) et les dinoflagellés *Alexandrium minutum* (RCC 2331), *Scropsiella trochoidea* (RCC 1627) et *Heterocapsa triquetra* (RCC 3596). Pour cette étape de criblage, les cellules ont été fixées avec 1% de paraformaldéhyde et marquées avec $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de 4',6'-diamidino-2-phénylindole (couramment appelé DAPI). Lors de l'observation des cellules ainsi traitées, il était parfois difficile de distinguer les bactéries des microalgues car le noyau des cellules algales était également marqué et générait un signal masquant les éventuels signaux bactériens (Figure 33A). Des observations similaires ont été reportées par Farnelid *et al.* (2016), qui malgré l'utilisation de sondes oligonucléotidiques spécifiques des bactéries (EUB338), distinguait difficilement les bactéries des chloroplastes des microalgues. En revanche, les appendices éloignés du noyau de certaines microalgues, comme les soies de *Chaetoceros danicus* RCC 2565, étaient facilement analysables par cette technique (Figure 33).

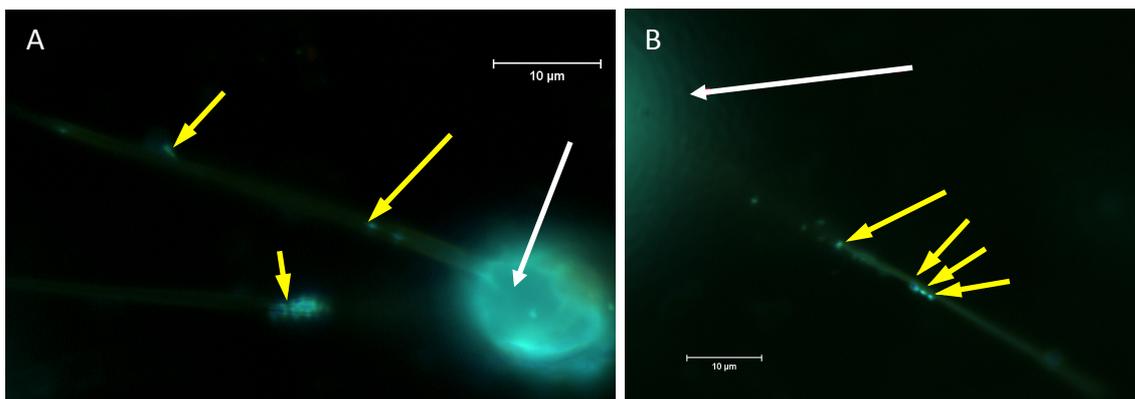


Figure 33 : Analyse microscopique de cellules de *Chaetoceros danicus* RCC 2656 marquées au DAPI. (A) Le noyau de la cellule algale présente un marquage trop intense, empêchant la visualisation d'éventuelles bactéries attachées à sa surface. (A et B) Cependant, les soies des cellules algales, étant plus distantes du noyau, laissent apparaître des bactéries attachées. Les flèches blanches indiquent le noyau de la cellule algale. Les flèches jaunes indiquent les bactéries attachées aux soies des microalgues.

La majorité des cultures algales montrait des bactéries attachées à leur surface cellulaire. Cependant, l'identification certaine de cellules bactériennes était parfois problématique. Nous n'avons pas visualisé de bactéries sur les cellules de *P. pungens* RCC 3104, *A. minutum* (RCC 2331), *H. triquetra* (RCC 2540) et celles des souches appartenant au genre *Guinardia*. Toutes les autres souches analysées étaient de bonnes candidates pour notre étude et certaines ont été retenues pour la deuxième phase du criblage. Il s'agissait de *Thalassiosira delicatula* (RCC 2560), *Chaetoceros danicus* (RCC 2565), *Pseudo-nitzschia pungens* (RCC 3098) et *Skeletonema* sp. (RCC 1866) et les dinoflagellés *Scropsiella trochoidea* (RCC 1627) et *Heterocapsa triquetra* (RCC 3596). Des isollements de bactéries attachées à la surface de ces microalgues ont été réalisés (méthode des micropipetages successifs et tri par

cytométrie). Les résultats de cette seconde analyse sont présentés dans le Tableau 6. Cette étape nous a permis d'écartier les microalgues (*S. trochoidea*, *H. triquetra*, *P. pungens* et *Skeletonema* sp.) pour lesquelles une trop faible quantité de bactéries attachées a été cultivée. En revanche, *C. danicus* RCC 2565 et *T. delicatula* RCC 2560 s'avéraient être les cellules algales qui avaient la plus forte intensité de colonisation bactérienne. Les différences observées peuvent s'expliquer par la morphologie de la paroi des cellules algales (plus ou moins poreuse et donc susceptible de favoriser l'attachement des bactéries) (Feng *et al.*, 2015; Losic *et al.*, 2007; Montanaro & Arciola, 2000; Youn & Hur, 2007)., la taille des cellules (moins de surface d'attachement chez les microalgues de petite taille, plus faible périmètre de diffusion des molécules sécrétées) (Amin *et al.*, 2012), la capacité de production d'exsudats (polysaccharides, petits acides aminés, sucres, protéoglycanes ou glycoprotéines) par les microalgues qui servent de substrats aux bactéries (Passow, 2002) et qui peuvent être spécifiques à certaines espèces bactériennes ou encore la plus ou moins forte sélectivité des microalgues vis-à-vis bactéries (sécrétion d'antibiotiques, compétition, prédation) (Guzman-Murillo & Ascencio, 2000; Senhorinh *et al.*, 2015). Par exemple, dans l'analyse, les diatomées ont présenté un plus fort taux de colonisation bactérienne que les dinoflagellés. Cela pourrait s'expliquer par une plus forte production d'exsudats de la part de ces diatomées, car on sait que ce paramètre est variable entre les espèces algales. Il est également possible de dire que la paroi cellulaire des diatomées présente des caractéristiques physiques (porosité, appendices, etc.) potentiellement plus favorables à l'attachement bactérien que la paroi des dinoflagellés. En effet, il a été démontré que certaines bactéries présentaient un attachement privilégié au niveau des jonctions du cingulum ou sur la fente du raphé, qui sont des éléments morphologiques caractéristiques des diatomées et où de la matière organique est sécrétée (Kaczmarska *et al.*, 2005). Une autre hypothèse pourrait être la plus forte pression de sélection de la part des dinoflagellés testés, qui secrèteraient par exemple plus de composés toxiques vis-à-vis des bactéries. Parmi les diatomées étudiées, *Skeletonema* sp. RCC 1866 s'est avérée être celle qui présentait la plus faible intensité de colonisation. Cette souche d'une plus petite taille que celle des autres diatomées testées, elle dispose donc d'une plus faible surface cellulaire, ce qui réduit les possibilités d'attachement des bactéries. Certaines microalgues écartées présentaient aussi d'autres inconvénients, comme la difficulté de les isoler par micropipetages successifs liée à leur trop petite taille (*Skeletonema* sp.) ou à la formation de longues chaînes (*Skeletonema* sp. et *P. pungens*). Or, l'isolement par

micropipetage était indispensable pour parvenir à isoler sélectivement certains genres algaux dans les échantillons environnementaux (étape ultérieure du projet).

Tableau 6 : Bilan de la présence de bactéries épibiontes cultivables sur les différentes microalgues sélectionnées. L'isolement de cellules algales a été réalisé par micropipetages successifs (ms) ou par tri en cytomètre en flux (c), selon les méthodes décrites précédemment. (a) valeur déterminée après culture en milieu LNHM liquide et incubation à 18°C. La présence des bactéries a été examinée par cytométrie en flux. Ces résultats ne tiennent compte que des isolements pour lesquels les contrôles de rinçage et de milieu étaient valides.

	<i>T. delicatula</i>	<i>C. danicus</i>	<i>S. trochoidea</i>	<i>H. triquetra</i>	<i>P. pungens</i>	<i>Skeletonema</i> sp.
Nombre de cellules algales isolées	118 ^{ms}	112 ^{ms}	46 ^{ms} + 560 ^c	1040 ^c	117 ^{ms}	400 ^c
Nombre ^a de cultures de bactéries épibiontes	69	32	7	1	15	16

Finalement, *T. delicatula* et *C. danicus* ont été choisis comme étant les meilleurs candidats et ont été retenus pour l'analyse de la diversité présentée dans la partie 3 de ce chapitre. Les genres *Thalassiosira* et *Chaetoceros* sont d'autant plus intéressants à étudier, qu'ils font partie des diatomées les plus représentées dans les océans contemporains, d'après une récente étude se basant sur la campagne océanographique Tara Oceans (Malviya *et al.*, 2016).

4. Article

Bacterial epibiotic communities of ubiquitous and abundant marine diatoms are distinct in short- and long-term associations

Klervi Crenn^{1,2}, Delphine Duffieux^{3,4} & Christian Jeanthon^{1,2}

¹CNRS, Station Biologique de Roscoff, Adaptation and Diversité en Milieu Marin, Marine Phototrophic Prokaryotes Team, Roscoff, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Station Biologique de Roscoff, Adaptation and Diversité en Milieu Marin, Oceanic Plankton Group, Roscoff, France

³CNRS, Station Biologique de Roscoff, Integrative Biology of Marine Models, Roscoff, France

⁴Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Station Biologique de Roscoff, Integrative Biology of Marine Models, Roscoff, France

Correspondence: Christian Jeanthon, Station Biologique, Place Georges Teissier, CS90074, 29688 Roscoff cedex, France; Phone : + 33 298 292 563 ; Fax : + 33 298 292 324 ; E-mail: jeanthon@sb-roscoff.fr

Running title: Diversity of diatom-attached bacteria

Keywords: Diversity, heterotrophic bacteria, interactions, diatoms, *Thalassiosira*, *Chaetoceros*, Western English Channel

Abstract

Interactions between phytoplankton and bacteria play a central role in mediating biogeochemical cycling and food web structure in the ocean. The cosmopolitan diatoms *Thalassiosira* and *Chaetoceros* often dominate phytoplankton communities in many marine systems. Past studies of diatom-bacterial interactions have employed community-level methods and culture-based or natural diatom populations. Little is known on physical relationships between bacterial and diatom partners that may represent tight associations. Here, we examined the epibiotic microflora of 765 *Thalassiosira* and *Chaetoceros* single cells isolated from natural samples and collection cultures, considered here as short- and long-term associations, respectively. Epibiotic microbiota of single diatom hosts was analyzed by cultivation and by cloning-sequencing 16S rRNA genes obtained following whole genome amplification. The prevalence of epibiotic bacteria was dependent of the host species in natural waters while it was similar in both cultures. Both culture and molecular approaches demonstrated that both diatoms have distinct bacterial communities in short- and long-term associations. Some epibionts, commonly associated with phytoplankton, were repeatedly isolated from cells of both diatom collection cultures, but were not recovered from environmental cells. Our results suggest that in controlled laboratory culture conditions bacterial-diatom interactions select for a simplified, but specific, epibiotic microbiota shaped and adapted for long-term associations.

Introduction

Bacteria and eukaryotic microalgae are the major components of the plankton in the upper ocean layers and their metabolism largely controls pelagic energy flow and nutrient cycling (Falkowski *et al.*, 2008). Determining how they interact is therefore essential to strengthen the understanding of these groups and how they impact marine biogeochemical cycles.

While heterotrophic prokaryotes and phytoplankton are known to interact through complex mechanisms (Azam & Malfatti, 2007), it is expected that these compartments are very closely related in the planktonic environment. The immediate environment of marine phytoplankton cells or phycosphere (Bell & Mitchell, 1972) is considered as physically and chemically distinct from the surrounding seawater, which promote the growth of specific microbial taxa, thus creating a dynamic of interactions which can help to explain the complexity of marine food webs. The use of rRNA gene sequencing and barcoding approaches allowed establishing links between phytoplankton and bacterial community dynamics in natural communities (Rooney-Varga *et al.*, 2005; Teeling *et al.*, 2012) and culture collections (Jasti *et al.*, 2005; Sapp *et al.*, 2007b; Schäfer *et al.*, 2002). These partners often meet which lead to beneficial, neutral or conflictual interactions (Amin *et al.*, 2012; Cooper & Smith, 2015).

Diatoms are a large component of marine biomass and produce about 25% of the total C fixed on Earth (Field *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1995). These key ecological players of the modern ocean have been described as the most diverse group of phytoplankton (Armbrust, 2009). Their ecological success is mainly due to their numerous metabolic properties and to their amazing silica cell wall. Most of their evolutionary adaptations are due to the acquisition of genes from their endosymbiotic ancestors, and by indisputable horizontal gene transfers from marine bacteria, which are rarely documented in other eukaryotic organisms (Armbrust *et al.*, 2004; Bowler *et al.*, 2008). The co-occurrence of bacteria and diatoms in common habitats for more than 200 million years and their intimate associations likely played a major role in the ecological success and species diversification of diatoms (Amin *et al.*, 2012).

Although few reports of diatom-bacterial interactions have used natural diatom populations (Amin *et al.*, 2012; Kaczmarek *et al.*, 2005; Rooney-Varga *et al.*, 2005), most studies were performed using cultured diatoms (Grossart & Simon, 2007; Grossart, 1999; Grossart *et al.*, 2005; Kaczmarek *et al.*, 2005; Sapp *et al.*, 2007b; Schäfer *et al.*, 2002). Consistent associations between specific bacterial and diatom taxa have been found (Amin *et*

al., 2012; Schäfer *et al.*, 2002), although other work suggests that the composition of diatom-associated bacterial assemblages shifts over weeks to months in culture (Sapp *et al.*, 2007b). Today, however, it remains unclear whether bacteria associated with microalgal cells are species-specific (Grossart *et al.*, 2005; Jasti *et al.*, 2005; Rooney-Varga *et al.*, 2005) or determined bacterial source communities (Kaczmarska *et al.*, 2005; Sapp *et al.*, 2007b).

Previous studies on the interactions between bacteria and diatoms have mostly considered the bacteria at the population and community levels. Little is known regarding the interactions of bacterial assemblages attached to single host cells. The sole exceptions appear to be a few microscopy studies documenting the abundance and mode of attachment of bacteria attached to individual diatoms (Kaczmarska *et al.*, 2005) and a recent study that evaluated the composition and variability of bacterial assemblages attached to individual diatoms (Baker & Kemp, 2014). The attachment of bacteria to algal cells may represent a tight interaction (Cole, 1982; Grossart *et al.*, 2005). Indeed, Gärdes *et al.* (2011) demonstrated that attachment of specific bacteria to diatoms *Thalassiosira weissflogii* was required for transparent exopolymer particle formation and aggregation.

In this study, our aim was to study tight physical associations between bacterial and diatom partners. For this, we focused on bacteria attached to single cells of the environmentally relevant diatom genera *Thalassiosira* and *Chaetoceros* in natural communities and in culture that were considered as in short- and long-term associations, respectively. We evaluate the prevalence of attached bacteria to diatom cells and compare bacterial assemblages in both situations. We hypothesized that *in situ* bacterial associations differs from those in cultures and that laboratory culture conditions favors the attachment of specific bacterial strains.

Materials and methods

Diatom cultures and natural samples

Clonal strains of *Thalassiosira delicatula* RCC 2560 and *Chaetoceros danicus* RCC 2565 were obtained from the Roscoff Culture Collection. Both diatoms have been isolated from the same sample of surface seawater (1 m depth) collected in January 2011 offshore Roscoff at the Astan observatory site (60 m depth, 48°46'40" N, 3°56'15" W) using the RV Neomysis

using a Niskin bottle. Both strains are maintained under xenic conditions in the RCC since their isolation. In this study, they were both grown at 19°C in K medium for diatoms (Keller *et al.*, 1987) with a 14:10 h light:dark cycle at 80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Natural surface seawater samples (1 m depth) were collected at the Astan and Estacade (48°43'56" N, 3°58'58" W) sites. A recent analysis of the microphytoplankton abundance and diversity at Astan demonstrated that *Thalassiosira* and *Chaetoceros* are abundant (above 500 cells.L⁻¹ on average in all the 157 samples analysed from 2000 to 2010) and able to become dominating at times (Guilloux *et al.*, 2013). Diatom populations in this system vary throughout the year in both species diversity and abundance of individual species. *Thalassiosira* and *Chaetoceros* cells were both isolated in March/April 2014 (molecular approach) and in July/August 2014 (culture approach), respectively.

Single diatom cell isolation

Single diatom cells were isolated under sterile conditions in a laminar flow hood. To lower the number of free-living bacteria in the algal cultures and to concentrate microalgae from natural seawater samples, algal cells were first gently separated by gravity using a 47 mm diameter, 11 μm pore-size nylon filter (Millipore) and washed three times with 50 mL of autoclaved seawater. Single cells were picked with a sterile glass capillary micropipette and washed 3-4 times with filter-sterilized seawater for further bacterial epibiont culture or with sterile phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.5) for further direct molecular identification of epibionts. We previously observed that replacement of sterile seawater by PBS as washing solution improved the PCR amplification success. Single cells were directly transferred in culture medium or kept on ice until further DNA extraction. For both approaches, controls were performed for each diatom cell isolated by checking the absence of bacteria in the last seawater or PBS drop used in the washing series (see below).

Culture of bacterial epibionts

For cultivation of diatom epibionts, single isolated algal cells and controls were directly transferred in 48-well plates containing low-nutrient heterotrophic medium (LNHM) (Rappé *et al.*, 2002) prepared by dissolving 35g/L of commercial sea salts (Red Sea Europe) instead of using natural seawater. Bacterial cultures were incubated at 19°C for up to 6 weeks and

growth was analysed by flow cytometry using a BD Accuri C6 cytometer (BD Biosciences). Cultures that contained bacteria were streaked on LNHM agar for purification at least two times.

Dereplication of bacterial isolates

Bacterial isolates were dereplicated by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Ghyselinck *et al.*, 2011). Colonies were obtained by growing the isolates on marine agar medium (1:10; 0.5 g peptone, 0.1 g yeast extract, 35 g sea salts dissolved in 1 L of Milli-Q water) at room temperature for 4-7 days according to their growth rate. A small amount of colony was directly applied onto a polished steel MSP 96 target plate (Bruker Daltonics). After drying, the deposited bacteria were overlaid with 1 μ l of HCCA matrix (a saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid; Bruker Daltonics) and air dried at room temperature. Mass spectra were acquired on a microflex LT MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) configured with Bruker flexControl software using the default settings. Mass spectra were obtained in t2d format and were converted to txt files using the Data Explorer 4.9 software (AB Sciex). The txt files were imported in BioNumerics 5.1 software (Applied Maths) and converted to fingerprints for further analyses. To obtain reliable data analysis, the spectra with extensive noise and/or insufficient signal intensities were excluded. The similarity between the spectra was expressed using Pearson's product moment correlation coefficient and the spectra were clustered using the UPGMA clustering algorithm.

Molecular analysis of epibiotic microflora

(i) DNA extraction from single cells and whole-genome amplification (WGA)

DNA from single diatom cells and their attached bacteria was extracted following chemical treatment and thermal shock. Cells were lysed using lysis and neutralization buffers prepared as described in Humily *et al.* (2014). After addition of 0.5 μ L of lysis buffer, the mixture was incubated at 4°C for 10 min in a thermocycler. The lysate was further incubated at 95°C for 1 min, cooled at 4°C before adding 0.5 μ L of neutralization buffer, and kept 3 min on ice until WGA.

WGA reactions were carried out under a HEPA/UV3 PCR Workstation (UVP) using the Genomiphi v2 kit (GE Healthcare). WGA reactions were carried out in 12 μ L final volume by

adding sample buffer (3.5 μ L), reaction buffer (4.5 μ L) and phi29 enzyme (0.5 μ L; GE Healthcare) and then incubated for 4 h at 30°C before inactivating the enzyme for 5 min at 65°C. Positive controls consisting in 1-9 bacterial cells in 3 μ L of PBS were performed to check the efficiency of WGA reaction. Blank controls with sterile PBS were also taken for each experiment. WGA products were stored at -20°C until processing.

(ii) PCR amplification and sequencing of rRNA genes

WGA products were tested for the presence of bacteria with primer 1492R (Turner *et al.*, 1999) in combination with primer 799F (Chelius & Triplett, 2001; Ghyselinck *et al.*, 2013) that strongly discriminates against chloroplast 16S rDNA. Reaction mixtures (12.5 μ L) contained 0.75 U of GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (Promega), 1X polymerase buffer, 2.0 mM MgCl₂, 0.1 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.2 μ M of each primer, and 1 μ L of WGA product. The program consisted of an initial denaturation step of 3 min at 95 °C, followed by 35 cycles (20 s at 95 °C, 40 s at 53 °C, and 40 s at 72 °C), and a final extension step of 10 min at 72 °C. 16S rRNA genes from cultured epibionts were amplified with primers 8F (Turner *et al.*, 1999) and 1492R using the conditions above. The program consisted of an initial denaturation step of 10 min at 94 °C, followed by 35 cycles (30 s at 95 °C, 1 min at 55 °C, and 1 min at 72 °C), and a final extension step of 10 min at 72 °C.

In order to identify the diatom single cells isolated from the natural environment, the genes encoding their 18S rRNA gene and the large sub-unit (LSU) D1-D3 region were amplified using primers 63F and 1818R and D1R and D3Ca, respectively (Orsini *et al.*, 2002). Reaction mixtures (15 μ L) contained 0.75 U of GoTaq G2 Flexi DNA polymerase, 1X polymerase buffer, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 μ M of each primer, 0.1 mM of each deoxynucleoside triphosphate, and 1 μ L of extracted DNA. The program consisted of an initial denaturation step of 5 min at 95 °C, followed by 40 cycles (30 s at 95°C, 30s at 50°C (for 18S rRNA amplification) or 30 s at 55°C (for LSU amplification), and 1 min at 72°C) and a final extension step of 10 min at 72 °C.

WGA products that proved positive for 16SrRNA but negative for 18SrRNA were removed from further analysis. PCR products of 16 rRNA genes were cloned using TOPO TA Cloning Kit[®] (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. Insert-containing clones were identified by agarose gel electrophoresis of PCR products amplified using M13F and M13R primers. Clones and PCR products were sequenced by MacroGen Europe (Amsterdam, The Netherlands) or by the Biogenouest sequencing platform at the Station Biologique (Roscoff,

France). Bacterial taxon for each sequence was identified and named by the homologous 16S sequence in Genbank using BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Phylogenetic analyses of 16S and 18S rRNA gene sequences were performed using the maximum likelihood tree method implemented in MEGA6 software (Tamura *et al.*, 2013).

Statistical analyses of the bacterial communities

Each single algal cell was considered as an environment to which 16S rDNA sequences we assigned. We used phylogenetic indices such as Fast UniFrac (Hamady *et al.*, 2010) to compare microbial communities. To determine whether the cultured and natural bacterial communities in both diatoms were significantly different than random, we used the Unifrac (Lozupone *et al.*, 2005). Unifrac.weighted in Mothur (Schloss *et al.*, 2009) was used to run the principal coordinates analysis (PCoA).

Nucleotide sequence accession numbers

All nucleotide sequences obtained in this study are available in GenBank database under the accession numbers XXXXXX to XXXXXX.

Results and discussion

The diatoms *Thalassiosira* spp. and *Chaetoceros* spp. are ubiquitous and often numerically abundant phytoplankton species in marine systems (Leblanc *et al.*, 2012) and they display the highest species diversity in the pelagic temperate phytoplankton community (Hasle & Syvertsen, 1996; Round *et al.*, 1990). Based on a recent characterization of the diatom diversity patterns on a global scale (Malviya *et al.*, 2016), *Chaetoceros* and *Thalassiosira* represent the first and third most abundant ribotypes and were among the three most diverse genera. Considering their global environmental significance and their potential associations with bacteria, the identity of heterotrophic bacteria associated with *Chaetoceros* spp. and *Thalassiosira* spp. has been relatively understudied. Most past studies of the associations between phytoplankton and bacteria have used population or community-level approaches that obscure cell-to-cell interactions. Our major goal was to evaluate diatom-bacteria interactions at an appropriate physical scale.

Methodological considerations

This study addressed the examination of physical interactions between bacteria and two environmentally relevant diatom genera. Most studies that tried to tackle specifically this question first separated free-living bacteria from diatom cells by filtration on membranes and examined the bacterial assemblages associated to the diatom cell fraction. We assume that the issue of specific associations can unfortunately not be answered using this method because non-attached bacteria are also retained by the filter membranes, and may remain, even after extensive washing steps. The method described in this study assures the epibiotic status of the bacterial communities analyzed. The main limitation of our approach is that the manual isolation of single cells is time-consuming and limits the number of analyzed cells. Future studies might apply different strategies to pursue this question further. Although it requires an expensive and sophisticated equipment and special infrastructure such as a clean room, flow cytometry cell sorting systems may represent powerful tools to facilitate the rapid and efficient isolation of microalgal cells. Despite sterile operations are difficult to achieve by these instruments, they would enable to analyze attached assemblages in multiple cultures and environmental cells of different host species once adequate controls are employed.

Bacterial colonization of diatom cells

In this study, we first compare the prevalence of bacterial cell attachment in both diatom species. It is well known that bacterial colonization may be influenced by the algal growth state in cultures and the bloom stage in natural samples (Grossart *et al.*, 2005; Kaczmarska *et al.*, 2005). To circumvent this issue, algal cultures used for single cell isolation were all in early stationary growth phase and the same natural samples were used to isolate *Chaetoceros* and *Thalassiosira* cells. A total of 296 and 469 cells were manually isolated from cultures and natural samples, respectively (Table 1). Both approaches yielded almost identical proportions of diatom cells colonized by bacteria. This only exception to this general trend was the proportions of epibionts cultured and amplified from *Thalassiosira* RCC 2560 cultures. We are not able to explain this difference because the epibiont proportions were very stable from one *Thalassiosira* RCC 2560 culture to another whatever the approach was used. We also observed that a majority of diatom cells were free of epibiotic bacteria. When isolated from cultures, about the two thirds of *Thalassiosira* and *Chaetoceros* cells were epibiont-free and the proportions exceeded 90% of *Chaetoceros* cells in natural waters.

Table 1. Proportions of algal cells with bacterial epibionts in cultures and natural samples as evaluated by cultural and molecular approaches and numbers of isolates and bacterial sequences obtained in this study

	Cultures		Natural samples	
	<i>Chaetoceros</i> RCC 2565	<i>Thalassiosira</i> RCC 2560	<i>Chaetoceros</i> spp.	<i>Thalassiosira</i> spp.
Cultural approach				
Algal cells isolated ^a	75	88	206	209
Algal cells with epibionts ^b (%)	27 (36)	69 (78)	19 (9)	68 (33)
Epibiont isolates ^c	38	63	12	64
Bacterial species ^d	5	14	7	38
Molecular approach				
Algal cells isolated ^e	20	113	28	26
Algal cells with epibionts (%)	6 (30)	38 (34)	2 (7)	6 (23)
PCR libraries from single cells	6	18	2	14
Bacterial phylotypes	9	19	3	14
OTUs ^d	7	4	3	10

^a Cells for which no bacterial growth was obtained from controls

^b Positive enrichments in LNHM as measured by flow cytometry

^c Epibionts isolated on LNHM agar plates

^d Defined at the 98% similarity level

^e Cells for which no amplification products were obtained from controls

These results are in agreement with early studies that led to the conclusion that living pelagic diatoms are not colonized by bacteria (Droop & Elson, 1966) and with more recent reports that showed high proportions of bacteria-free diatom cells in old cultures (Kaczmarzka *et al.*, 2005). They also support the hypothesis that the extent of algal colonization by bacteria depends on the abundance of algae and free bacteria (Vaqué *et al.*, 1989). Only limited quantitative information exists on the physical interactions between bacteria and phytoplankton in pelagic aquatic environments. However, the actual view is that bacterial colonization of planktonic algae may vary with respect to algal species and physiological state (Grossart *et al.*, 2005, 2006). Indeed, we found that *Thalassiosira* cells harbored significantly higher proportions of epibionts than *Chaetoceros* cells in natural samples whatever the approach used. Two possibilities can bring out the difference observed. Since physical associations between bacteria and microalgae are known to change over the course of algal bloom cycles (Grossart *et al.*, 2005, 2006; Mayali *et al.*, 2011), one possibility is that the effect of temporal variation in algal hosts collections. However, it is not the case in our samples, because *Thalassiosira* and *Chaetoceros* cells were isolated from the same natural samples although there was a 4-5 month time difference between collections for both approaches. Since the epibiont proportions obtained by both approaches for each diatom are almost identical, it is unlikely that the differences observed are linked to different physiological states. An alternative possibility is that diatom hosts are quite distinct in their size and structure characteristics, their release of exopolymers and their production of inhibitory substances (Amin *et al.*, 2012; Mykkestad, 1995; Vaqué *et al.*, 1989). This hypothesis seems however unlikely since similar epibiont proportions were found in *Chaetoceros* and *Thalassiosira* cultures using the molecular approach. We also acknowledge that diatom cells in culture are confined to uniform laboratory conditions and that a range of environmental factors including nutrient limitation can also shape algal-bacterial interactions in natural conditions.

Using the cultivation and molecular data, we calculated the average number of species or OTUs attached to single diatoms cells. Interestingly, whatever the approach used, we found that each host cell harbored between 0.9 to 2.3 epibiotic species or OTUs, indicating a rather low attachment. The number of different phylotypes in a host-cell library is a minimum estimate of the number of bacterial cells that occurred on the host cell, but with the methods used there was no direct evidence for how many bacterial cells were attached to each of the

host cells examined. Our numbers are generally in agreement with that reported by Baker and Kemp (2014) although these authors found also higher numbers of phylotypes per algal cell for some species or strains.

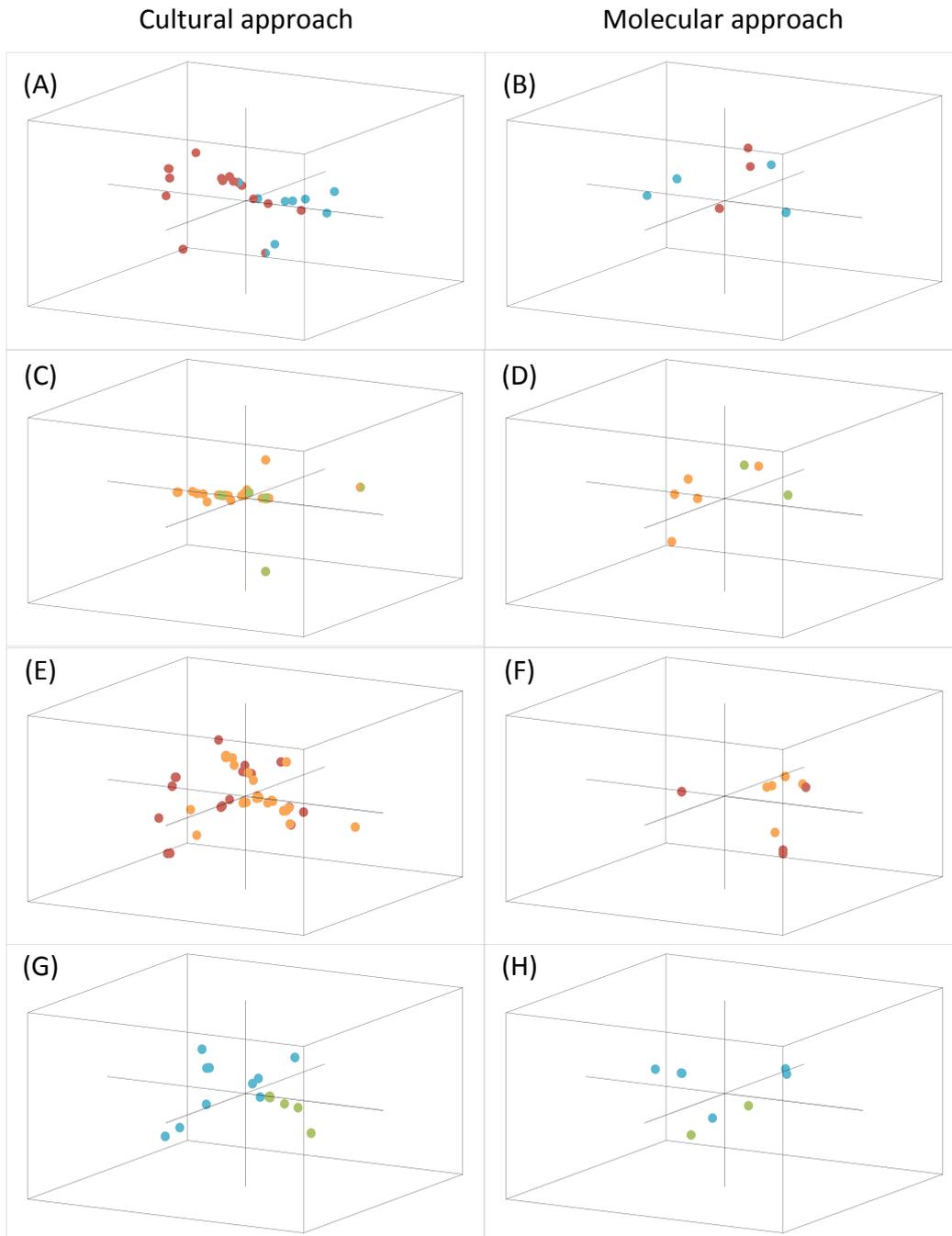


Figure 1: PCoA representation of each single diatom cell analyzed in this study, with a 3D position depending on the composition of its epibiotic bacterial communities. Both cultural (left part) and molecular (right part) diversity are shown. Diatom cells correspond to *T. delicatula* RCC 2560 (red), *C. danicus* RCC 2565 (blue), environmental *Thalassiosira* spp. (orange) and environmental *Chaetoceros* spp. (green).

Microbial community comparisons between hosts in short- and long-term associations

A total of 45 sequences were obtained after whole genome amplification of 41 single host cells isolated from cultures and natural samples followed by 16S rRNA gene amplification and cloning (Tables 1 and 2). When clustered at the 98% similarity level, 24 OTUs representing diverse lineages of bacterial phyla were identified and their distribution did not overlap among host species and between collection culture and environmental samples. The identified OTUs were classified into the classes *Alpha-*, *Beta-* and *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Flavobacteriia*, *Bacilli*, *Cytophagia*, and *Sphingobacteriia*. Bacterial cultivation using a low nutrient organic medium and extended incubation periods of up to eight weeks were used to increase the overall assessment of the species richness. Cultivation identified a total of 177 unique isolates (Tables 1, 3 and 4). The isolated strains fell generally into the same bacterial classes than environmental clones but none belonged to the classes *Betaproteobacteria* and *Bacilli*.

In this study, we asked if microalgal species could influence the epibiont community structure in natural communities and in cultures. Weighted UniFrac analyses, which takes into account only presence/absence data for OTUs, showed that the epibiotic bacterial communities associated with *T. delicatula* RCC 2560 and *C. danicus* RCC 2565 as determined by both cultural and molecular approaches were distinct ($P < 0.001$). Principal Coordinate Analysis (PCoA) also separated the corresponding libraries (Fig. 1a and 1b). These results complement earlier observations suggesting that microalgal cultures harbor specific bulk bacterial communities (Grossart *et al.*, 2005; Guannel *et al.*, 2011; Sapp *et al.*, 2007b; Schäfer *et al.*, 2002). A significant difference ($P < 0.001$) was also observed between epibiotic communities attached to *Thalassiosira* and *Chaetoceros* cells collected from natural waters (Fig. 1c and 1d). Since only the molecular approach allowed us to identify diatom cells from natural waters at the species level, the specificity of the *in situ* associations was enlarged to the genus level. Nevertheless, distinctness between *in situ* epibiotic communities of both genera was observed in the same samples collected at the same place. We also compared culture-based and environmental *Thalassiosira* and *Chaetoceros* single cells isolated from natural samples and collection cultures, considered here as short- and long-term associations, respectively. Epibiotic bacterial communities associated with cells of *Thalassiosira* and *Chaetoceros* collection cultures and of their environmental relatives showed

a highly significant difference ($P < 0.001$) (Fig. 1e-h). It has been shown that bacterial assemblages associated with phytoplankton cultures can be very different from the natural bacterial assemblages during blooms of the same species (Garcés *et al.*, 2007). We acknowledge however that the environmental diatom hosts differed at the species from their cultured relatives.

Table 2. Epibiotic bacterial phylotypes recovered from diatom cells in culture and from natural waters and their closest cultivated relative identified by Blastn.

Diatom host	n ¹	Phylum/class	Order	Family	Species	16S rRNA similarity(%)
Cultures						
<i>C. danicus</i> RCC 2565	3	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Algimonas</i> sp.	99.6
	1	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Limnobacter thiooxidans</i>	100
	1			<i>Comamonadaceae</i>	<i>Pelomonas</i> sp.	99.9
	1	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Halomonadaceae</i>	<i>Halomonas</i> sp	99.9
	1	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Cryomorphaceae</i>	<i>Brumimicrobium mesophilum</i>	93.5
	1	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Nesterenkonia flava</i>	99.4
	1	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Aeribacillus pallidus</i>	99.9
	1	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Erythrobacteraceae</i>	<i>Erythrobacter litoralis</i>	98.8
<i>T. delicatula</i> RCC 2560	1		<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Maribius pelagius</i>	94.7
	1	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Aeribacillus pallidus</i>	100
	16	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Tenacibaculum skagerrakense</i>	97.8
Environmental cells²						
<i>Chaetoceros debilis</i>	1	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Marivita cryptomonadis</i>	98.5
	1			<i>Pseudoruegeria lutimaris</i>	97	
<i>Chaetoceros protuberans</i>	1	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Saccharophagus degradans</i>	95.1
<i>Thalassiosira punctigera</i>	1	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Roseovarius nubinhibens</i>	97.9
	1	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Colwelliaceae</i>	<i>Colwellia psychoerythraea</i>	99.3
	1		<i>Chromatiales</i>	<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	<i>Ectothiorhodospira mobilis</i>	94.3
	1		<i>Cellvibrionales</i>	<i>Haliaceae</i>	<i>Chromatocurvus halotolerans</i>	95.7
	1			<i>Spongiibacteraceae</i>	<i>Dasania marina</i>	93.0
	1				<i>Oceanicoccus sagamiensis</i>	96.8
	1		<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas trivialis</i>	90.7
	4	<i>Cytophagia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Amoebophilaceae</i>	<i>Candidatus Amoebophilus asiaticus</i>	93
2	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Cryomorphaceae</i>	<i>Salinirepens amamiensis</i>	94.4	
1	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	<i>Lewinella cohaerens</i>	89.1	

¹ number of individual diatom cell carrying the corresponding bacterial phylotype

² as identified by 18S rRNA sequencing

Diversity of diatom epibionts

Although the molecular approach was designed and performed using necessary precautions (decontamination and cleaning procedures) to prevent contamination, the successive steps that include single cell isolation, whole genome and PCR amplification presented opportunities for the inclusion of non-host derived bacterial sequences. We didn't find sequences recognized as being commonly associated to human skin. We also removed samples with any negative control amplification from further analysis. A few phylotypes and strains were not typical of bacterial taxa found previously with algal cultures (Tables 2, 3 and 4). We identified sequences of *Aeribacillus pallidus* (*Firmicutes*) that shared about 100% similarity with that of the type species of this genus. This was a surprising result because this species is known to be a thermophilic, halotolerant bacteria found in diverse thermophilic environments (Filippidou *et al.*, 2015). However, since sequences of *A. pallidus* were also abundantly found in skin-associated bacterial communities of marine fishes (Larsen *et al.*, 2013), marine biotic surfaces could represent an alternative ecological niche for *A. pallidus*. We propose that *Aerobacillus* sequences were initially present in the phycosphere of the diatoms grown to culture and were selected for with successive transfers on the basis of their capacity of growing in association with the algae. *Actinobacteria* are rare in pelagic marine environments (Pommier *et al.*, 2007). We obtained diverse actinobacterial strains attached to diatom cells in cultures and natural samples. Interestingly, the isolated species belong to genera containing species isolated from diatom cultures (Le Chevanton *et al.*, 2013) and from marine environments, most of them in association with invertebrates, algae and microalgae (Green *et al.*, 2004; Menezes *et al.*, 2010; Palomo *et al.*, 2013; Pathom-aree *et al.*, 2006).

Table 3. Epibiotic bacterial strains isolated from diatom cells in natural waters and their closest cultivated relative identified by Blastn.

Diatom host	Strain (n*)	Phylum/class	Order	Family	Species	16S rRNA similarity(%)	
<i>Chaetoceros</i> spp.	KC58 (2)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Hoeflea phototrophica</i>	97.9	
	KC43 (1)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Glaciecola punicea</i>	96	
	KC55B (4)			<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas undina/marina</i>	99	
	KC57 (1)				<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	100	
	KC61 (1)		<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Photobacterium aquimaris</i>	99.9	
	KC46A (1)	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	97.7	
<i>Thalassiosira</i> spp.	KC79A (2)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	99.8	
	KC76 (1)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Kiloniellales</i>	<i>Kiloniellaceae</i>	<i>Kiloniella laminariae</i>	96.3	
	KC56 (1)		<i>Rhizobiales</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Hyphomicrobium nitratorans</i>	95.3	
	KC41B (1)			<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Nitratireductor indicus</i>	95.2	
	KC41A (1)				<i>Nitratireductor pacificus</i>	95.2	
	KC45 (1)		<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Jannaschia sp.</i>	98	
	KC59 (1)				<i>Litoreibacter meonggei</i>	97.7	
	KC77A (2)				<i>Loktanela maricola</i>	99.6	
	KC68 (1)				<i>Loktanela vestfoldensis</i>	96	
	KC75 (1)				<i>Nereida ignava</i>	97.3	
	KC63A (3)				<i>Octadecabacter antarcticus</i>	98.1	
	KC47 (1)				<i>Roseobacter litoralis</i>	98.8	
	KC52A (2)				<i>Shimia marina</i>	98.2	
	KC42A (2)			<i>Sphingomonadales</i>	<i>Erythrobacteraceae</i>	<i>Altererythrobacter luteolus</i>	97
	KC74 (1)					<i>Croceicoccus marinus</i>	97.3
	KC49 (1)					<i>Erythrobacter aquimaris</i>	99.6
	KC67 (1)				<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingopyxis flavimaris</i>	98.8
	KC60 (1)	<i>Cytophagia</i>	<i>Cytophagales</i>		<i>Flammeovirgaceae</i>	<i>Roseivirga ehrenbergii</i>	93.2
	KC65A (2)	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>		<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Croceitalea eckloniae</i>	97.3
	KC50A (2)					<i>Dokdonia genikastrain</i>	99.7
	KC62 (1)					<i>Lacinutrix sp.</i>	97.3
	KC44 (1)					<i>Lutimonas vermicola</i>	100
	KC51B (2)					<i>Maribacter aquivivus</i>	97.7
	KC51A (1)					<i>Maribacter forsetii</i>	96
	KC81 (1)					<i>Maribacter ulvicola</i>	99.3
	KC73A (2)					<i>Olleya namhaensis</i>	97.3
	KC46B (2)					<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	97.7
	KC48 (1)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>		<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Aestuariibacter litoralis</i>	97.8
	KC78 (1)					<i>Alteromonas tagae</i>	99
	KC72 (1)					<i>Pseudohalaea rubra</i>	98
	KC53A (5)				<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas undina/marina</i>	99.9
	KC66 (1)				<i>Shewanellaceae</i>	<i>Shewanella japonica</i>	99.3
	KC70 (1)				<i>Colwelliaceae</i>	<i>Thalassomonas agariperforans</i>	96.9
	KC64 (1)			<i>Chromatiales</i>	<i>Granulosicoccaceae</i>	<i>Granulosicoccus coccoides</i>	96.9
KC80 (1)			<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio breoganii</i>	100	
KC54 (1)					<i>Vibrio splendidus</i>	100	
KC71 (1)			<i>Unclassified Gammaproteobacteria</i>		<i>Chromatocurvus halotolerans</i>	97.3	
KC69 (1)	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>		<i>Saprospiraceae</i>	<i>Portibacter lacus</i>	91.5	
KC79C (1)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>		<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	99.8	

* number of individual diatom cell carrying the corresponding bacterial isolate

Epibiotic bacteria isolated from natural waters were highly diverse (Table 3) and only a few species overlapped in *Chaetoceros* and *Thalassiosira* cells. Interestingly, the overlapping species were also the most frequently isolated from environmental diatom cells. They consisted in species of the genera *Pseudoalteromonas* and *Tenacibaculum*, the majority of which appear to be associated with eukaryotic hosts, including various marine algae (Akagawa-Matsushita *et al.*, 1992; Egan *et al.*, 2000, 2001; Suzuki *et al.*, 2001).

Alpha- and *Gammaproteobacteria* were the two main classes identified in the cultivable epibiotic communities of diatom cultures (Table 4, Suppl. Fig. 1). Interestingly, some epibionts were repeatedly isolated from both diatom cultures. Among them, strains belonging to the gammaproteobacterial genus *Marinobacter*, a common inhabitant of phytoplankton cultures (Amin *et al.*, 2009, 2015; Le Chevanton *et al.*, 2013; Green *et al.*, 2015; Sison-Mangus *et al.*, 2014), were obtained from both collection cultures. While investigating the bacterial community associated with dinoflagellates and coccolithophores, Amin *et al.* (2009) observed that members of the genus *Marinobacter* were present in over 80% of cultures. Further studies demonstrated that *Marinobacter* isolates formed specific beneficial associations with diverse phytoplankton that could require cell-to-cell adhesion (Amin *et al.*, 2009; Bolch *et al.*, 2011; Gärdes *et al.*, 2011). Other frequently isolated epibiotic bacteria differed with the algal species. Cultivated attached microflora of *C. danicus* RCC 2565 was dominated by strains related to the genera *Algimonas* while *Erythrobacter*, *Paracoccus* and a new genus related to *Boseongicola aestuarii* prevailed in *T. delicatula* RCC 2560. *Algimonas*, *Erythrobacter*, and *Paracoccus* are also reported for their common occurrence in algal cultures or as epibionts of macroalgae (Alavi *et al.*, 2001; Le Chevanton *et al.*, 2013; Cruz-López & Maske, 2016; Jasti *et al.*, 2005; Kaczmarek *et al.*, 2005; Schäfer *et al.*, 2002). Our data demonstrated that diversity of the cultured epibiotic microflora was lower in diatom culture than in natural waters. Furthermore, we did not find the frequently isolated taxa neither in cultures nor in phylotypes retrieved obtained from environmental cells (Tables 2 and 3). This is exemplified by the typically low annual relative abundance of *Marinobacter* in the Western English Channel (Green *et al.*, 2015). Together, this provides some support to the hypothesis that, in uniform laboratory culture conditions, bacteria-bacteria and bacteria-diatom interactions selected for a simplified, but specific, epibiotic microbiota shaped and adapted for long-term associations. Host exudates like polysaccharides, small amino acids, sugars, proteoglycans or glycoproteins,

can be species-specific (Myklestad, 1995) and may govern the kinds of bacteria that associate with a diatom species (Sapp *et al.*, 2007b). The requirement for the evolution of mutualistic relationship between distantly related organisms is constant proximity, such as that seen in diatoms–cyanobacteria associations (Usher *et al.*, 2007). Recognition between partners, therefore, is necessary to maintain such relationship, likely in the form of chemical communication. We hypothesized that the type of algal exudate secretions by the hosts maybe regulating the mutualistic or parasitic relationship between bacteria and diatom hosts. Indeed, algal hosts are quite distinct in their excretions of organic molecules (Myklestad, 1995), and different forms of excretions (e.g., polysaccharides) can be utilized by different bacterial strains (Bruckner *et al.*, 2011).

In the light of our results, adaptation and specificity between bacteria and phytoplankton hosts may have an implication on the ecological structuring of phytoplankton communities in the ocean.

Table 4. Epibiotic bacterial strains isolated from diatom cells in culture and their closest cultivated relative identified by Blastn.

Diatom host	Strain (n*)	Phylum/class	Order	Family	Species	16S rRNA similarity(%)
<i>C. danicus</i> RCC 2565	KC05A (17)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Algimonas ampicilliniresistens</i>	98
	KC39 (2)		<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Sulfitobacter dubius</i>	99.9
	KC25 (11)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Marinobacter sediminum</i>	99.8
	KC36 (1)				<i>Marinobacter lipolyticus</i>	99.8
	KC86 (1)				<i>Boseongicola aestuarii</i>	95.8
<i>T. delicatula</i> RCC2560	KC04 (1)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Erythrobacteraceae</i>	<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i>	97.9
	KC12 (26)				<i>Erythrobacter gaetbuli</i>	98
	KC18 (1)				<i>Erythrobacter citreus</i>	98.3
	KC90 (15)		<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Boseongicola aestuarii</i>	95.8
	KC10 (10)				<i>Paracoccus aminophilus</i>	96.7
	KC17B (1)				<i>Paracoccus stylophorae</i>	97.8
	KC38C (1)				<i>Sulfitobacter dubius</i>	99.9
	KC16 (3)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Marinobacter algicola</i>	99.8
	KC31 (3)				<i>Marinobacter sediminum</i>	100
	KC14 (3)	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp	95
	KC02 (1)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria rosea</i>	99.7
	KC23 (1)				<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99.4
	KC03 (1)				<i>Nocardioideaceae</i> <i>Nocardioides furvisabuli</i>	99.6
KC24 (1)				<i>Dermacoccaceae</i> <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	98.8	

* number of individual diatom cell carrying the corresponding bacterial isolate

Conclusion

Our observations complement previous studies which addressed the existence of algal-specific bacterial communities. The present analysis of the microflora attached to ubiquitous marine diatoms demonstrated conclusively that abundance and community composition of epibiotic bacteria may vary significantly with algal species. The dominance of certain epibiotic bacteria, either common or specific to algal species, together with the simplification of bacterial communities along regular algal subculturing indicate selection of bacteria highly adapted to long-term physical interactions with hosts.

In the context of finding bacteria that could have mutualistic interactions with diatoms, the bacterial strains we repeatedly isolated from cultures and environmental cells represent good candidates. Further co-cultures experiments with axenic cultures of *T. delicatula* RCC 2560 and *C. danicus* RCC 2565 evaluating the effect of the microbiota on the native or the foreign host could help us to determine the functional role of specific isolates.

Acknowledgments

This work was supported by the french national programme EC2CO-Microbien (project MICROMAR) and the MaCuMBA project funded by the European Union's Seventh Framework Programme (grant agreement no 311975). We greatly acknowledge Raffaele Siano and Diana Sarno for their help in the identification of both diatom cultures used in this study. We also thank Geneviève Héry-Arnaud and colleagues (Unité de Bactériologie, CHRU de la Cavale Blanche, Brest, France) for the use of their Microflex LT MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics). Many thanks to Biogenouest sequencing platform at the Station Biologique de Roscoff for help and advices. Camille Poirier and Mathilde Miossec are warmly acknowledged for their help in sequencing. Klervi Crenn received a doctoral grant funded by Région Bretagne and CNRS.

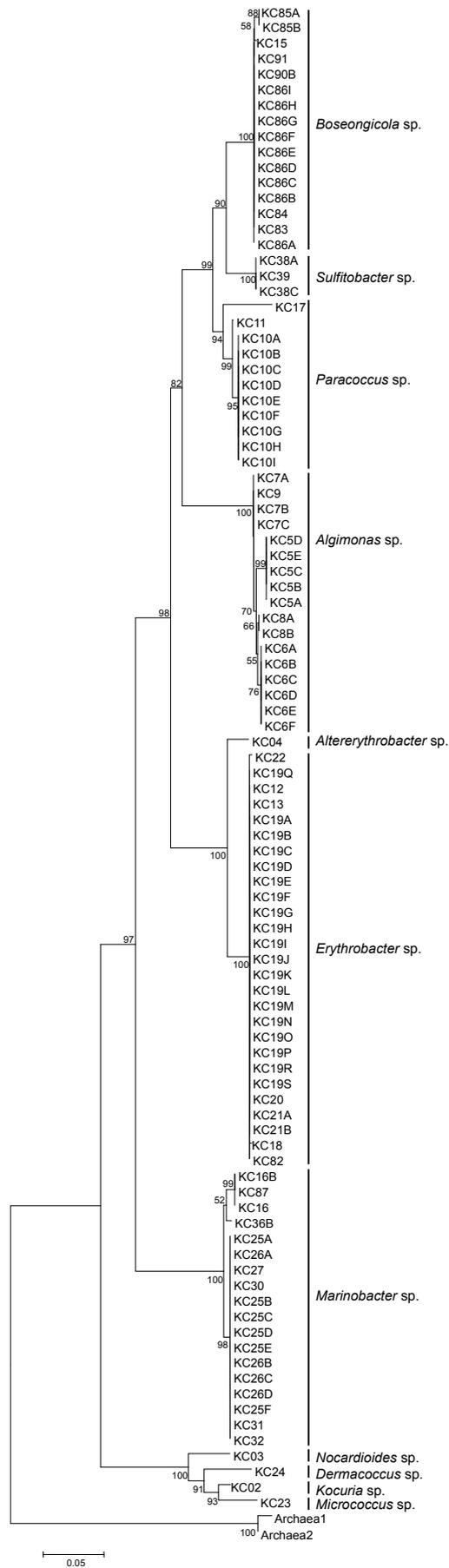
References

- Akagawa-Matsushita, M., Matsuo, M., Koga, Y., and Yamasato, K. (1992). *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 621–627.
- Alavi, M., Miller, T., Erlandson, K., Schneider, R., and Belas, R. (2001). Bacterial community associated with *Pfesteria*-like dinoflagellate cultures. *Environ. Microbiol.* 3, 380–396.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Amin, S. A., Green, D. H., Hart, M. C., Küpper, F. C., Sunda, W. G., and Carrano, C. J. (2009). Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17071–17076. doi:10.1073/pnas.0905512106.
- Amin, S. A., Hmelo, L. R., van Tol, H. M., Durham, B. P., Carlson, L. T., Heal, K. R., et al. (2015). Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature* 522, 98–101. doi:10.1038/nature14488.
- Amin, S. A., Parker, M. S., and Armbrust, E. V (2012). Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 667–684. doi:10.1128/MMBR.00007-12.
- Armbrust, E. V. (2009). The life of diatoms in the world’s oceans. *Nature* 459, 185–192. doi:10.1038/nature08057.
- Armbrust, E. V., Berges, J. a, Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., et al. (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306, 79–86. doi:10.1126/science.1101156.
- Azam, F., and Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 782–791. doi:10.1038/nrmicro1798.
- Baker, L., and Kemp, P. (2014). Exploring bacteria–diatom associations using single-cell whole genome amplification. *Aquat. Microb. Ecol.* 72, 73–88. doi:10.3354/ame01686.
- Bell, W., and Mitchell, R. (1972). Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol. Bull.* 143, 265–277.
- Bolch, C. J. S., Subramanian, T. A., and Green, D. H. (2011). The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (*Dinophyceae*) requires marine bacteria for growth. *J. Phycol.* 47, 1009–1022. doi:10.1111/j.1529-8817.2011.01043.x.
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., et al. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456, 239–244. doi:10.1038/nature07410.
- Bruckner, C. G., Rehm, C., Grossart, H. P., and Kroth, P. G. (2011). Growth and release of extracellular organic compounds by benthic diatoms depend on interactions with bacteria. *Environ. Microbiol.* 13, 1052–1063. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02411.x.
- Chelius, M. K., and Triplett, E. W. (2001). The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb. Ecol.* 41, 252–263. doi:10.1007/s002480000087.
- Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J.-B., et al. (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Res.* 2, 212–222. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2013.05.003.
- Cole, J. J. (1982). Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13, 291–314.
- Cooper, M. B., and Smith, A. G. (2015). Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26, 147–153. doi:10.1016/j.pbi.2015.07.003.
- Cruz-López, R., and Maske, H. (2016). The vitamin B1 and B12 required by the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* can be provided by its associated bacterial community in culture. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00560.
- Droop, M. R., and Elson, K. G. R. (1966). Are pelagic diatoms free from bacteria? *Nature* 211, 1096–1097. doi:doi:10.1038/2111096a0.

- Egan, S., James, S., Holmstro, C., Holmström, C., and Kjelleberg, S. (2001). Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 67–73. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00789.x.
- Egan, S., Thomas, T., Holmström, C., and Kjelleberg, S. (2000). Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environ. Microbiol.* 2, 343–347. doi:10.1046/j.1462-2920.2000.00107.x.
- Falkowski, P. G., Fenchel, T., and Delong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* 320, 1034–1039. doi:10.1126/science.1153213.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., and Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281, 237–240. doi:10.1126/science.281.5374.237.
- Filippidou, S., Jaussi, M., Junier, T., Wunderlin, T., Jeanneret, N., Regenspurg, S., et al. (2015). Genome sequence of *Aeribacillus pallidus* strain GS3372, an endospore-forming bacterium isolated in a deep geothermal reservoir. *Genome Announc.* 3, e00981–15. doi:10.1128/genomeA.00981-15. Copyright.
- Garcés, E., Vila, M., Reñé, A., Alonso-Sáez, L., Anglès, S., Lugliè, A., et al. (2007). Natural bacterioplankton assemblage composition during blooms of *Alexandrium* spp. (*Dinophyceae*) in NW Mediterranean coastal waters. *Aquat. Microb. Ecol.* 46, 55–70. doi:10.3354/ame046055.
- Gärdes, A., Iversen, M. H., Grossart, H. P., Passow, U., and Ullrich, M. S. (2011). Diatom-associated bacteria are required for aggregation of *Thalassiosira weissflogii*. *ISME J.* 5, 436–445. doi:10.1038/ismej.2010.145.
- Ghyselinck, J., Van Hoorde, K., Hoste, B., Heylen, K., and De Vos, P. (2011). Evaluation of MALDI-TOF MS as a tool for high-throughput dereplication. *J. Microbiol. Methods* 86, 327–336. doi:10.1016/j.mimet.2011.06.004.
- Ghyselinck, J., Pfeiffer, S., Heylen, K., Sessitsch, A., and De Vos, P. (2013). The effect of primer choice and short read sequences on the outcome of 16S rRNA gene based diversity studies. *PLoS One* 8, e71360. doi:10.1371/journal.pone.0071360.
- Green, D. H., Echavarrri-bravo, V., Brennan, D., and Hart, M. C. (2015). Bacterial diversity associated with the coccolithophorid algae *Emiliania huxleyi* and *Coccolithus pelagicus* f. *braarudii*. *Biomed Res. Int.* 2015, 194540. doi:10.1155/2015/194540#sthash.ARS0TxZc.dpuf.
- Green, D. H., Llewellyn, L. E., Negri, A. P., Blackburn, S. I., and Bolch, C. J. S. (2004). Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 345–357. doi:10.1016/S0168-6496(03)00298-8.
- Grossart, H. P. (1999). Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquat. Microb. Ecol.* 19, 1–11. doi:10.3354/ame019001.
- Grossart, H. P., Czub, G., and Simon, M. (2006). Algae-bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. *Environ. Microbiol.* 8, 1074–1084. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.00999.x.
- Grossart, H. P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2005). Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ. Microbiol.* 7, 860–873. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00759.x.
- Grossart, H. P., and Simon, M. (2007). Interactions of planktonic algae and bacteria: Effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquat. Microb. Ecol.* 47, 163–176. doi:10.3354/ame047163.
- Guannel, M. L., Horner-Devine, M. C., and Rocap, G. (2011). Bacterial community composition differs with species and toxigenicity of the diatom *Pseudo-nitzschia*. *Aquat. Microb. Ecol.* 64, 117–133. doi:10.3354/ame01513.
- Guilloux, L., Rigaut-Jalabert, F., Jouenne, F., Ristori, S., Viprey, M., Not, F., et al. (2013). An annotated checklist of Marine Phytoplankton taxa at the SOMLIT-Astan time series off Roscoff (Western English Channel, France): data collected from 2000 to 2010. *Cah. Biol. Mar.* 54, 247–256.

- Hamady, M., Lozupone, C., and Knight, R. (2010). Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J.* 4, 17–27. doi:10.1038/ismej.2009.97.
- Hasle, G. R., and Syvertsen, E. (1996). "Marine diatoms," in *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*, ed. C. R. Tomas (San Diego, USA: Academic Press, Inc.), 5–385.
- Humily, F., Farrant, G. K., Marie, D., Partensky, F., Mazard, S., Perennou, M., et al. (2014). Development of a targeted metagenomic approach to study a genomic region involved in light harvesting in marine *Synechococcus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88, 231–249. doi:10.1111/1574-6941.12285.
- Jasti, S., Sieracki, M. E., Poulton, N. J., Giewat, M. W., and Rooney-Varga, J. N. (2005). Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* spp. and other phytoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3483–3494. doi:10.1128/AEM.71.7.3483-3494.2005.
- Kaczmarek, I., Ehrman, J. M., Bates, S. S., Green, D. H., Léger, C., and Harris, J. (2005). Diversity and distribution of epibiotic bacteria on *Pseudo-nitzschia* multiseriis (*Bacillariophyceae*) in culture, and comparison with those on diatoms in native seawater. *Harmful Algae* 4, 725–741. doi:10.1016/j.hal.2004.10.001.
- Keller, M. D., Selvin, R. C., Claus, W., and Guillard, R. R. L. (1987). Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* 23, 633–638. doi:10.1016/0198-0254(88)92621-0.
- Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S. A., and Arias, C. R. (2013). Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 483–494. doi:10.1111/1574-6941.12136.
- Leblanc, K., Arístegui, J., Armand, L., Assmy, P., Beker, B., Bode, A., et al. (2012). A global diatom database – abundance, biovolume and biomass in the world ocean. *Earth Syst. Sci. Data* 4, 149–165. doi:10.5194/essdd-5-147-2012.
- Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Bittner, L., et al. (2016). Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E1516–1525. doi:10.1073/pnas.1509523113.
- Martin, A. P. (2002). Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3673–3682. doi:10.1128/AEM.68.8.3673.
- Mayali, X., Franks, P. J. S., and Burton, R. S. (2011). Temporal attachment dynamics by distinct bacterial taxa during a dinoflagellate bloom. *Aquat. Microb. Ecol.* 63, 111–122. doi:10.3354/ame01483.
- Menezes, C. B. A., Bonugli-Santos, R. C., Miqueletto, P. B., Passarini, M. R. Z., Silva, C. H. D., Justo, M. R., et al. (2010). Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiol. Res.* 165, 466–482. doi:10.1016/j.micres.2009.09.005.
- Myklestad, S. M. (1995). Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Sci. Total Environ.* 165, 155–164. doi:10.1016/0048-9697(95)04549-G.
- Nelson, D. M., Tréguer, P., Brzezinski, M. A., Leynaert, A., and Quéguiner, B. (1995). Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem. Cycles* 9, 359–372. doi:10.1029/95GB01070.
- Orsini, L., Sarno, D., Procaccini, G., Poletti, R., Dahlmann, J., and Montresor, M. (2002). Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (*Bacillariophyceae*) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species. *Eur. J. Phycol.* 37, 247–257. doi:10.1017/S0967026202003608.
- Palomo, S., Gonzalez, I., De La Cruz, M., Martin, J., Tormo, J. R., Anderson, M., et al. (2013). Sponge-derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. *Mar. Drugs* 11, 1071–1086. doi:10.3390/md11041071.
- Pathom-aree, W., Stach, J. E. M., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T., and Goodfellow, M. (2006). Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10, 181–189. doi:10.1007/s00792-005-0482-z.
- Rappé, M. S., Connon, S. a, Vergin, K. L., and Giovannoni, S. J. (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418, 630–633. doi:10.1038/nature00917.

- Rooney-Varga, J. N., Giewat, M. W., Savin, M. C., Sood, S., Legresley, M., and Martin, J. L. (2005). Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microb. Ecol.* 49, 163–175. doi:10.1007/s00248-003-1057-0.
- Round, F. E., Crawford, R. M., and Mann, D. G. (1990). *The diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press.
- Sapp, M., Schwaderer, A. S., Wiltshire, K. H., Hoppe, H. G., Gerdt, G., and Wichels, A. (2007). Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? *Microb. Ecol.* 53, 683–699. doi:10.1007/s00248-006-9162-5.
- Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H., and Muyzer, G. (2002). Genetic diversity of “satellite” bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 25–35. doi:10.1016/S0168-6496(02)00298-2.
- Sison-Mangus, M. P., Jiang, S., Tran, K. N., and Kudela, R. M. (2014). Host-specific adaptation governs the interaction of the marine diatom, *Pseudo-nitzschia* and their microbiota. *ISME J.* 8, 63–76. doi:10.1038/ismej.2013.138.
- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., and Yamamoto, S. (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1639–1652.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennke, C. M., et al. (2012). Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Sci. (New York, NY)* 336, 608–611. doi:10.1126/science.1218344.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., and Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 327–338. doi:10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x.
- Usher, K. M., Bergman, B., and Raven, J. A. (2007). Exploring cyanobacterial mutualisms. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 255–273. doi:10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095641.
- Vaqué, D., Duarte, C. M., and Marrasé, C. (1989). Phytoplankton colonization by bacteria: encounter probability as a limiting factor. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 54, 137–140.



Supplementary Figure 1: Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of epibionts isolated from *C. danicus* RCC 2565 and *T. delicatula* RCC 2560 (Table 3). Only bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) of > 40% are shown. Two archaeal sequences were used as outgroups. Bar, 0.05 substitutions per nucleotide position.

CHAPITRE 3

Epibiontes de microalgues, une source de nouveaux taxons bactériens

1. Contexte de l'étude

Une étude récente a analysé les tendances dans la découverte de nouveaux taxons bactériens et archéens (cultivés et incultivés), en se référant à la base de données SILVA REF 114 (Yarza *et al.*, 2014). Cette étude estime que les taux de détection de nouveaux genres et nouvelles espèces de procaryotes par méthodes moléculaires sont en nette diminution (Figure 34) et qu'ils seraient proches de zéro à l'horizon 2015 et 2017, respectivement. Elle en déduit qu'il existerait alors environ 100000 genres et 400000 espèces, avec de très nombreux genres représentés par une seule espèce et de très nombreuses espèces représentées par un seul OTU (operational taxonomic unit). Avec 14800 espèces de procaryotes décrites actuellement qui correspondent à 2600 genres¹⁴, nous sommes très loin d'avoir atteint la diversité bactérienne globale estimée par Yarza *et al.* (2014). En se basant sur ces estimations, 3,7% des espèces et 2,6% des genres procaryotes seulement auraient été cultivés et décrits.

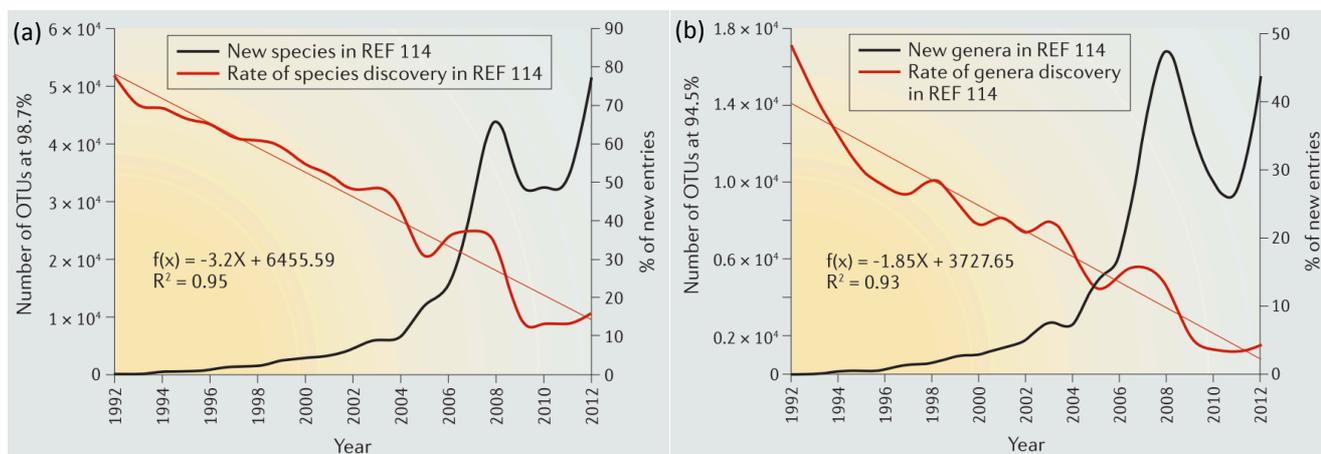


Figure 34 : Evolution de la détection des taxons procaryotes entre 1992 et 2012 dans la base donnée SILVA REF 114 correspondant à des nouvelles espèces (a) et à des nouveaux genres (b), d'après Yarza *et al.*, (2014). Dans cette analyse, les seuils pour décrire les nouvelles espèces et les nouveaux genres sont basés sur un pourcentage d'identité du gène codant pour l'ARNr 16S de 98,7% et 94,5%, respectivement. Ces seuils sont très théoriques et la définition précise du genre ou de l'espèce se base sur un ensemble de critères taxonomiques qui ne peuvent pas être déterminés lors de la seule analyse du gène codant l'ARNr 16S.

¹⁴ Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany, Prokaryotic Nomenclature Up-to-date [Août 2015] (<http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date>)

Pour décrire de nouvelles espèces bactériennes, il est indispensable de pouvoir les cultiver. Afin de cultiver la diversité bactérienne la plus large possible, de plus en plus de stratégies d'isolement et de cultures différentes sont élaborées pour cultiver des microorganismes jusqu'alors considérés comme incultivables (Connon & Giovannoni, 2002; Rappé *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2009; Stingl *et al.*, 2007; Vartoukian *et al.*, 2010). Ce fut le cas notamment des SAR11 et SAR116 qui sont des microorganismes oligotrophes très abondants dans les océans mais qui demeuraient incultivés jusqu'en 2002 et 2007, respectivement (Rappé *et al.*, 2002; Stingl *et al.*, 2007). Ce chapitre s'inscrit dans ce contexte en s'intéressant à la nouveauté taxonomique que peut représenter les différentes souches bactériennes isolées de la surface de microalgues.. Il présente dans un premier temps, une souche bactérienne correspondant à un nouveau genre et dont la description a fait l'objet d'une publication (acceptée dans *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*). Ensuite, il discute de certaines méthodes utilisées en systématique bactérienne pour caractériser une souche qui ont dû être adaptées pour correspondre aux contraintes physiologiques des bactéries à croissance lente. Puis, l'ensemble des taxons bactériens cultivés décrits dans le chapitre précédent et qui peuvent être de potentielles nouvelles espèces ou nouveaux genres bactériens sont présentés. Ce chapitre se termine par une conclusion, sous forme de réponse aux objectifs à atteindre.

2. Etude d'une souche correspondant à un nouveau genre au sein du clade des *Roseobacter*

Lors de ce travail, notre attention s'est portée sur une bactérie à croissance lente isolée de *T. delicatula* RCC 2560 (nommée KC90B^T), dont la séquence codant pour l'ARNr 16S avait une identité 93,8% (1378/1395pb) avec celle de son plus proche voisin cultivé (*Profundibacterium mesophilum* KAUST100406-0324^T ; Lai *et al.*, 2013). Il s'agit d'une bactérie appartenant à la classe des *Alphaproteobacteria*, à l'ordre des *Rhodobacterales*, à la famille des *Rhodobacteraceae* et au clade des *Roseobacter*. Au cours de la thèse, un nouveau genre (*Boseongicola aestuarii* BS-W15^T ; Park *et al.*, 2014) plus proche de KC90B^T (95,8% d'identité du gène codant l'ARNr 16S sur 1395pb) a été décrit. L'analyse phylogénétique (présentée dans la partie 3 de ce chapitre) a permis de démontrer que KC90B^T était un genre distinct de *Boseongicola*. Par rapport aux différentes souches présentant un intérêt taxonomique, KC90B^T

correspondait à la deuxième souche cultivée la plus souvent isolées de *T. delicatula* RCC 2560. De plus, elle était relativement facile à cultiver (malgré une croissance lente), ce qui est une caractéristique appréciable pour les analyses physiologiques tels que les tests de résistance aux antibiotiques. Enfin, il s'agissait d'une souche issue de microalgue cultivée pour laquelle on connaissait l'identité. Sur la base de ces différents éléments, nous avons donc entrepris la caractérisation complète de ce nouveau genre bactérien. A l'issue de ce travail de description, le nom *Silicimonas algicola* sp. nov. gen. nov. a été proposé pour la souche KC90B^T.

Le clade des *Roseobacter* comprend près de 70 genres d'après une récente étude (Pujalte *et al.*, 2014), mais ce chiffre est en constante augmentation avec plusieurs nouveaux genres décrits chaque année (Park *et al.*, 2014, 2015; Wang *et al.*, 2016). Le nom de ce clade est lié à la première souche qui y a été décrite *Roseobacter litoralis* (Shiba, 1991). Au cours des années 90's et au début des années 2000, on dénombrait jusqu'à 3 nouveaux genres décrits chaque année dans ce clade. Avec l'évolution des techniques liées à la microbiologie et en particulier à la microbiologie marine (nouvelles méthodes d'isolement et de culture, banalisation des techniques de biologie moléculaire permettant la classification en routine des nouveaux taxons bactériens, etc.) ce nombre a fortement progressé avec 3 à 12 nouveaux genres décrits chaque année depuis 2004 (Figure 35).

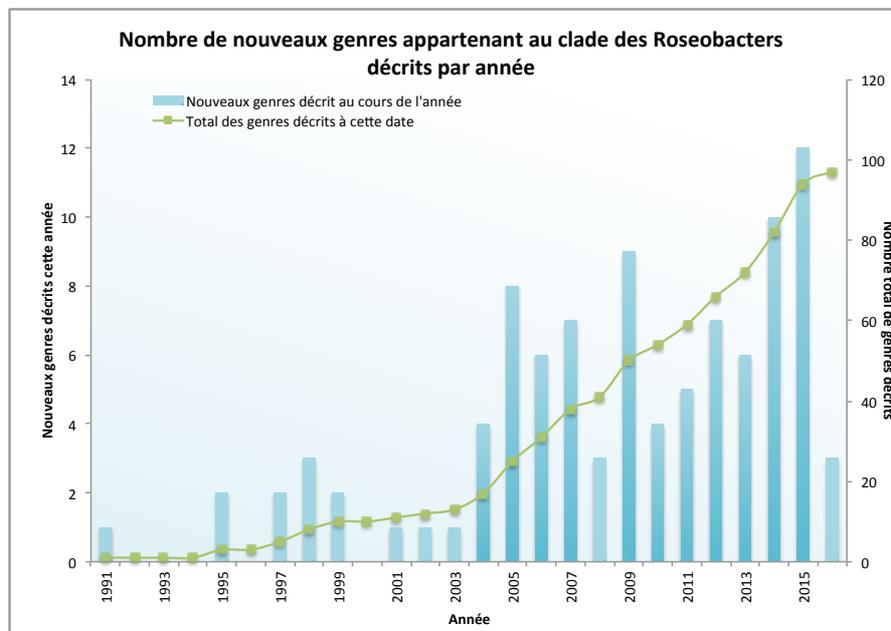


Figure 35 : Evolution du nombre de nouveaux genres bactériens affiliés au clade des *Roseobacter* dans la famille des *Rhodobacteraceae* entre 1991 et 2016

3. Article

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

NEW TAXA - Proteobacteria

Silicimonas algicola gen. nov., sp. nov., a novel member of the *Roseobacter* clade isolated from the cell surface of the marine diatom *Thalassiosira delicatula*

Klervi Crenn^{1,2}, Delphine Serpin^{1,2}, Cendrella Lepleux³, Jörg Overmann³ and Christian Jeanthon^{1,2}

¹CNRS, Station Biologique de Roscoff, Adaptation and Diversité en Milieu Marin, Marine Phototrophic Prokaryotes Team, Roscoff, France.

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Station Biologique de Roscoff, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Oceanic Plankton Group, Roscoff, France.

³Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

Running title: *Silicimonas algicola* gen. nov., sp. nov.

Correspondence: C. Jeanthon, UMR 7144, Station Biologique, Place Georges Teissier, CS90074, 29688 Roscoff cedex, France; Phone : + 33 298 292 563 ; Fax : + 33 298 292 324 ; E-mail: jeanthon@sb-roscoff.fr

Key words: *Silicimonas algicola*, *Roseobacter* clade, algal-bacterial interactions, *Thalassiosira*.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA gene sequence of strain KC90^T is KU926270.

Abstract

A Gram-negative, aerobic, non-motile bacterium, designated strain KC90B^T, was isolated from the surface of a cell of the marine diatom *Thalassiosira delicatula*. The bacterial cells were pleomorphic and formed very small beige colonies on marine agar. Optimal growth was obtained at 25°C, at pH 6.5-7.5 and in the presence of 1.5-2.0% (w/v) NaCl. Phylogenetic analyses based on its 16S rRNA gene sequence revealed that strain KC90B^T belonged to the *Roseobacter* clade and formed a monophyletic cluster with the sequences of *Boseongicola aestuarii*, *Profundibacterium mesophilum*, *Hwanghaeicola aestuarii*, *Maribius pelagius* and *M. salinus*, showing 91.4-95.7% sequence similarities. Ubiquinone Q-10 was the predominant lipoquinone but a significant amount of ubiquinone Q-9 was also detected. The major cellular fatty acids were C_{18:1} ω7c, 11-methyl C_{18:1} ω7c and C_{18:0}. Strain KC90B^T also contained specific fatty acid (C_{17:0}, anteiso C_{15:0} and anteiso C_{17:0}) that were not detected in its closest described relatives. The major polar lipids of strain KC90B^T comprised phosphatidylglycerol, phosphatidylcholine, diphosphatidylglycerol and an unidentified aminolipid. The DNA G+C content of strain KC90B^T was 65.2 mol%. The phylogenetic analysis of strain KC90B^T, together with the differential phenotypic and chemotaxonomic properties demonstrate that strain KC90B^T is distinct from type strains of *B. aestuarii*, *P. mesophilum*, *H. aestuarii*, *M. pelagius* and *M. salinus*. Based on the data presented in this study, strain KC90B^T represents a novel genus and species within the family *Rhodobacteraceae*, for which the name *Silicimonas algicola* gen. nov., sp. nov is proposed. The type strain is KC90B^T (=DSM XXXX^T=RCC 4681^T).

Alphaproteobacteria are the most abundant heterotrophic bacteria found in marine pelagic environments (Zinger *et al.*, 2011) with a high contribution of the *Roseobacter* clade (family *Rhodobacteraceae*) (Buchan *et al.*, 2005; Luo & Moran, 2014). Members of the *Roseobacter* clade are often dominant in natural assemblages with marine algae and have been shown to increase in abundance during phytoplankton blooms (Amin *et al.*, 2012; Buchan *et al.*, 2014; Gonzalez *et al.*, 2000; Mayali *et al.*, 2008; Zubkov *et al.*, 2001). They also are often found in laboratory cultures of marine phytoplankton (Alavi *et al.*, 2001; Amin *et al.*, 2012; Grossart *et al.*, 2005; Jasti *et al.*, 2005) and both mutualistic (Geng & Belas, 2010; Wagner-Döbler *et al.*, 2010) and pathogenic (Boettcher *et al.*, 2005; Seyedsayamdost *et al.*, 2011b) lifestyles have been suggested. To date, numerous *Roseobacter* genomes have been sequenced, revealing versatile metabolic capabilities that partly explain the success of the clade in marine environments. They gain energy from the oxidation of a multitude of organic compounds, and some members are also capable of phototrophy. Light utilization involving bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) by aerobic anoxygenic phototrophs (Moran *et al.*, 2004; Swingley *et al.*, 2007; Wagner-Döbler *et al.*, 2010) and based on rhodopsins (Newton *et al.*, 2010; Voget *et al.*, 2015) is found in phylogenetically diverse strains. Recently, Pujalte *et al.* (2014) divided the *Roseobacter* clade into 68 genera that correspond to 164 species but new genera and species have been described afterwards, including the genera *Boseongicola* (Park *et al.*, 2014), *Pseudoseohaericola* (Park *et al.*, 2015), and *Xuhuaishuia* (Wang *et al.*, 2016). However, many other *Roseobacter* lineages do not have cultivated members.

In a study investigating the specificity of bacteria attached to marine diatom cells in laboratory cultures, we isolated bacteria attached to the cell walls of *Thalassiosira delicatula* RCC 2560 (Roscoff Culture Collection, France). This microalgal culture isolated from surface water at the coastal long-term monitoring station SOMLIT-Astan site (48°45' N, 3°57' W, north off Roscoff, Western English Channel) is maintained in the RCC since its isolation in January 2011. To isolate attached bacteria, single diatom cells were isolated under sterile conditions in a laminar flow hood. Algal cells were first gently separated by gravity using a 47 mm diameter, 11 µm pore-size nylon filter (Millipore) and washed three times with 50 mL of autoclaved seawater in order to lower the number of free-living bacteria in the algal culture. Single diatom cells were then picked with a sterile glass capillary micropipette and washed 3-4 times with filter-sterilized seawater. Controls were performed for each diatom cell isolated by

checking the absence of bacteria in the last drop of seawater used in the washing series. For cultivation of diatom epibionts, single isolated algal cells and controls were directly transferred in 48-well plates containing low-nutrient heterotrophic medium (LNHM) (Rappé *et al.*, 2002) prepared by dissolving 35 g.l⁻¹ of commercial sea salts (Red Sea Europe) instead of using natural seawater. Bacterial cultures were incubated at 19°C for 3 to 4 weeks and growth was analysed by flow cytometry using a BD Accuri C6 cytometer (BD Biosciences). Cultures that contained bacteria were streaked on LNHM agar for purification at least two times. Strain KC90B^T was one of the resulting isolates. Strain KC90B^T was further cultivated routinely in modified Marine Agar (1:10; 0.5 g peptone, 0.1 g yeast extract, 35 g sea salts dissolved in 1 l of Milli-Q water and 15 g agar) and in modified Marine Broth (MB) (1:2; 2.5 g peptone, 0.5 g yeast extract, 35 g sea salts dissolved in 1 l of Milli-Q water). The bacterial culture was then stored at -80 °C in the presence of 7.5% (v/v) DMSO.

Phenotypic characteristics of strain KC90B^T including growth, physiological and biochemical properties were tested as follows. Cell morphology and motility were examined using phase-contrast light microscopy (BX51; Olympus) and transmission electron microscopy (TEM) (JEM-1400, JEOL). TEM was performed after negative staining of cells with 2% uranyl acetate on Formvar-carbon-coated 400 mesh *copper grids*. Gram staining was performed according to (Smibert & Krieg, 1994). Growth at various temperatures (4-45 °C) and pH (4.5-10.5) were determined in MB (1:2). Media used to determine pH range for growth were adjusted using the following buffers: CH₃COONa 2M/acetic acid 2M for pH 4.5 to 5.5, Na₂HPO₄ 2M/NaH₂PO₄ 2M for pH 6 to 8.5 and Na₂CO₃ 1M/NaHCO₃ 1M for pH 9 to 10.5. The media were sterilized by filtration using 0.1µm pore size PES membrane filter units (Nalgene™ Rapid-Flow™). The requirement and tolerance to NaCl was tested in MB (1:2) using increasing concentrations of NaCl from 0 to 3 % (w/v) in increments of 0.5% and from 3 to 8 % in increments of 1%. Bacterial growth was assessed by flow cytometry. For flow cytometry, 100 µl cultures were fixed with glutaraldehyde (0.25%, final concentration) and stained with Sybr Green (Life Technologies). Susceptibility to antibiotics was evaluated by spreading a bacterial suspension (200 µl) with a turbidity of 1-2 McFarland on MA (1:2) plates using susceptibility disks (bioMérieux) containing ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), penicillin G (10 IU), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg), nalidixic acid (30 µg), rifampicin (5 µg), erythromycin (15 µg) and neomycin (30 µg). Enzyme activities were determined after incubation at optimal growth temperature for 4 days, by using the API

ZYM system (bioMérieux). Assimilation tests were performed using the API 20 NE and API 50 CH systems incubated at optimal growth temperature for 15 days. Catalase and oxidase activities were determined as described by Smibert & Krieg (1994).

Genomic DNA was extracted using lysis and neutralization buffers prepared as described in Humily *et al.* (2014). Briefly, after addition of 0.5 µl of lysis buffer, the mixture was incubated at 4°C for 10 min in a thermocycler. The lysate was further incubated at 95°C for 1 min, cooled at 4°C before adding 0.5 µL of neutralization buffer, and kept 3 min on ice until amplification by PCR. The 16S rRNA gene of KC90B^T was amplified using the primers 8F and 1492R (Turner *et al.*, 1999). The reaction mixture (12.5µL) contained 1µL of cell lysate, 0.1 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1X Green GoTaq Flexi Buffer, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer, and 0.75 U of GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (Promega). Conditions for PCR were as follows: 95°C for 10 min followed by 35 cycles (95°C for 30 s, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min), and a final extension step for 10 min at 72°C. Sequencing was carried out using an Applied Biosystem 3100 automated DNA sequencer (Biogenouest platform, Station Biologique de Roscoff). The resulting 16S rRNA gene sequence (1395 nt) was compared by BLASTn with sequences available in GenBank. Phylogenetic analysis was performed using the neighbor joining, maximum parsimony and maximum likelihood inference approaches implemented in MEGA6 software (Tamura *et al.*, 2013). To amplify partial sequences of the *pufM* gene, coding for of the M subunit of the photosynthetic reaction centre, the PufMF forward (5'-TACGSAACCTGTWCTAC-3', Béjà *et al.*, 2002) and Puf-WAW reverse primers (5'-AYNGCRAACCACCANGCCCA-3', Yutin *et al.*, 2005) were used according to Lehours *et al.* (2010). For proteorhodopsin detection, the set of degenerated primers PR-1aF (5'-GATCGAGCGNTAYRTHGAYTGG-3') and PR-1aR (5'-GATCGAGCRTADATNGCCCANCC-3') was employed using conditions described by Campbell *et al.* (2008).

For genome analyses, genomic DNA was isolated from 500 mg harvested cells grown in MB (1:2) at 20°C after 15 days. The genome size and DNA G+C content were directly calculated from the complete genome sequence of the strain KC90B^T. Complete genome sequencing was carried out using the PacBio RSII System (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA) at the Leibniz-Institut DSMZ. This calculation method differs from conventional indirect methods used for the five reference strains [HPLC according to Tamaoka & Komagata (1984) or Mesbah *et al.* (1989)], but calculation of G+C content directly from genome is more accurate (Meier-Kolthoff

et al., 2014) and differences between two methods are between 1.2 and 2% (Mesbah *et al.*, 2011).

Cells (0.2 to 0.5 μm wide and 0.2 to 17 μm long) are Gram-negative, aerobic, non-flagellated and pleomorphic (few coccoids, some ovoids and mainly rod-shaped cells of various lengths) (Supplementary Fig. 1). Colonies on MA are circular, slightly convex, glistening, beige and 0.3–1 mm in diameter after incubation for 14 days at 25°C. The distinctive morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics of strain KC90B^T are given in the genus and species descriptions (see below) and in Table 1.

Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequence showed that strain KC90B^T formed a distinct lineage within the *Roseobacter* clade in the family *Rhodobacteraceae* of the *Alphaproteobacteria* (Figure 1), the nearest described relatives being *Boseongicola aestuarii* (95.7%), *Maribius pelagius* (94.0%), *M. salinus* (94.0%), *Profundibacterium mesophilum* (93.5%), and *Hwanghaeicola aestuarii* (91.4%). The lineage did not associate significantly with any of the currently described genera in the family. Interestingly, strain KC90B^T shared a higher sequence similarity (96.6%) with the undescribed strain DG981 isolated from a culture of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* GCTRA14, originating from Spring Bay in Tasmania (Green *et al.*, 2004). The branching orders and phylogenetic relationships between strain KC90B^T and DG981-*Boseongicola-Profundibacterium-Maribius-Hwanghaeicola* were well conserved in the phylogenetic trees reconstructed using neighbor-joining, maximum-parsimony and maximum-likelihood algorithms.

The robustness of the phylogenetic relationships and the low sequence similarities between the strains and the other genera demonstrate that the novel isolate represents a new genus in the family *Rhodobacteraceae*.

The estimated genome size, based on genome sequencing data, was approximately 4.4 Mbp. The DNA G+C content of strain KC90B^T was 65.2 mol% as computed from genome sequences. Conclusively, no genes for photosynthetic reaction centre and proteorhodopsin could be detected for KC90B^T using PCR (data not shown).

For fatty acid analysis, cells were grown in liquid Marine broth for 10 days at 25°C. Data taken from the literature were obtained under growth conditions comparable to those used for strain KC90B^T (Park *et al.*, 2014). After harvesting the biomass, cells were extracted according

to the standard protocol (Sasser, 1990) of the Microbial Identification System (MIDI Inc.; version 6.1). The fatty acids were identified by comparison to the TSBA40 peak-naming table database. Strain KC90B^T has straight-chain, methyl- or hydroxy-branched saturated and monounsaturated fatty acids. The major fatty acid (>10% of the total fatty acids) detected in strain KC90B^T was C_{18:1}ω7c (60.04%). The fatty acid profile of the reference strain BS-W15^T showed the same prevalence of the fatty acid C_{18:1}ω7c (Park *et al.*, 2014). However, the fatty acid profile of KC90B^T is distinguishable from BS-W15 due to the difference in fatty acid composition and proportion (Table 2). KC90B^T contains 2 anteiso fatty acids (*anteiso*-C_{15:0} and *anteiso*-C_{17:0}) while BS-W15^T does not have any. In addition, the fatty acid *cyclo*C_{19:0}ω8c (0.9%) and the unknown fatty acid 11.799 (2.8%) were detected in KC90B^T but not in BS-W15^T. Isoprenoid quinones were extracted from dried biomass with chloroform/methanol (2:1, v/v; Collins & Jones, 1981) and analysed via HPLC (Tindall, 1990). A large amount of ubiquinone Q-10 was detected (81.5%) which is typical of the *Alphaproteobacteria* class. In addition, a significant amount of ubiquinone Q-9 (18.4%) was detected. This profile differs from the one of BS-W15^T where ubiquinone Q-10 (predominant), Q-8 (16.0 %) and Q-9 (2.0 %) were detected (Park *et al.*, 2014).

The polar lipid composition of strain KC90B^T was analysed by two-dimensional TLC (modified after Bligh & Dyer, 1959, Tindall *et al.*, 2007). The major polar lipids detected were phosphatidylglycerol, phosphatidylcholine, diphosphatidylglycerol and an unidentified aminolipid (Figure 2). In addition, minor amounts of three unidentified glycolipids, three unidentified phospholipids, one unidentified aminolipid and one unidentified lipid were detected. Compared to closely related genera, the polar lipid profile of strain KC90B^T is quite distinguishable. The strain *Boseongicola aestuarii* BSW15^T, *Profundibacterium mesophilum* JCM 17812^T, *Hwanghaeicola aestuarii* KACC 13705^T, *Maribius pelagius* KCCM 42336^T and *Maribius salinus* KCCM 42113^T do not present any glycolipids except for *H. aestuarii* KACC 13705^T. Except for *M. pelagius* KCCM 42336^T and *M. salinus* KCCM 42113^T, they all present low amounts of aminolipids (Park *et al.*, 2014). The polar lipid profile of strain KC90B^T is also distinguishable from other phylogenetically related genera of the *Roseobacter* clade such as *Marivita*, *Roseovarius* and *Litoreibacter* because of the absence of phosphatidylethanolamine as major component (Hwang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Park & Yoon, 2013).

Strain KC90B^T was differentiated from the type strains *B. aestuarii*, *P. mesophilum*, *H. aestuarii*, *M. pelagius* and *M. salinus* by differences in its phenotypic characteristics, including cell morphology, motility, optimal temperature, salinity and pH for growth, assimilation of some substrates, susceptibility to antibiotics and some enzymatic activities. The phylogenetic and chemotaxonomic analyses and the different tested properties conclusively demonstrated that strain KC90B^T represents a novel genus and species in the *Roseobacter* clade (family *Rhodobacteraceae*, order *Rhodobacterales*), for which the name *Silicimonas algicola* gen. nov., sp. nov. is proposed.

Description of *Silicimonas* gen. nov.

Silicimonas [Si.li.ci.mo'nas L. n. *silex*, silica; L. fem. n. *monas*, a monad, a unit; N.L. fem. n. *Silicimonas*, a monad isolated from silica]

Cells are Gram-negative, aerobic, non-flagellated and pleomorphic (few coccoids, some ovoids and mainly rod-shaped cells of various lengths). Catalase and oxidase positive. Nitrate reduction is negative. The major fatty acid is C_{18:1} ω7c. The predominant ubiquinone is Q-10. The major polar lipids are phosphatidylglycerol, phosphatidylcholine, diphosphatidylglycerol and an unidentified aminolipid. The DNA G+C content of the type strain of the type species is 65.2 mol%. The genus is a member of the class *Alphaproteobacteria*, order *Rhodobacterales*, family *Rhodobacteraceae*. The type, and only species is *Silicimonas algicola*.

Description of *Silicimonas algicola* sp. nov.

Silicimonas algicola (al.gi'co.la. L. fem. n. *alga* alga or seaweed; L. suff. *-cola* from L. n. *incola* an inhabitant or dweller; N. L. fem. n. *algicola* alga dweller)

Cells are 0.2 to 0.5 μm wide and 0.2 to 17 μm long. Colonies on MA are circular, slightly convex, glistening, beige and 0.3–1 mm in diameter after incubation for 14 days at 25°C. Growth occurs within the temperature range of 10–40 °C (optimum 25°C), within pH values of 6 and 9 (optimum 6.5–7.5), and within NaCl concentrations of 0.5–4% (w/v) (optimum 1.5–2%). No growth was obtained at 4°C or 45°C, at pH 5.5 and 9.5, and at NaCl concentrations of 0 and 4.5% (w/v). D-mannose, arbutin, esculine ferric citrate and potassium 2-ketoglutarate are utilized, but not glycerol, erythritol, D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, L-xylose, D-

adonitol, methyl-βD-xylopyranoside, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl-αD-mannopyranoside, methyl-αD-glucopyranoside, N-acetylglucosamine, amygdalin, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose (bovine origin), D-melibiose, D-saccharose, D-trehalose, inulin, D-melezitose, D-raffinose, starch, glycogen, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, potassium gluconate and potassium 5-ketogluconate. According to the API ZYM system, alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β-galactosidase, α-glucosidase and β-glucosidase activities are present, but lipase (C14) is weakly present and cystine arylamidase, trypsin, α-chymotrypsin, α-galactosidase, β-glucuronidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, α-mannosidase and α-fucosidase activities are absent. Susceptible to ampicillin, chloramphenicol, penicillin G, gentamicin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, rifampicin, erythromycin, neomycin, but not to nalidixic acid.

The major fatty acids are C_{18:1} ω7c, 11-methyl C_{18:1} ω7c and C_{18:0}.

The predominant ubiquinone is Q-10.

The major polar lipids are phosphatidylglycerol, phosphatidylcholine, diphosphatidylglycerol and an unidentified aminolipid.

The DNA G+C content of the type strain is 65.2 mol% by whole genome sequencing.

The type strain, KC90B^T (=DSM XXXX^T=RCC 4681^T), was isolated from the silica cell wall of *Thalassiosira delicatula* RCC 2565, a marine diatom originating from Roscoff offshore seawater in the western English Channel.

Acknowledgements

This work was supported by the french national programme EC2CO-Microbien (project MICROMAR) and the MaCuMBA project funded by the European Union's Seventh Framework Programme (grant agreement no 311975). We are grateful to G. Tanguy (Biogenouest sequencing platform-FR2424-Station Biologique de Roscoff) and Sophie Le Panse (Merimage platform-FR2424-Station Biologique de Roscoff) for help with sequencing and transmission electron microscopy, respectively. We also warmly thank the following DSMZ members, Boyke Bunk and Cathrin Spröer for genome sequencing, Gabriele Pötter for analysis of cellular fatty

acids, Susanne Verbag and Brian Tindall for the analysis of polar lipids and respiratory quinones. Klervi Crenn received a doctoral grant funded by Région Bretagne and CNRS.

References

- Alavi, M., Miller, T., Erlandson, K., Schneider, R. & Belas, R. (2001).** Bacterial community associated with *Pfesteria*-like dinoflagellate cultures. *Environ Microbiol* 3, 380–396.
- Amin, S. A., Parker, M. S. & Armbrust, E. V. (2012).** Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 667–684.
- Béjà, O., Suzuki, M. T., Heidelberg, J. F., Nelson, W. C., Preston, C. M., Hamada, T., Eisen, J. A., Fraser, C. M. & DeLong, E. F. (2002).** Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* 415, 630–633.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911–917.
- Boettcher, K. J., Geaghan, K. K., Maloy, A. P. & Barber, B. J. (2005).** *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1531–1537.
- Buchan, A., González, J. M. & Moran, M. A. (2005).** Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl Environ Microbiol* 71, 5665–5677.
- Buchan, A., LeClerc, G. R., Gulvik, C. A. & González, J. M. (2014).** Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Microbiol* 12, 686–698.
- Campbell, B. J., Waidner, L. A., Cottrell, M. T. & Kirchman, D. L. (2008).** Abundant proteorhodopsin genes in the North Atlantic Ocean. *Environ Microbiol* 10, 99–109.
- Choi, D. H., Cho, J. C., Lanoil, B. D., Giovannoni, S. J. & Cho, B. C. (2007).** *Maribius salinus* gen. nov., sp. nov., isolated from a solar saltern and *Maribius pelagius* sp. nov., cultured from the Sargasso Sea, belonging to the *Roseobacter* clade. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 270–275.
- Collins, M. D. & Jones, D. (1981).** Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol Rev* 45, 316–354.
- Geng, H. & Belas, R. (2010).** Molecular mechanisms underlying *Roseobacter*-phytoplankton symbioses. *Curr Opin Biotechnol* 21, 332–338. Elsevier Ltd.
- Gonzalez, J. M., Simo, R., Casamayor, E. O., Pedro, C. & Moran, M. A. (2000).** Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Appl Environ Microbiol* 66, 4237–4246.
- Green, D. H., Llewellyn, L. E., Negri, A. P., Blackburn, S. I. & Bolch, C. J. S. (2004).** Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *FEMS Microbiol Ecol* 47, 345–357.
- Grossart, H. P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M. & Brinkhoff, T. (2005).** Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ Microbiol* 7, 860–873.
- Humily, F., Farrant, G. K., Marie, D., Partensky, F., Mazard, S., Perennou, M., Labadie, K., Aury, J. M., Wincker, P. & other authors. (2014).** Development of a targeted metagenomic approach to study a genomic region involved in light harvesting in marine *Synechococcus*. *FEMS Microbiol Ecol* 88, 231–249.

- Hwang, C. Y., Bae, G. D., Yih, W. & Cho, B. C. (2009).** *Marivita cryptomonadis* gen. nov., sp. nov. and *Marivita litorea* sp. nov., of the family *Rhodobacteraceae*, isolated from marine habitats. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1568–1575.
- Jasti, S., Sieracki, M. E., Poulton, N. J., Giewat, M. W. & Rooney-Varga, J. N. (2005).** Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* spp. and other phytoplankton. *Appl Environ Microbiol* 71, 3483–3494.
- Kim, J. M., Jung, J. Y., Chae, H. B., Park, W. & Jeon, C. O. (2010).** *Hwanghaeicola aestuarii* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a tidal flat of the Yellow Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2877–2881.
- Kim, Y. O., Park, S., Nam, B. H., Kang, S. J., Hur, Y. B., Kim, D. G., Oh, T. K. & Yoon, J. H. (2012).** Description of *Litoreibacter meonggei* sp. nov., isolated from the sea squirt *Halocynthia roretzi*, reclassification of *Thalassobacter arenae* as *Litoreibacter arenae* comb. nov. and emended description of the genus *Litoreibacter* Romanenko et al. 2011. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1825–1831.
- Lai, P. Y., Miao, L., Lee, O. O., Liu, L. L., Zhou, X. J., Xu, Y., Al-Suwailem, A. & Qian, P. Y. (2013).** *Profundibacterium mesophilum* gen. nov., sp. nov., a novel member in the family *Rhodobacteraceae* isolated from deep-sea sediment in the Red Sea, Saudi Arabia. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1007–1012.
- Luo, H. & Moran, M. A. (2014).** Evolutionary ecology of the marine *Roseobacter* clade. *Microbiol Mol Biol Rev* 78, 573–587.
- Mayali, X., Franks, P. J. S. & Azam, F. (2008).** Cultivation and ecosystem role of a marine *Roseobacter* clade-affiliated cluster bacterium. *Appl Environ Microbiol* 74, 2595–2603.
- Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P. & Göker, M. (2014).** Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 352–356.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989).** Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39, 159–167.
- Mesbah, N. M., Whitman, W. B. & Mesbah, M. (2011).** Determination of the G+C content of prokaryotes. In *Taxon Prokaryotes*, pp. 299–324. Edited by F. Rainey & A. Oren. Academic Press.
- Moran, M. A., Buchan, A., González, J. M., Heidelberg, J. F., Whitman, W. B., Kiene, R. P., Henriksen, J. R., King, G. M., Belas, R. & other authors. (2004).** Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature* 432, 910–913.
- Newton, R. J., Griffin, L. E., Bowles, K. M., Meile, C., Gifford, S., Givens, C. E., Howard, E. C., King, E., Oakley, C. A. & other authors. (2010).** Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage. *ISME J* 4, 784–798.
- Park, S., Park, J. M., Lee, K. C., Bae, K. S. & Yoon, J. H. (2014).** *Boseongicola aestuarii* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 2618–2624.
- Park, S., Park, J. M., Kang, C. H., Kim, S. G. & Yoon, J. H. (2015).** *Pseudoseohaecicola caenipelagi* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 1819–1824.
- Park, S. & Yoon, J. H. (2013).** *Roseovarius sediminilitoris* sp. nov., isolated from seashore sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1741–1745.
- Pujalte, M. J., Lucena, T., Ruvira, M. A., Arahal, D. R. & Macian, M. C. (2014).** The family *Rhodobacteraceae*. In *Prokaryotes - Alphaproteobacteria Betaproteobacteria*, pp. 439–512. Edited by E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt & F. Thompson. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Rappé, M. S., Connon, S. a, Vergin, K. L. & Giovannoni, S. J. (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418, 630–633.

Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. In *MIDI Tech Note no 101 Microb ID, Inc, Newark*.

Seyedsayamdost, M. R., Carr, G., Kolter, R. & Clardy, J. (2011). Roseobacticides: Small molecule modulators of an algal-bacterial symbiosis. *J Am Chem Soc* 133, 18343–18349.

Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (1994). Phenotypic characterization. In *Methods Gen Mol Bacteriol*, American S., pp. 607–654. Edited by P. Gerhardt, R. G. EMurray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC.

Swingley, W. D., Sadekar, S., Mastrian, S. D., Matthies, H. J., Hao, J., Ramos, H., Acharya, C. R., Conrad, A. L., Taylor, H. L. & other authors. (2007). The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *J Bacteriol* 189, 683–690.

Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 25, 125–128.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725–2729.

Tindall, B. J. (1990). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Lett* 66, 199–202.

Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (2007). Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In *Methods Gen Mol Microbiol* 3rd edn, pp. 330–393. Edited by C. A. Reddy, T. J. Beveridge, J. A. Breznak, G. Marzluf, T. M. Schmidt & L. R. Snyder. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* 46, 327–338.

Voget, S., Wemheuer, B., Brinkhoff, T., Vollmers, J., Dietrich, S., Giebel, H.-A., Beardsley, C., Sardemann, C., Bakenhus, I. & other authors. (2015). Adaptation of an abundant *Roseobacter* RCA organism to pelagic systems revealed by genomic and transcriptomic analyses. *ISME J* 9, 371–384.

Wagner-Döbler, I., Ballhausen, B., Berger, M., Brinkhoff, T., Buchholz, I., Bunk, B., Cypionka, H., Daniel, R., Drepper, T. & other authors. (2010). The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker’s guide to life in the sea. *ISME J* 4, 61–77.

Wang, L., Liu, Y., Shi, X., Wang, Y., Zheng, Y., Dai, X. & Zhang, X.-H. (2016). *Xuhuaishuia manganoxidans* gen. nov. sp. nov., a manganese-oxidizing bacterium isolated from deep-sea sediment of Pacific polymetallic nodule province. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 1521–1526.

Yutin, N., Suzuki, M. T. & Be, O. (2005). Novel primers reveal wider diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Appl Environ Microbiol* 71, 8958–8962.

Zinger, L., Amaral-Zettler, L. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., Huse, S. M., Welch, D. B. M., Martiny, J. B. H., Sogin, M., Boetius, A. & Ramette, A. (2011). Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS One* 6, e24570.

Zubkov, M. V., Fuchs, B. M., Archer, S. D., Kiene, R. P., Amann, R. & Burkill, P. H. (2001). Linking the composition of bacterioplankton to rapid turnover of dissolved dimethylsulphoniopropionate in an algal bloom in the North Sea. *Environ Microbiol* 3, 304–311.

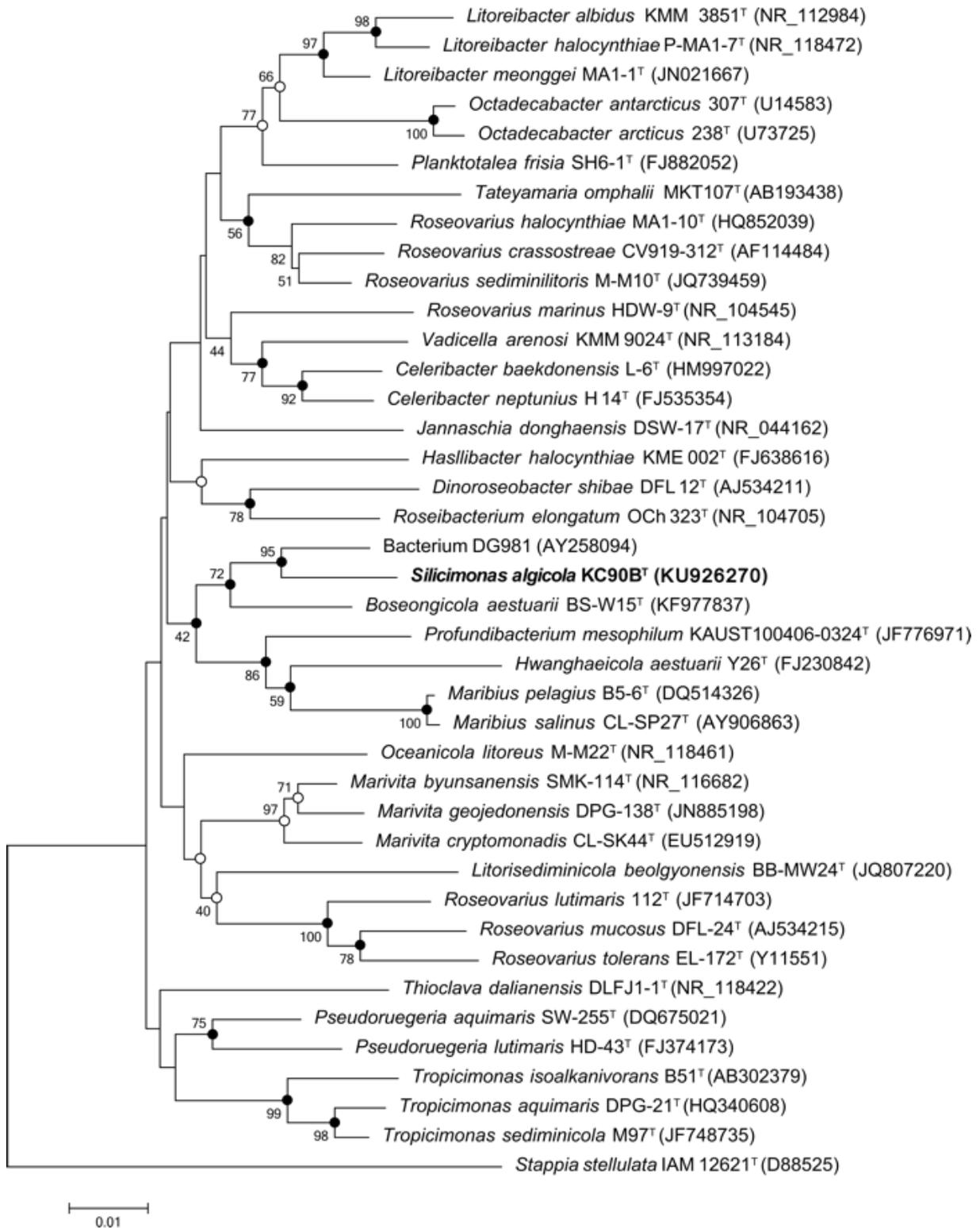


Figure 1. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain KC90B^T and representatives of some related taxa. Only bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) of > 40% are shown. Filled circles indicate that the corresponding nodes were also recovered using the maximum-likelihood and maximum-parsimony algorithms, while open circles indicate that the corresponding nodes were also recovered using the maximum-likelihood method. *Stappia stellulata* IAM 12621^T was used as an outgroup. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

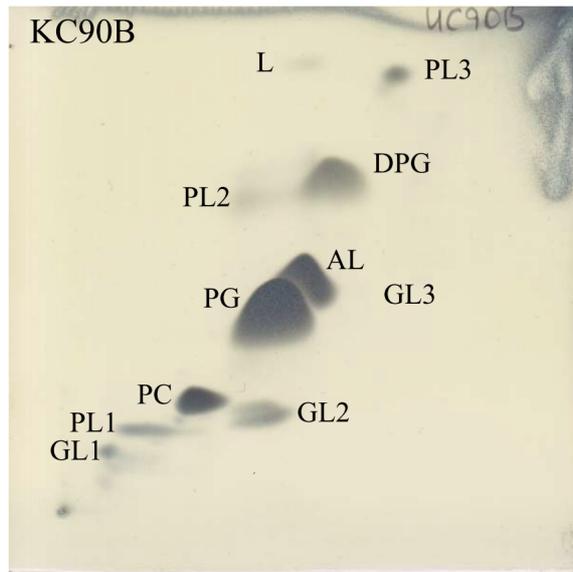
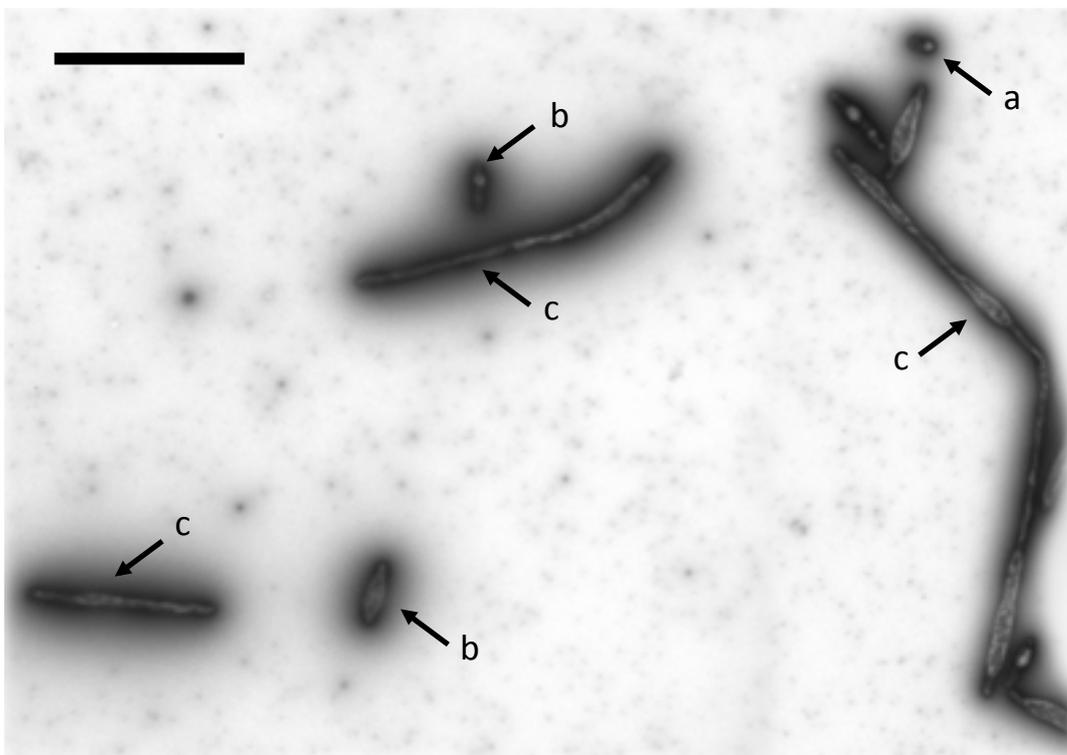


Figure 2. Thin layer chromatograms of polar lipids of strain KC90B^T. GL1-GL3, unidentified glycolipids ; PL1-PL3, unidentified phospholipids; PC, phosphatidylcholine ; PG, phosphatidylglycerol ; AL, unidentified aminolipid ; DPG, diphosphatidylglycerol ; L, unidentified lipid.



Supplementary Figure S1. Transmission electron micrograph showing the pleomorphic forms [coccoid (a), ovoid (b), and rod-shaped (c)] of negatively stained cells of strain KC90B^T after growth for 10 days at 25°C in MB (1:2). Bar, 5 µm.

Table 1. Differential phenotypic characteristics of strain KC90B^T and the type strains of phylogenetically related species. Strains: 1. KC90B^T; 2. *Boseongicola aestuarii* BS-W15^T; 3. *Profundibacterium mesophilum* JCM 17872^T; 4. *Hwanghaeicola aestuarii* KACC 13705^T; 5. *Maribius pelagius* KCCM 42336^T; 6. *Maribius salinus* KCCM 42113^T. Data obtained from this study and from Choi et al. (2007), Kim et al. (2010), Lai et al. (2013) and Park et al. (2014). +, positive reaction; -, negative reaction; w, weakly positive reaction; ND, not determined. All strains are positive for the following enzymatic activities: activity of esterase lipase (C8), leucine arylamidase, oxidase and catalase. All strains are negative for the following activities: acid production from D-melibiose, activity of trypsin, alpha-galactosidase, alpha-mannosidase, alpha-fucosidase, nitrate reduction.

Characteristics	1	2	3	4	5	6
	Culture of <i>Thalassiosira delicatula</i>	Tidal flat sediment at Boseong (South Korea)	Deep-sea sediment (Red Sea)	Tidal flat (Yellow Sea)	Surface water (Sargasso Sea)	Hypersaline water of a solar saltern (Korea)
Cell morphology	Pleomorphic	Pleomorphic	Cocoid	Cocoid	Rod-shaped	Rod-shaped
Motility	-	-	-	+	-	-
Optimal growth temperature (°C)	25	25	20-25	25-30	30-35	30-35
Growth temperature range (°C)	10-40	10-30	15-25	15-35	10-40	10-35
Optimal growth pH	6.5-7.5	7-8	7-8	6.5-7.5	ND	ND
Growth pH range	6-9	6.5-9.5	6-8.5	6-8	6-9	7-8
Optimal growth NaCl (%)	1.5-2	2	2-6	2-3	ND	ND
Growth NaCl range (%)	0.5-4	0.5-5	0.4-24	1.5-6	2-15	1-10
Colony size (mm)	0.3-1	0.4-0.8	0.1-0.3	ND	ND	ND
Colony color	beige	Yellowish-white	transparent	pale pink	beige	beige
Growth time on MA (days)	15	10	10	3-5	15-30	15-30
Assimilation of:						
Glycerol	-	ND	+	ND	+	-
L-arabinose	-	-	-	-	+	w
D-ribose	-	-	-	+	+	-
D-xylose	-	-	+	+	+	+
D-galactose	-	-	+	-	-	-
D-glucose	-	+	+	-	+	-
D-fructose	-	+	-	w	+	+
D-mannose	+	+	-	-	-	-
L-rhamnose	-	+	-	+	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	+
D-mannitol	-	-	-	-	-	+
D-sorbitol	-	-	-	-	-	+
N-acetylglucosamine	-	ND	ND	ND	+	+
D-cellobiose	-	+	-	w	-	+
D-maltose	-	+	-	-	-	-
D-lactose (bovine origin)	-	+	-	-	-	-
D-trehalose	-	+	-	-	-	-
D-raffinose	-	+	-	-	-	+
L-tryptophane	-	ND	-	+	-	-
L-arginine	-	ND	+	ND	+	+
Urea	-	-	-	+	+	+
Gelatin	-	-	-	+	-	-
D-glucose	-	+	-	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	-	+	w
D-mannose	-	+	-	-	-	-
D-mannitol	-	-	-	+	-	-
N-acetylglucosamine	-	ND	ND	-	+	+
D-maltose	-	+	-	-	-	-
Trisodium citrate	-	ND	+	-	+	+
Susceptibility to:						
Ampicillin	+	-	+	-	+	+
Chloramphenicol	+	-	+	+	+	+
Penicillin G	+	-	+	+	+	+
Gentamicin	w	-	+	-	+	+
Kanamycin	+	-	-	-	+	+
Streptomycin	+	-	+	-	+	-
Tetracycline	+	+	-	-	+	+
Nalidixic acid	-	ND	-	ND	-	-
Erythromycin	+	ND	ND	ND	+	+
Neomycin	+	+	+	+	+	+
Enzyme activity (API ZYM):						
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	-	-
Esterase (C4)	+	+	-	+	+	+
Lipase (C14)	w	-	-	w	-	-
Valine arylamidase	+	-	+	w	-	-
Cystine arylamidase	-	-	-	w	-	-
α-chymotrypsin	-	-	-	w	-	-
Acid phosphatase	+	+	+	w	-	-
Naphthol-AS-BI-phosphohdrolase	+	-	+	w	-	-
β-galactosidase	+	-	+	-	+	+
β-glucuronidase	-	-	-	w	-	-
α-glucosidase	+	-	-	-	-	-
β-glucosidase	+	-	-	-	-	-
N-acetyl-β-glucosaminidase	-	-	+	-	-	-
DNA G+C content (mol%)	65.2	58.7	64.0	61.0	66.7	70.0

Table 2. Cellular fatty acid composition (%) of strain KC90B^T and its closest relative BS-W15^T (data from Park *et al.*, 2014).

Fatty acid	KC90B ^T	BS-W15 ^T
Straight- chain		
C _{16:0}	3.6	1.8
C _{17:0}	0.5	-
C _{18:0}	5.9	5.5
Unsaturated		
C _{18:1} ω 7c	60.0	73.1
C _{18:1} ω 9c	1.8	1.7
C _{20:1} ω 7c	-	0.9
Hydroxy		
C _{10:0} 3-OH	2.5	2.2
C _{12:0} 3-OH	0.7	<0.5
Methyl-branched		
<i>anteiso</i> -C _{15:0}	1.3	-
<i>anteiso</i> -C _{17:0}	0.7	-
11-methyl C _{18:1} ω 7c	8.4	12.9
<i>cyclo</i> C _{19:0} ω 8c	0.9	-
Unknown 11.799	2.8	-
Summed features		
3 (C _{16:1} ω 7c / C _{16:1} ω 6c)	0.6	0.8
7(C _{19:1} ω 6c / unknown 18.846 / <i>cyclo</i> -C _{19:1} ω 10c)	0.6	0.7

4. Point technique : adaptation des méthodes classiques de caractérisation pour les souches bactériennes à croissance lente

La caractérisation des souches bactériennes suit des règles précises de systématique, qui évoluent au fur et à mesure des avancées des techniques de laboratoire (Stackebrandt *et al.*, 2002; Tindall *et al.*, 2010; Wayne *et al.*, 1987). Pour parvenir à une validation formelle du statut taxonomique, une description détaillée des caractéristiques de l'organisme doit être réalisée en mettant en évidence les traits qui la distinguent des souches décrites les plus proches. La caractérisation se base généralement sur des méthodes adaptées aux taxons bactériens copiotrophes et à croissance rapide et sont plus difficiles à mettre en place pour les organismes oligotrophes, les organismes à croissance lente ou ceux qui se développent difficilement sur des milieux gélosés. Le paragraphe suivant présente certains des tests qui ont dû être adaptés à un taxon bactérien copiotrophe, mais qui présente une croissance relativement lente (particulièrement sur milieu gélosé).

4.1. Analyse de l'activité enzymatique d'une souche bactérienne à croissance lente

La détermination de l'activité enzymatique fait partie des critères permettant de différencier les taxons bactériens. Le système API ZYM qui est la méthode la plus classiquement employée permet de mesurer un ensemble de 19 enzymes de façon standardisée, simple et rapide. Développée à la fin des années 70's (Humble *et al.*, 1977), la galerie API ZYM est adaptée à l'analyse d'une très large gamme de bactéries (Gruner *et al.*, 1992). Cependant, même si elle est très largement employée, il est tout de même nécessaire d'adapter son utilisation à la souche bactérienne analysée. En effet, le protocole d'utilisation préconise une incubation de culture bactérienne pendant 4h dans les différentes cupules de la galerie, dont le fond est recouvert de substrats synthétiques favorisant les réactions enzymatiques. A l'issue de cette incubation, la présence d'enzyme est révélée par ajout de réactifs. Cependant, ce temps d'incubation est insuffisant pour les bactéries à croissance lente et il est presque impossible d'interpréter les résultats obtenus, tant les colorations développées sont proches du témoin négatif. Dans le cas de la souche KC90B^T, il a fallu augmenter le temps de réaction à 17h, voire 4 jours, pour l'interprétation des résultats devienne évidente (Figure 36). Or, une telle augmentation de la durée d'incubation n'était pas

nécessaire dans les analyses réalisées sur les plus proches souches de référence, en raison de leur croissance plus rapide (Choi *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2013). Park *et al.* (2014) précisait, quant à eux, une incubation de 10h, qui n'aurait pas été suffisante dans notre cas.



Figure 36 : Lecture des galeries API ZYM après (a) 17h et (b) 4 jours d'incubation pour la souche KC90B^T

En conclusion, même pour des tests aussi standardisés que ceux disponibles dans le système API ZYM et qui constituent à priori une méthode simple et rapide, il est parfois nécessaire d'adapter la technique à l'organisme analysé, notamment lorsqu'il s'agit d'une bactérie à croissance lente.

4.2. Analyse de la susceptibilité aux antibiotiques

Un autre critère important pour la caractérisation d'une souche bactérienne est sa susceptibilité aux antibiotiques. Pour réaliser ce test, une culture bactérienne (100µL d'une densité cellulaire de MacFarland 0,5) est généralement étalée sur un milieu gélosé favorable à sa croissance. Plusieurs disques de différents antibiotiques (chaque disque contenant une concentration connue en antibiotique) sont ensuite déposés sur la boîte. En général, 6 à 7 disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose à intervalles réguliers. Pour les souches qui poussent difficilement sur gélose (colonies de très petite taille, croissance lente) et très sensible aux antibiotiques testés, le résultat obtenu est une absence totale de croissance bactérienne. Nous avons obtenu ce résultat lors de la caractérisation de la souche KC90B^T. Il a donc été nécessaire d'augmenter la densité cellulaire de l'inoculum (200µL d'une densité cellulaire de MacFarland 1-2) et de déposer un seul disque d'antibiogramme par boîte de Petri. Le Tableau 7 répertorie les diamètres d'inhibitions observés lors de l'analyse de la susceptibilité aux antibiotiques de *S. algicola* KC90B^T. Ces résultats permettent de mieux comprendre pourquoi aucune croissance n'était observée lors de nos premiers essais où un nombre trop élevé de disques d'antibiotiques inhibant sa croissance avait été déposé sur la même boîte de milieu.

Tableau 7 : Susceptibilité aux antibiotiques de *S. algicola* KC90B^T.

Antibiotique	Diamètre d'inhibition (mm)	Antibiotique	Diamètre d'inhibition (mm)
Ampicilline	22	Rifampicine	50
Chloramphénicol	64	Erythromycine	>70
Pénicilline G	24	Néomycine	56
Gentamicine	6	Tétracycline	14
Kanamycine	46	Acide nalidixique	0
Streptomycine	56		

4.3. Détermination des optimums de croissance

La détermination des paramètres abiotiques optimaux permettant la croissance est essentielle à la caractérisation d'une souche bactérienne. Pour les bactéries marines, trois paramètres abiotiques sont principalement étudiés : la température, la salinité, et le pH. De très nombreuses études utilisent des milieux gélosés pour étudier le comportement d'une souche bactérienne vis-à-vis de ces paramètres. Cependant, cette technique est adaptée aux souches bactériennes présentant une bonne croissance sur gélose. Dans le cas des bactéries à croissance lente sur gélose, il est donc préférable de cultiver en milieu liquide mais aussi de suivre la croissance par cytométrie en flux. La simple mesure d'un trouble de la culture n'est pas un paramètre adapté à ce type de bactérie, car il faut atteindre une densité cellulaire assez importante (en général plus de $5.10E+07$ bactéries/mL) pour qu'un trouble puisse être mesuré au spectrophotomètre, alors qu'une croissance faible peut avoir lieu en-dessous de ce seuil de turbidité (Figure 37).

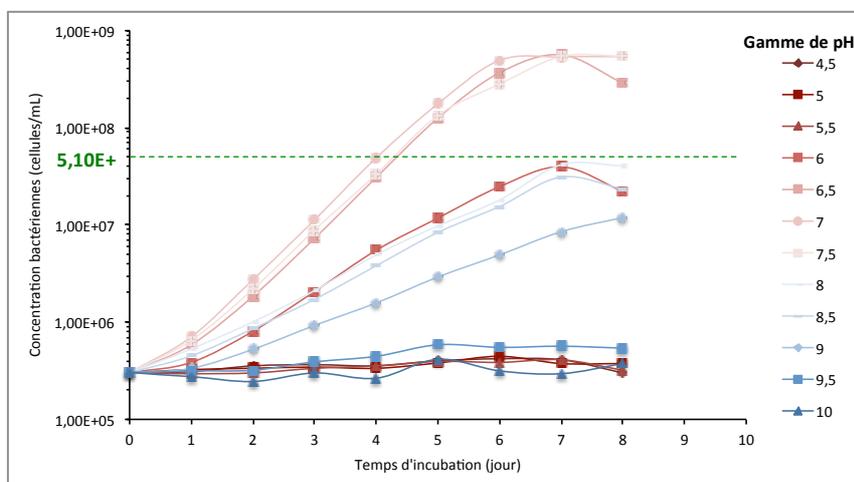


Figure 37 : Suivi de la croissance bactérienne de la souche KC90B^T dans du milieu MB/2 à différents pH (4,5 à 10 par incrémentation de 0,5) par cytométrie en flux. Le seuil à partir duquel un trouble est observé ($5,10E+07$ cellules/mL) est représenté par la ligne en pointillé verte. Aucun trouble n'était observé dans les cultures à pH6 et pH8 à 9, alors qu'une croissance bactérienne était effective d'après les comptages par cytométrie en flux. La souche présente un développement optimal aux pH compris entre 6,5 et 7,5 mais ne se développe pas aux $pH \leq 5,5$ et $pH \geq 9,5$.

5. Autres bactéries épibiontes cultivées présentant un intérêt taxonomique

Comme présenté dans le Tableau 8, un total de 18 souches bactériennes différentes a été isolé de la surface de diatomées en culture (*Chaetoceros danicus* RCC 2565 et *Thalassiosira delicatula* RCC 2560) et 44% d'entre elles pourraient correspondre à des nouvelles espèces sur la base de l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S (identité inférieure à 98,7% pour ce gène entre la souche isolée ici et son plus proche voisin décrit, d'après la règle établie par Stackebrandt & Ebers, 2006). Sur les 44 souches bactériennes différentes isolées de cellules algales prélevées de l'eau de mer au large de Roscoff (*Chaetoceros* spp. et *Thalassiosira* spp.), 59% pourraient être assignées à de nouvelles espèces (Tableau 9).

Tableau 8 : Souches bactériennes isolées de la surface de différentes cellules algales en culture et leur plus proche représentant décrit identifié par Blastn (NCBI). Le pourcentage d'identité du gène codant l'ARNr 16S (ID 16S) entre la souche bactérienne et son plus proche voisin décrit est indiqué ainsi que la longueur de la séquence analysée. Les lignes indiquées en rouge correspondent aux nouvelles espèces sur la base de l'analyse de la similitude de leur séquence 16S (moins de 98,7% d'ID 16S).

Hôte microalgal	Souche*	Taxonomie du plus proche représentant décrit				ID 16S (%)	Longueur (pb)
		Classe	Ordre	Famille	Espèce		
C. danicus RCC 2565	KC05A (n=17)	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae	<i>Algimonas ampicilliniresistens</i>	98,0	1329
	KC39 (n=3)		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Sulfitobacter dubius</i>	99,9	898
	KC25 (n=17)	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	<i>Marinobacter sediminum</i>	99,8	1445
	KC36 (n=1)				<i>M. lipolyticus</i>	99,8	920
T. delicatula RCC 2560	KC04 (n=1)	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	<i>Altererythrobacter ishigakiensis</i>	97,9	853
	KC12 (n=25)				<i>Erythrobacter gaetbuli</i>	98,0	1411
	KC18 (n=1)				<i>E. citreus</i>	98,3	810
	KC90 (n=2)		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Boseongicola aestuarii</i>	95,8	1375
	KC10 (n=10)				<i>Paracoccus aminophilus</i>	96,7	1343
	KC17B (n=1)				<i>P. stylophorae</i>	97,8	684
	KC15 (n=13)				<i>Oceaniovalibus guishaninsula</i>	96,8 à 97,4	663 à 718
	KC16 (n=2)	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	<i>Marinobacter algicola</i>	99,8	1445
	KC31 (n=1)				<i>M. sediminum</i>	100	892
	KC14 (n=3)	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Tenacibaculum</i> sp.	95,0	422
	KC02 (n=1)	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Kocuria rosea</i>	99,7	900
	KC03 (n=1)			Nocardioideaceae	<i>Nocardioides furvisabuli</i>	99,6	836
	KC23 (n=1)			Micrococcaceae	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99,4	899
	KC24 (n=1)			Dermaococcaceae	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i>	98,8	671

* : Pour chaque souche, le nombre d'isolats algaux présentant une souche de même identité est précisé entre parenthèses

Tableau 9 : Souches bactériennes isolées de la surface de différentes cellules algales (prélevées dans l'eau de mer au large de Roscoff) et leur plus proche représentant décrit identifié par Blastn (NCBI). Le pourcentage d'identité du gène codant l'ARNr 16S (ID 16S) entre la souche bactérienne et son plus proche voisin décrit est indiqué ainsi que la longueur de la séquence analysée. Les lignes indiquées en rouge correspondent aux nouvelles espèces sur la base de l'analyse de la similitude de leur séquence 16S (moins de 98,7% d'ID 16S d'après les règles établies par E Stackebrandt & Ebers (2006)).

Hôte microalgal	Souche *	Taxonomie du plus proche représentant décrit				Espèce	ID 16S (%)	Longueur (pb)
		Classe	Ordre	Famille				
In situ <i>Chaetoceros</i> spp.	KC58 (n=2)	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	<i>Hoeflea phototrophica</i>	97,9	698	
	KC43 (n=1)	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	<i>Glaciecola punicea</i>	96	915	
	KC55B (n=4)			Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas undina/marina</i>	99	695	
	KC57 (n=1)				<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	100	919	
	KC61 (n=1)		"Vibrionales"	Vibrionaceae	<i>Photobacterium aquimaris</i>	99,9	920	
	KC46A (n=1)	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	97,7	901	
	KC79A (n=2)	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	99,8	920	
In situ <i>Thalassiosira</i> spp.	KC76 (n=1)	Alphaproteobacteria	Kiloniellales	Kiloniellaceae	<i>Kiloniella laminariae</i>	96,3	918	
	KC56 (n=1)		Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i>	95,3	696	
	KC41B (n=1)			Phyllobacteriaceae	<i>Nitratireductor indicus</i>	95,2	920	
	KC41A (n=1)				<i>Nitratireductor pacificus</i>	95,2	867	
	KC45 (n=1)		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Jannaschia sp.</i>	98	865	
	KC59 (n=1)				<i>Litoreibacter meonggei</i>	97,7	902	
	KC77A (n=2)				<i>Loktanela maricola</i>	99,6	895	
	KC68 (n=1)				<i>Loktanela vestfoldensis</i>	96	885	
	KC75 (n=1)				<i>Nereida ignava</i>	97,3	699	
	KC63A (n=3)				<i>Octadecabacter antarcticus</i>	98,1	897	
	KC47 (n=1)				<i>Roseobacter litoralis</i>	98,8	896	
	KC52A (n=2)				<i>Shimia marina</i>	98,2	895	
	KC42A (n=2)		Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	<i>Altererythrobacter luteolus</i>	97	695	
	KC74 (n=1)				<i>Croceicoccus marinus</i>	97,3	678	
	KC49 (n=1)				<i>Erythrobacter aquimaris</i>	99,6	697	
	KC67 (n=1)			Sphingomonadaceae	<i>Sphingopyxis flavimaris</i>	98,8	918	
	KC60 (n=1)	Cytophagia	Cytophagales	Flammeovirgaceae	<i>Roseivirga ehrenbergii</i>	93,2	905	
	KC65A (n=2)	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Croceitalea eckloniae</i>	97,3	903	
	KC50A (n=2)				<i>Dokdonia genikastrain</i>	99,7	894	
	KC62 (n=1)				<i>Lacinutrix sp.</i>	97,3	899	
	KC44 (n=1)				<i>Lutimonas vermicola</i>	100	906	
	KC51B (n=2)				<i>Maribacter aquivivus</i>	97,7	905	
	KC51A (n=1)				<i>Maribacter forsetii</i>	96	570	
	KC81 (n=1)				<i>Maribacter ulvicola</i>	99,3	906	
	KC73A (n=2)				<i>Olleya namhaensis</i>	97,3	843	
	KC46B (n=3)				<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	97,7	901	
	KC48 (n=1)	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	<i>Aestuariusbacter litoralis</i>	97,8	915	
	KC78 (n=1)				<i>Alteromonas tagae</i>	99	915	
	KC72 (n=1)				<i>Pseudohalialia rubra</i>	98	921	
	KC53A (n=6)			Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas undina/marina</i>	99,9	904	
	KC66 (n=1)			Shewanellaceae	<i>Shewanella japonica</i>	99,3	920	
	KC70 (n=1)			Colwelliaceae	<i>Thalassomonas agariperforans</i>	96,9	908	
	KC64 (n=1)		Chromatiales	Granulosicoccaceae	<i>Granulosicoccus coccoides</i>	96,9	909	
KC80 (n=1)		"Vibrionales"	Vibrionaceae	<i>Vibrio breoganii</i>	100	880		
KC54 (n=1)				<i>Vibrio splendidus</i>	100	919		
KC71 (n=1)		Unclassified Gammaproteobacteria		<i>Chromatococcus halotolerans</i>	97,3	920		
KC69 (n=1)	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Saprospiraceae	<i>Portibacter lacus</i>	91,5	910		
KC79C (n=1)	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	99,8	920		

* : Pour chaque souche, le nombre d'isolats algaux présentant une souche de même identité est précisé entre parenthèses

La phase préliminaire visant à cribler les microalgues cultivées de la RCC pour sélectionner celles présentant le plus fort pourcentage de bactéries attachées à leur surface nous également avait permis d'isoler d'autres souches bactériennes (Tableau 10). Des microalgues autres que celles appartenant aux genres *Chaetoceros* et *Thalassiosira* ont été analysées. Ces bactéries attachées aux diatomées *Pseudo-nitzschia pungens* RCC 3098 et *Skeletonema* sp. RCC 1866 et aux dinoflagellés *Scrippsiella trochoidea* RCC 1627 et *Heterocapsa triquetra* RCC 3596 sont majoritairement à des espèces déjà décrites appartenant au genre *Marinobacter*. Seule la souche KC19 pourrait correspondre à une nouvelle espèce potentielle au sein du genre *Erythrobacter*.

Tableau 10 : Souches bactériennes isolées de la surface de différentes cellules algales en culture (autres que *Thalassiosira delicatula* RCC 2560 et *Chaetoceros danicus* RCC 2565) et leur plus proche représentant décrit identifié par Blastn (NCBI). Le pourcentage d'identité du gène codant l'ARNr 16S (ID 16S) entre la souche bactérienne et son plus proche voisin décrit est indiqué ainsi que la longueur de la séquence analysée. Les lignes indiquées en rouge correspondent aux nouvelles espèces sur la base de l'analyse de la similitude de leur séquence 16S (moins de 98,7% d'ID 16S d'après les règles établies par E Stackebrandt & Ebers (2006)).

Hôte microalgal	Souche bactérienne	Taxonomie du plus proche représentant décrit				ID 16S (%)	Longueur (pb)
		Classe	Ordre	Famille	Espèce		
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i> RCC 3098	KC1A et B	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Maricaulis maris</i>	99,9	1376
	KC29				<i>Marinobacter sediminum</i>	99,8	1475
	KC33A à 33G	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Marinobacter goseongensis</i>	100	864
	KC37				<i>Marinobacter algicola</i>	99,8	943
<i>Skeletonema</i> sp. RCC 1866	KC19 (4 souches)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Erythrobacteraceae</i>	<i>Erythrobacter gaetbuli</i>	98,4	1374
	KC40		<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Sulfitobacter dubius</i>	100	899
	KC28	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Marinobacter sediminum</i>	100	920
	KC36 (12 souches)				<i>Marinobacter lipolyticus</i>	99,8	920
<i>Scrippsiella trochoidea</i> RCC 1627	KC32	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Marinobacter sediminum</i>	100	975
	KC36 (3 souches)				<i>Marinobacter lipolyticus</i>	99,8	920
<i>Heterocapsa triquetra</i> RCC 3596	KC36	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	99,8	920

Certaines bactéries isolées présentent un fort intérêt taxonomique car elles correspondent à des bactéries appartenant à des familles où il n'existe que peu de représentants cultivés et/ou car elles sont relativement éloignées des plus proches bactéries décrites. Par exemple, la souche KC64 appartient à la famille des *Granulosicoccaceae* qui ne comprend que 3 espèces décrites du genre *Granulosicoccus*. En s'intéressant plus particulièrement aux taxons présentant de plus faibles similitudes avec leur voisin décrit (identité du gène codant l'ARNr 16S \leq 95,3%), et en les analysant phylogénétiquement, on constate que certains d'entre eux correspondent à de nouveaux genres.

(1) Les séquences d'ARNr 16S des souches KC41A et KC41B montrent une similitude de 92 à 93% avec celles d'organismes du genre *Cohaesibacter*. Comme l'illustre la Figure 38, les souches KC41A et KC41B appartiennent à un nouveau genre, proche du genre *Cohaesibacter* (famille des *Cohaesibacteraceae*, ordre *Rhizobiales*, classe des *Alphaproteobacteria*). En comparant les séquences nucléotidiques codant l'ARNr 16S, les souches KC41A et KC41B dont les séquences d'ARNr 16S présentent 98,6% de similitude pourraient correspondre à deux espèces différentes.

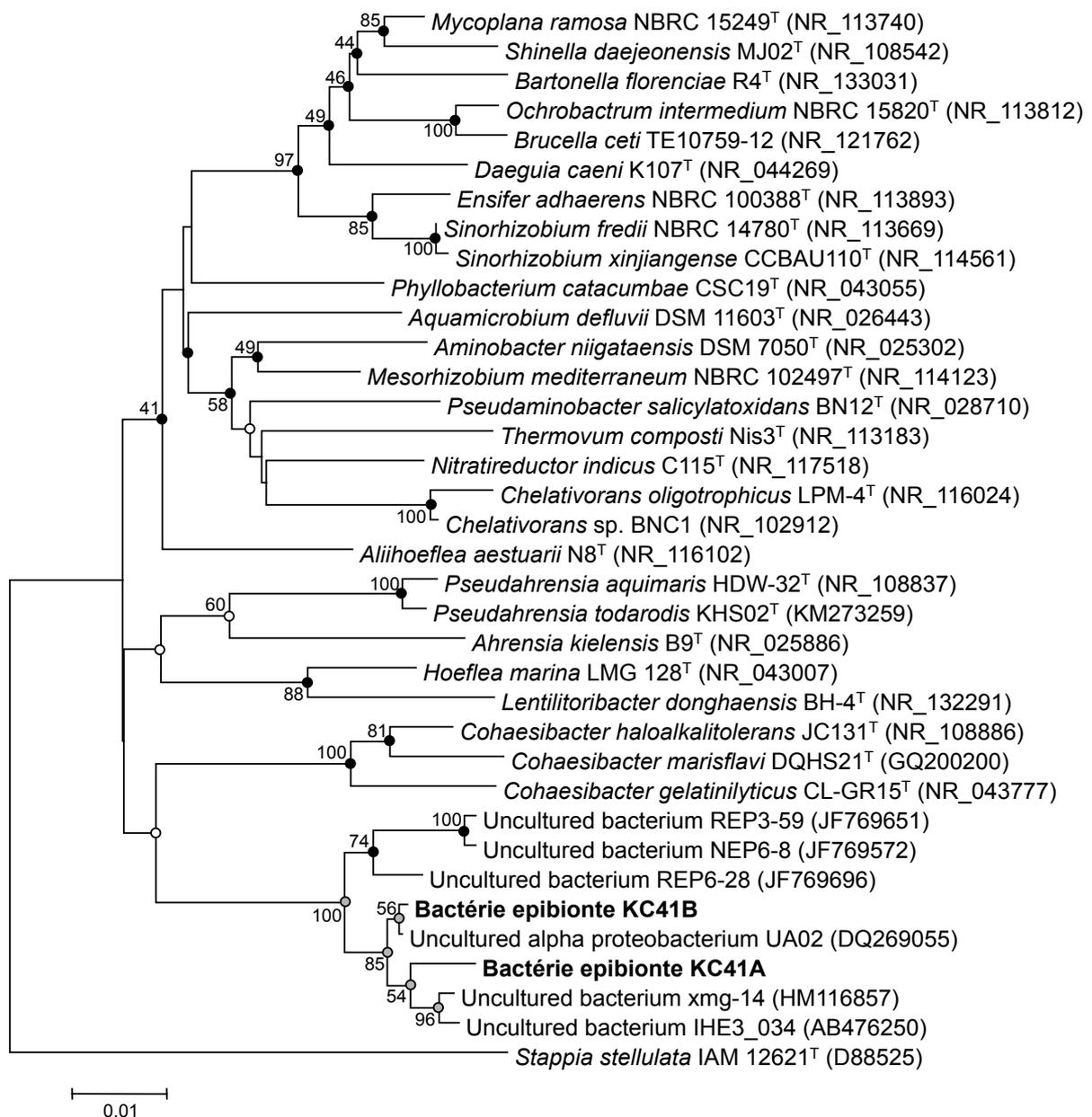


Figure 38 : Arbre phylogénétique réalisé par Neighbour-Joining (NJ), à partir d'un alignement de séquences nucléotidiques codant l'ARNr 16S qui indique la position des souches bactériennes KC41A et KC41B et de proches taxons bactériens. Seules les valeurs de nœuds (exprimées en pourcentages de 1000 répliquions) > 40% sont représentées. Les nœuds marqués d'un cercle ont également été obtenus par les algorithmes Maximum-Likelihood (ML) et/ou Maximum-Parsimony (MP) et correspondent aux couleurs suivantes : blanc (NJ-ML), gris (NJ-MP) et noir (NJ-ML-MP).

(2) L'analyse phylogénétique montre que la souche KC56 appartient à la famille des *Hyphomicrobiaceae* (ordre *Rhizobiales*, classe *Alphaproteobacteria*) (Figure 39). Cependant, sa séquence d'ARNr 16S présente un pourcentage d'identité inférieur à 95,3 % avec ses plus proches voisins. Cette différence mais surtout la position de la souche KC56 permet de déterminer qu'il s'agit d'un nouveau genre bactérien au sein de la famille des *Hyphomicrobiaceae*.

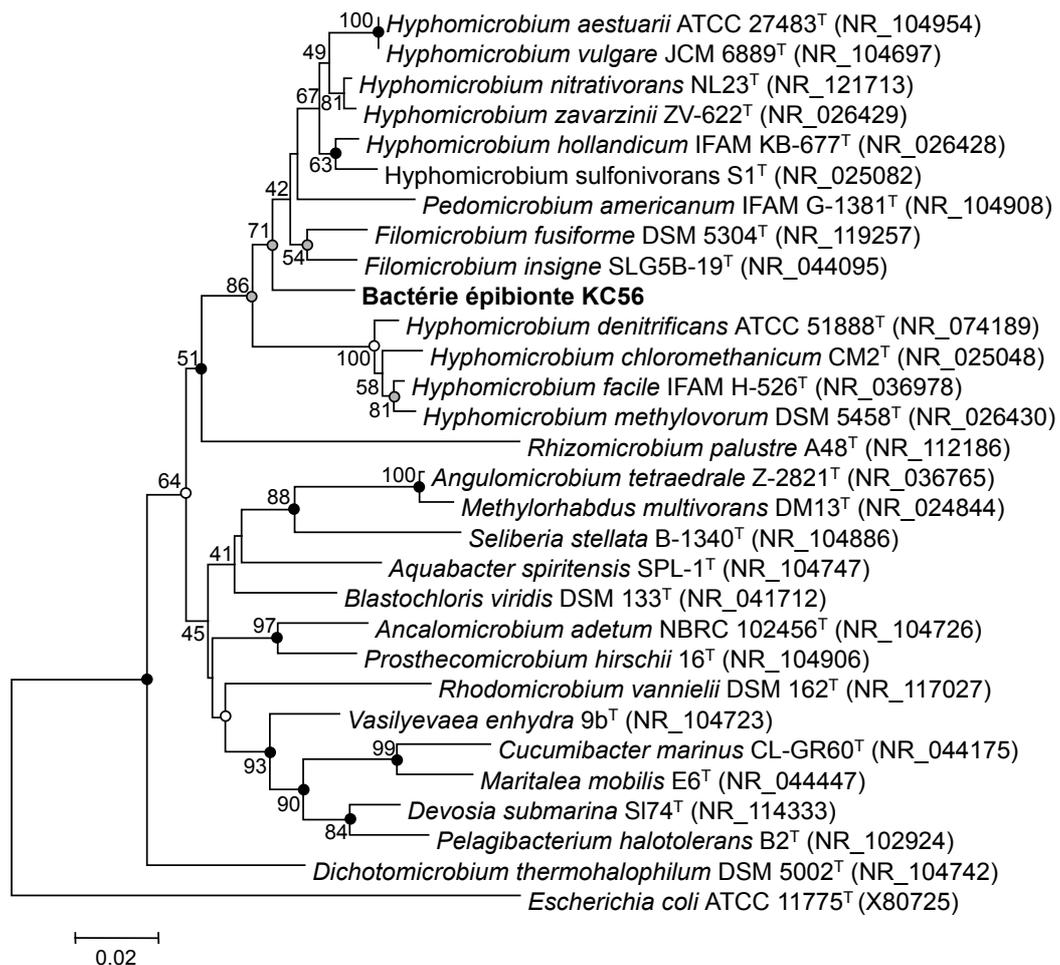


Figure 39 : Arbre phylogénétique réalisé par Neighbour-Joining (NJ), à partir d'un alignement de séquences nucléotidiques codant l'ARNr 16S qui indique la position de la souche bactérienne KC56 et de proches taxons bactériens. Seules les valeurs de nœuds (exprimées en pourcentages de 1000 répliques) > 40% sont représentées. Les nœuds marqués d'un cercle ont également été obtenus par les algorithmes Maximum-Likelihood (ML) et/ou Maximum-Parsimony (MP) et correspondent aux couleurs suivantes : blanc (NJ-ML), gris (NJ-MP) et noir (NJ-ML-MP).

(3) La souche KC60 se positionne parmi des bactéries appartenant à la famille des *Flammeovirgaceae* (ordre *Cytophagales*, classe *Cytophagia*, phylum *Bacteroidetes*) (Figure 40). Ses plus proches voisins appartiennent au genre *Fulvivirga*, mais forment un cluster différent et présentent moins de 92,8% d'identité de la séquence de KC60. Cette analyse permet de définir que la souche KC60 correspondrait à un nouveau genre au sein de la famille des *Flammeovirgaceae*.

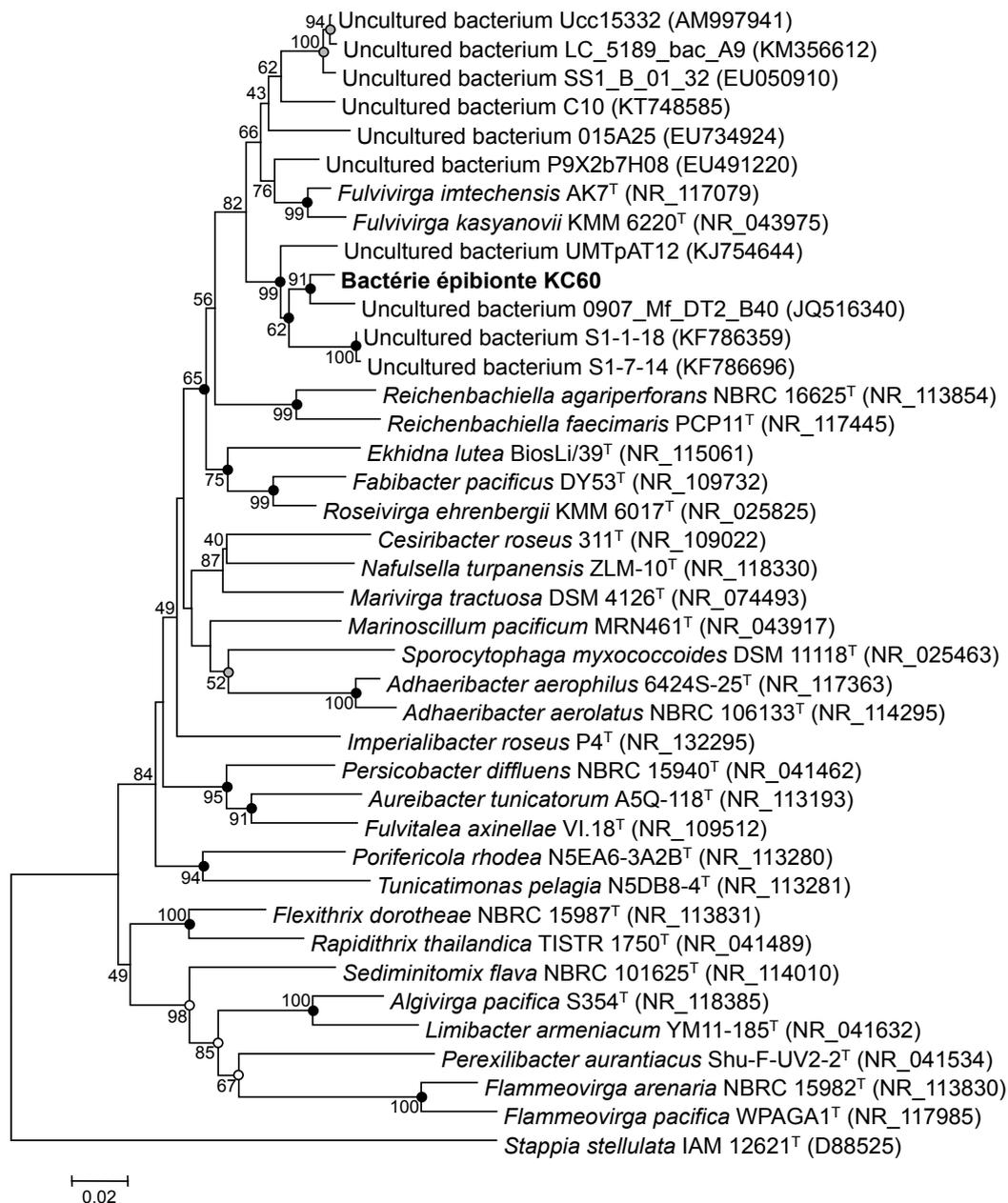


Figure 40 : Arbre phylogénétique réalisé par Neighbour-Joining (NJ), à partir d'un alignement de séquences nucléotidique codant l'ARNr 16S qui indique la position de la souche bactérienne KC60 et de proches taxons bactériens. Seules les valeurs de nœuds (exprimées en pourcentages de 1000 réplifications) > 40% sont représentées. Les nœuds marqués d'un cercle ont également été obtenus par les algorithmes Maximum-Likelihood (ML) et/ou Maximum-Parsimony (MP) et correspondent aux couleurs suivantes : blanc (NJ-ML), gris (NJ-MP) et noir (NJ-ML-MP).

(4) La souche KC69 pourrait, quant à elle, correspondre à un nouveau genre au sein de la famille *Saprospiraceae* (ordre *Sphingobacteriales*, classe *Sphingobacteriia*, phylum *Bacteroidetes*) (Figure 41). Cependant, elle est relativement éloignée de son plus proche voisin décrit, *Portibacter lacus*, avec qui elle ne partage que 91,7% de similitude.

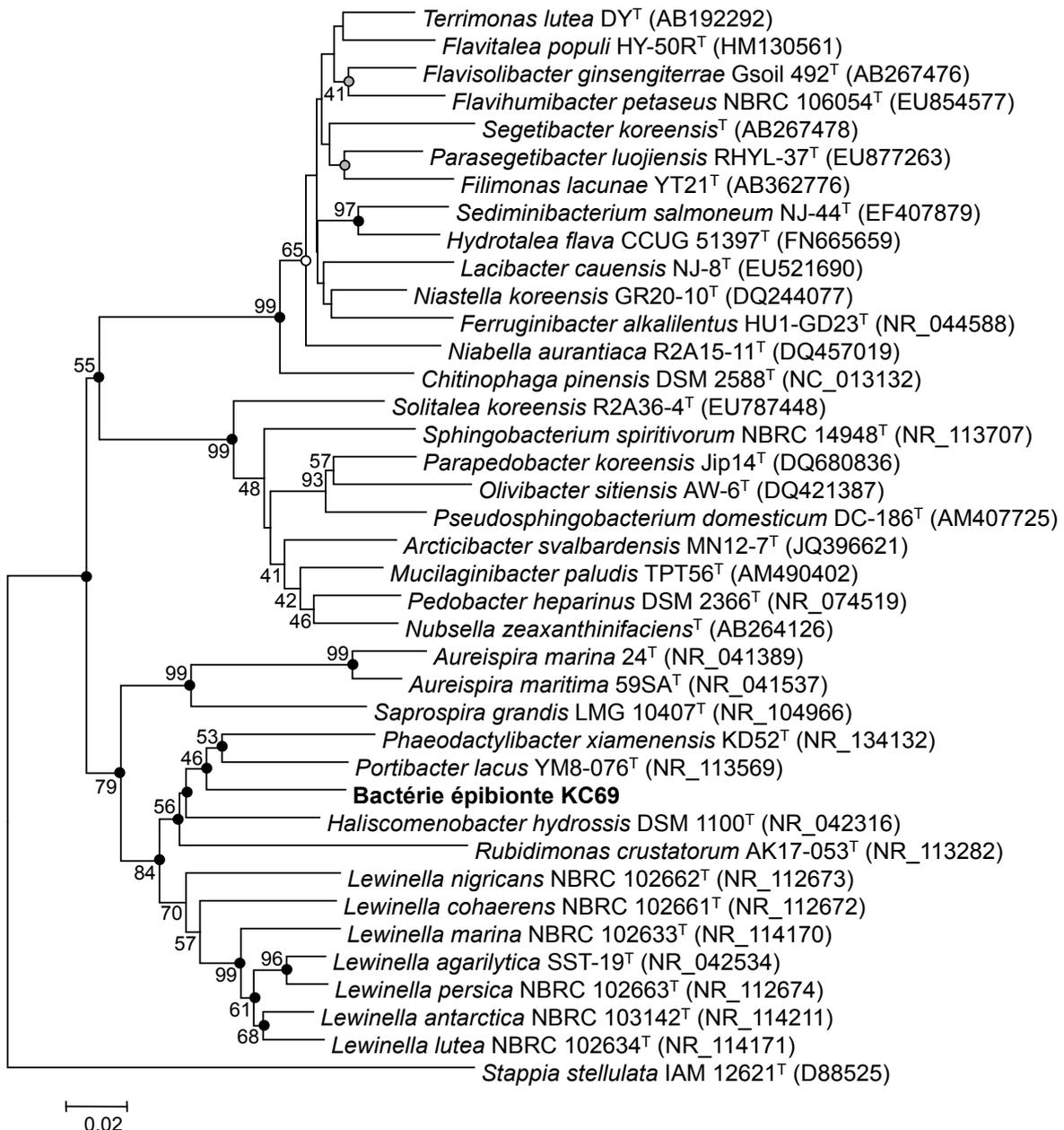


Figure 41 : Arbre phylogénétique réalisé par Neighbour-Joining (NJ), à partir d'un alignement de séquences nucléotidiques codant l'ARNr 16S qui indique la position de la souche bactérienne KC69 et de proches taxons bactériens. Seules les valeurs de noeuds (exprimées en pourcentages de 1000 répliques) > 40% sont représentées. Les noeuds marqués d'un cercle ont également été obtenus par les algorithmes Maximum-Likelihood (ML) et/ou Maximum-Parsimony (MP) et correspondent aux couleurs suivantes : blanc (NJ-ML), gris (NJ-MP) et noir (NJ-ML-MP).

6. Conclusion

L'ensemble de ce chapitre montre que les microalgues - et en particulier leur surface cellulaire – constituent une ressource intéressante pour isoler des nouveaux taxons bactériens. Il semblerait aussi que la combinaison de la méthode d'isolement (micropipetages successifs d'une cellule hôte) et de la stratégie de culture (milieu pauvre LNHM lors de l'isolement puis milieu plus riche pour la purification et le maintien), qui ont été utilisées dans cette étude, soient très prometteuses pour la découverte de nouvelles espèces bactériennes. En effet, près de la moitié des souches de bactéries épibiontes isolées correspondait à une nouvelle espèce., Que ce soit à partir de cultures de microalgues ou de microalgues environnementales, ces résultats montrent qu'il reste encore de très nombreuses espèces bactériennes à caractériser, ce qui est cohérent avec certaines études d'estimation de la diversité bactérienne (Curtis *et al.*, 2002; Dykhuizen, 1998; Yarza *et al.*, 2014) et qui contrecarre les estimations relativement basses privilégiées dans d'autres études (Mora *et al.*, 2011).

Plusieurs éléments peuvent expliquer la forte proportion de bactéries d'intérêt taxonomique. (i) Dans notre étude, seules 78% des cellules algales de *T. delicatula* RCC 2560 et 36% des cellules algales *C. danicus* RCC 2565 portaient des bactéries cultivables (selon nos conditions de culture). A partir des microalgues isolées dans l'environnement, 33% des cellules algales de *Thalassiosira* spp. et 9% des cellules algales *Chaetoceros* spp. possédaient des bactéries cultivables. Et parmi l'ensemble des isolats algaux dotés de bactéries, la majorité d'entre eux ne possédaient qu'un seul taxon bactérien (74% des isolats algaux), certains deux taxons (23%) et au maximum trois taxons (2%). L'ensemble des données issues de l'isolement de bactéries attachées à la surface de cellule algale montre donc la même tendance que les études de Mayali *et al.* (2011) et de Kaczmarska *et al.* (2005), à savoir une faible proportion de microalgues colonisées par des bactéries et que les cellules de microalgues sont colonisées par un faible nombre de bactéries. La forte proportion de nouveaux taxons bactériens est peut être due à ces conditions de culture à partir de très peu de cellules, voire en « single cell », ce qui favorisent la croissance d'un plus grand nombre de bactéries (moins ou pas de compétition pour les nutriments, pas d'effet antagoniste, etc.). Cette technique se rapproche des isolements bactériens par la technique de dilution-extinction (Button *et al.*, 1993; Song *et*

al., 2009; Vartoukian *et al.*, 2010) qui a démontré son efficacité pour isoler des taxons incultivés. (ii) A cela s'ajoute le lieu d'isolement des bactéries : la surface algale. La complexité des structures, la porosité et les différentes irrégularités de surface des diatomées, favorise l'attachement des bactéries (Montanaro & Arciola, 2000; Youn & Hur, 2007). Certaines études ont montré une spécificité des bactéries associées aux microalgues (Bagatini *et al.*, 2014; Bell & Mitchell, 1972; Eigemann *et al.*, 2013; Grossart *et al.*, 2005; Guannel *et al.*, 2011; Sison-Mangus *et al.*, 2014). Cette spécificité pourrait s'expliquer par le rôle important que peuvent exercer certaines bactéries vis-à-vis des microalgues. Un apport essentiel de vitamines par les bactéries a été démontré dans diverses études (Croft *et al.*, 2005; Grant *et al.*, 2014; Haines & Guillard, 1974; Kazamia *et al.*, 2012). Certaines bactéries peuvent contribuer à la fixation d'azote chez les microalgues (Foster & Zehr, 2006; Kneip *et al.*, 2008; Prechtel *et al.*, 2004). Les bactéries peuvent également contribuer à la défense leur hôte algal en produisant des antioxydants (Hünken *et al.*, 2008) ou en produisant des composés antagonistes contre des bactéries potentiellement pathogènes (Seyedsayamdost *et al.*, 2011a). Il est donc possible que les microalgues sélectionnent des bactéries spécifiques peu abondantes qui sont donc peu rencontrées et décrites dans les isollements de bactéries pélagiques libres. (iii) Concernant les microalgues issues de l'environnement, une identification microscopique a été réalisée lors de leur isolement, mais aucune identification à l'espèce n'a été réalisée. En effet, après isolement, elles ont été directement inoculées dans du milieu pour bactéries, qui n'était pas favorable à la croissance algale et ne permettait donc pas de réaliser une analyse plus approfondie de l'identité de l'hôte algal. En revanche, pour les microalgues issues de cultures, leur identité a été déterminée à l'espèce, ce qui nous permet de dire qu'elles correspondent à des espèces pour lesquelles la diversité bactérienne n'avait pas encore été décrite. Etant donné la forte spécificité dans les interactions bactéries-microalgues, il ne paraît impossible de penser qu'elles hébergent des bactéries présentant une nouveauté taxonomique.

Ces données montrent aussi une plus grande proportion de nouveaux taxons bactériens dans les isolats algaux environnementaux que dans ceux issus de cultures de microalgues. Cela peut être dû à la sélection d'un plus petit nombre de souches bactériennes par le milieu de culture algal et l'uniformité des conditions de croissance en laboratoire (température et nutriments constants, pas de saisonnalité comme dans l'environnement, etc.) mais aussi être lié aux conséquences à long terme des interactions microalgues-bactéries.

CHAPITRE 4

Rôle des bactéries épibiontes dans les interactions

avec C. danicus et T. delicatula

1. Contexte de l'étude

De nombreuses études sur la diversité des interactions entre bactéries et microalgues ont mis en évidence une forte spécificité des communautés bactériennes associées aux microalgues (Amin *et al.*, 2012; Bagatini *et al.*, 2014; Delucca & Mccracken, 1977; Guannel *et al.*, 2011; Jasti *et al.*, 2005; Sison-Mangus *et al.*, 2014). Certains travaux ont essayé de comprendre cette spécificité en analysant la nature des interactions entre différentes bactéries et microalgues. La nature des interactions dépend de chacun des partenaires et du fait qu'il peut exercer trois types d'action : positive (+), négative (-) ou neutre (0). En combinant les différents types d'action des deux partenaires, on peut identifier du mutualisme (+,+), du commensalisme (+,0), du parasitisme (+,-), de la compétition (-,-) ou de l'amensalisme (-,0), comme cela a été défini dans la Figure 20 et Tableau 1. Des études ont démontré que les interactions entre deux organismes pouvaient fluctuer selon les paramètres abiotiques (Xie *et al.*, 2013), mais aussi biotiques (Kimura & Tomaru, 2014; Seyedsayamdost *et al.*, 2011a). Pour aller plus loin, certaines études ont exploré les mécanismes cellulaires et moléculaires qui expliquaient ces interactions. Par des analyses biochimiques et des tests de toxicité, Seyedsayamdost *et al.* (2011) ont mis évidence que *Phaeobacter gallaeciensis* produisait un composé algicide en présence d'acide para-coumarique (composé émis par les cellules algales âgées). Cette bactérie, connue pour produire des facteurs de croissance algale, modifie donc son métabolisme en présence de cellules algales âgées et devient une bactérie pathogène opportuniste. Amin *et al.* (2015) ont, quant à eux, réalisé une analyse transcriptomique afin de déterminer les mécanismes cellulaires qui pouvaient expliquer l'amélioration de la croissance de la diatomée *Pseudo-nitzschia multiseriis* par une bactérie appartenant au genre *Sulfitobacter*. Ils ont mis en évidence des échanges de nutriments et de facteurs de croissance entre les deux organismes avec notamment la production d'AIA par la bactérie à partir de tryptophane endogène ou sécrété par la diatomée, la sécrétion d'ammoniac par la bactérie et celle de composés organosoufrés par la diatomée.

En considérant l'hypothèse que les interactions fortes entre différents organismes sont privilégiées lors d'un contact entre les organismes, l'objectif de l'isolement de bactéries attachées à la surface des microalgues était de sélectionner des souches présentant potentiellement une interaction forte avec leur hôte algal. Par ailleurs, diverses études ont

révélées que les bactéries physiquement attachées aux surfaces biotiques ou abiotiques étaient aussi celles qui présentaient la plus forte activité métabolique (Gram *et al.*, 2010; Long & Azam, 2001; Long *et al.*, 2005; Nair & Simidu, 1987). Ceci pouvait nous laisser penser que la potentielle forte activité de certaines bactéries épibiontes pourrait avoir un impact sur la croissance algale. Des expériences de co-cultures ont été mises en œuvre entre différents couples associant une microalgue axénique et une bactérie épibionte afin d'explorer les interactions. Nous avons montré que les communautés épibiontes des microalgues en culture, quoique simplifiées, étaient composées de différentes espèces. Ces communautés constituaient un microbiote permettant une croissance algale pérenne, puisque les cultures xéniques étaient maintenues au laboratoire depuis 2 ans. Il est cependant concevable que dans les cultures xéniques, certains effets des bactéries sur les microalgues (comme une activité algicide) pourraient être masquées par la compétition entre les différentes bactéries présentes, les empêchant d'atteindre des concentrations cellulaires ayant un impact sur le développement algal. En revanche, en confrontant les bactéries individuellement à des diatomées axéniques, on va limiter les interactions à deux partenaires différents permettant éventuellement de révéler des interactions positives et négatives. Par exemple, Amin *et al.* (2015) ont isolé plusieurs souches bactériennes différentes de cultures de *P. multiseriis*, et des analyses par co-cultures microalgue-bactérie ont montré que les souches appartenant aux genres *Marinobacter* et *Limnobacter* n'affectaient pas la croissance algale, une souche appartenant au genre *Croceibacter* était létale pour la microalgue alors que quatre souches appartenant au genre *Sulfitobacter* amélioraient sa croissance en augmentant le taux de croissance de la microalgue de 18-35%.

Dans le chapitre 2, des souches de bactéries épibiontes ont été isolées de deux cultures des diatomées *T. delicatula* RCC 2560 et *C. danicus* RCC 2565 dans le but d'identifier la microflore associée aux interactions à long terme. L'objectif du chapitre 4 a donc été de cribler l'ensemble des bactéries épibiontes isolées en co-culture avec les deux diatomées axéniques afin de définir dans un premier temps l'impact des bactéries épibiontes sur la croissance algale et dans un deuxième temps d'identifier le candidat ayant le fort impact sur la croissance de l'une des microalgues, afin de réaliser une analyse transcriptomique. L'analyse par transcriptomique s'intéresse à l'expression des gènes induite dans des environnements particuliers qui sont ici la mono-culture de la bactérie candidate et de la

souche algale, et la co-culture des deux partenaires. En se basant sur le taux de transcription des différents gènes, il est alors possible connaître les mécanismes cellulaires sollicités dans les interactions entre les deux organismes.

La stratégie alors envisagée pour atteindre ces objectifs a nécessité d'axéniser les cultures de microalgues de *T. delicatula* RCC 2560 et *C. danicus* RCC 2565. Ensuite, des co-cultures et mono-cultures ont été réalisées en microplaques afin de confronter chaque bactérie épibionte avec chacune des microalgues. Cette étape en petits volumes permettait un criblage d'un grand nombre de couples bactérie-microalgue. Les couples bactérie-microalgues générant un impact fort sur la croissance algale ont été sélectionnés et mis en culture dans des volumes plus importants pour atteindre les biomasses nécessaires à l'obtention d'ARN de qualité en vue de réaliser une analyse transcriptomique.

Dans ce chapitre, il sera question des différentes techniques d'axénisation utilisables sur les microalgues et de façon plus détaillée celle qui a été utilisée pour axéniser les souches RCC 2560 et RCC 2565. La méthodologie utilisée dans les différentes expériences de co-cultures sera également décrite. Puis, les résultats de ces expériences seront présentés. Enfin, les particularités de l'analyse transcriptomique appliquée aux interactions bactérie-microalgue et une mise au point de la technique seront présentées.

2. Methodologie

2.1. Méthodes d'axénisation de cultures microalgales

L'axénisation des microalgues consiste à éliminer l'intégralité des bactéries associées à une culture de microalgue. Pour se faire, différentes méthodes d'axénisation ont été décrites et emploient des procédés physiques et/ou chimiques. Les méthodes sont à adapter aux différentes microalgues. Par exemple, les microalgues capables de former des colonies sur gélose (comme certaines cyanobactéries) pourront être axénisées par repiquages successifs sur milieu gélosé. Les méthodes physiques d'axénisation utilisent, quant à elles, des procédés mécaniques pour éliminer les bactéries. Par exemple, une méthode combine l'ultrasonication et le tri cellulaire par cytométrie en flux suivis d'une culture en microplaque et la purification sur milieu gélosé à partir duquel une colonie algale est prélevée pour être mise en culture en milieu liquide (Cho *et al.*, 2013). En raison du faible nombre de microalgues colonisées par les bactéries dans l'environnement marin (Mayali *et al.*, 2011), il est également possible d'envisager d'obtenir des cultures de microalgues axéniques en isolant des cellules algales sans les bactéries libres grâce à la méthode de micropipetages successifs utilisée dans le cadre de cette thèse. Pour les études s'appuyant sur des cultures algales, l'utilisation d'antibiotiques est la technique la plus souvent utilisée pour éliminer les bactéries (Amin *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 1995; Hold *et al.*, 2001b). Cette technique est parfois délicate à mettre en œuvre en raison des différences de sensibilité des bactéries aux antibiotiques (Trottet *et al.*, 2011), mais également parce que les microalgues peuvent aussi être sensibles aux antibiotiques utilisés (González-Pleiter *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2016; Yasser & Adli, 2014; Youn & Hur, 2007). Les méthodes d'axénisation utilisant des antibiotiques nécessitent donc des mises au point, qui sont rarement décrites en détail dans les études utilisant de souches axénisées, à quelques exceptions près (Han *et al.*, 2016; Molina-Cárdenas *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2007b).

Le protocole d'axénisation qui a été employé est inspiré de celui préconisé par la CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, Ecosse)¹⁵. Pour axéniser les cultures de *T. delicatula* RCC 2560 et *C. danicus* RCC 2565, celles-ci ont, dans un premier temps, été filtrées puis lavées à l'eau de mer stérile afin de réduire la densité bactérienne présente. Un volume

¹⁵ http://www.ccap.ac.uk/documents/Antibiotic_treatment.pdf

de 3mL de culture de microalgues en phase exponentielle (cellules algales d'environ 20µm de diamètre) a été filtré sous hotte à flux laminaire à l'aide d'un système de filtration Sartorius en polycarbonate, muni d'un filtre en nylon (ø 25mm, porosité 11µm) stérilisé aux UV. Les cellules ont été lavées par filtration de 2 volumes de 50mL d'eau de mer stérile. Les cellules lavées ont ensuite été remise en suspension dans une boîte de Petri contenant 1,5mL d'eau de mer stérile. Les cellules algales ont ensuite été mises en culture dans du milieu contenant un mélange d'antibiotiques. Différentes concentrations et durées d'exposition aux antibiotiques ont été employées afin d'obtenir une condition qui éliminait totalement les bactéries tout en permettant la croissance algale. Le mélange comprenant les concentrations suivantes d'antibiotiques a été préparé dans de l'eau milliQ : céfotaxime (500mg/L), carbénicilline (500mg/L), kanamycine (200mg/L) et augmentin (200mg/L). Le mélange a été stérilisé par filtration à 0,2µm et conservé à 4°C pendant une semaine ou stocké à -20°C. Plusieurs microplaques 24 puits ont été préparées en distribuant 1,5 mL de milieu K+Si¹⁶ frais dans chaque puits. Dans la 1^{ère} ligne d'une des plaques 24 puits, des concentrations croissantes du mélange d'antibiotiques, quelques microlitres d'une solution contenant de la peptone (20 g/L) et de l'extrait de levure (2,5 g/L) ainsi la culture algale rincée ont été distribués comme indiqué dans le Tableau 11. La plaque a ensuite été incubée à 19°C (85 µE, cycle obscurité/lumière : 12/12).

Tableau 11 : Traitement des microalgues au mélange d'antibiotiques en vue d'axénisation

Puits	1	2	3	4	5	6
Mélange d'antibiotiques	0 µL	8 µL	15 µL	80 µL	125 µL	150 µL
Solution de peptone et d'extrait de levure	3 µL					
Culture algale rincée	150 µL					

Le lendemain et les jours suivants, 50 µL de culture algale de chacun des 6 puits sont prélevés le matin et le soir de façon à inoculer du milieu K+Si sans antibiotique (incubation pendant une semaine à 19°C , 85µE, cycle obscurité/lumière : 12/12). La durée du traitement et donc le nombre de prélèvements effectué dépendent de la sensibilité des bactéries et des

¹⁶ Milieu préparé selon le protocole de la Collection de Culture de Roscoff (<http://roscoff-culture-collection.org/protocols/media-recipes>), à l'exception que l'eau de mer vieillie est remplacée par de l'eau de mer artificielle comprenant de l'eau distillée et du Red Sea Salt (Houston) à 35ppt.

microalgues au mélange d'antibiotiques. Les durées d'exposition aux antibiotiques généralement utilisées vont jusqu'à 80 h d'incubation.

2.2. Contrôle de l'axénie

De nombreuses stratégies sont couramment employées pour vérifier l'axénie d'une culture de microalgue. Cependant, certaines stratégies ne sont pas assez rigoureuses et/ou ne permettent pas d'apporter une réponse suffisamment rapide. Par exemple, la technique consistant à étaler du surnageant de culture sur un milieu gélosé de type Marine Agar ne permet de faire pousser toutes les bactéries hétérotrophes. La technique visant à amplifier par PCR le gène codant pour l'ARNr 16S peut également amplifier l'ARNr 16S chloroplastique ou mitochondrial des cellules microalgales. Pour parvenir à un contrôle efficace et rapide, l'idéal est le dénombrement direct des bactéries contenues dans la culture microalgale après fixation et marquage, soit en analysant l'échantillon par cytométrie en flux (contrôle rapide, volumes analysés de l'ordre de quelques dizaines de microlitres) ou en filtrant un aliquot de la culture puis d'observer l'intégralité du filtre au microscope (contrôle plus long et complexe, mais qui permet d'analyser un volume de culture de plusieurs millilitres et de confirmer visuellement l'absence de bactéries). Compte tenu des avantages et inconvénients de ces deux méthodes de contrôle, l'idéal est de procéder par étape en réalisant dans un premier temps un contrôle rapide par comptage des bactéries par cytométrie en flux. Dans un deuxième temps, si le premier contrôle a suggéré l'absence de bactéries dans la culture, un contrôle sur un grand volume est réalisé par filtration et analyse du filtre. Enfin, ces contrôles doivent être réalisés sur des cultures en fin de phase stationnaire après que les cultures aient subi plusieurs repiquages successifs dans un milieu sans antibiotique.

Concernant le contrôle de l'axénie sur filtre, 10 mL de culture de microalgues ont été filtrés par gravité à l'aide d'un filtre nylon (\varnothing 45mm, porosité 11 μm pour des cellules de 20 μm). Le filtrat (qui contenait les éventuelles bactéries) était alors récupéré et placé dans un tube Falcon sur glace. L'échantillon était fixé en ajoutant 1 mL de paraformaldéhyde 10% et maintenu sur glace pendant 15 min. Les bactéries étaient ensuite marquées en ajoutant 12,5 μL de 4',6'-diamidino-2-phénylindole (couramment appelé DAPI) à $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (concentration finale de $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) et maintenir à l'obscurité pendant au moins 5 min. La totalité de

l'échantillon fixé et marqué a été filtré sur un filtre Nuclepore noir (\varnothing 25mm, porosité 0,2 μ m) à l'aide d'une pompe à vide. L'entonnoir et le filtre ont été rincés avec 5 ml d'eau milliQ autoclavée et filtrée. Le filtre a été séché sur un papier absorbant, avant d'être monté entre lame et lamelle avec de l'huile à immersion. Enfin, le filtre a été observé au microscope à épifluorescence (excitation, 350 nm) à l'objectif x100. Les bactéries émettent une fluorescence bleue brillante (émission, 450-490nm).

2.3. Expériences de co-cultures

Pour évaluer la nature des interactions existant entre les microalgues et les bactéries, une première série de co-cultures en plaque 48 puits a été réalisée dans le but de cribler l'ensemble des bactéries isolées des microalgues. Une deuxième série de co-cultures a ensuite été effectuée en flasques sur les souches présentant le plus fort intérêt, en augmentant les volumes (30 mL, 250 mL, 300 mL, 400 mL et 500 mL). Des récoltes cellulaires ont été réalisées sur les plus grands volumes afin de mettre au point l'extraction d'ARN dans la perspective de réaliser une analyse transcriptomique. Différents volumes de culture ont donc été utilisés au cours de ces expérimentations et pour éviter toutes redondances, seul le protocole générant des co-cultures en flasques en volume de 400 mL sera détaillé. Tous les milieux utilisés pour cette expérience ont été préparés en une seule fois et sont donc homogènes pour l'ensemble des conditions de culture.

2.3.1. Préparation des pré-cultures

Les pré-cultures de microalgues ont été réalisées en tenant compte du nombre de souches bactériennes testées, du volume de pré-culture à utiliser pour chaque culture, ainsi que du nombre de réplicats. Les pré-cultures microalgales consistaient à inoculer 1/3 de culture algale en début de phase stationnaire (J7) dans 2/3 de milieu K+Si et à incuber 3-4 jours, jusqu'à obtention d'une culture algale dense (proche de la densité maximale observée à J7 dans la culture précédente), qui constituait la pré-culture en phase exponentielle. Les pré-cultures bactériennes ont été réalisées en prélevant une colonie sur gélose d'une souche bactérienne et en la mettant en culture dans 3 mL de milieu MB/5 sous agitation à 200 tr/min

(durée d'incubation adaptée en fonction de la souche, pour avoir une culture bactérienne dense lorsque la pré-culture algale était en phase exponentielle).

2.3.1. Préparation des mono-cultures et co-cultures

La préparation des mono-cultures et co-cultures a nécessité de connaître les concentrations cellulaires en microalgues (déterminées par comptages en cellule de Malassez) et en bactéries (déterminées par comptage au cytomètre en flux) dans les pré-cultures. Pour la détermination de la concentration en microalgues, 1 mL de pré-culture microalgale a été prélevé sous la hotte à flux laminaire. Après avoir déposé 10 μL de culture sur une cellule de Malassez, l'intégralité du quadrillage, correspondant à un volume de 1 μL a été compté (rectangle rouge dans la Figure 42). Trois comptages homogènes ont servi à déterminer la concentration cellulaire de chaque échantillon. Les pré-cultures de bactéries ont été récoltées par centrifugation de 2 mL de culture bactérienne à 3000 g pendant 10 min. Le culot bactérien a été remis en suspension dans du milieu K+Si. Un aliquot de cette suspension bactérienne a été dénombré par cytométrie en flux. Enfin, le volume de suspension bactérienne à ajouter à la culture de microalgues axéniques pour avoir 50 fois plus de bactéries que de microalgues dans les co-cultures a été calculé.

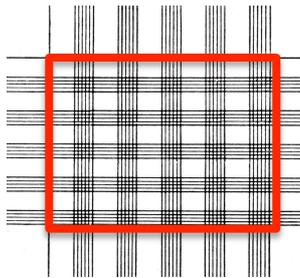


Figure 42 : Quadrillage d'une cellule de Malassez

Les co-cultures de microalgues et bactéries ont été préparées dans un volume final de 400 mL K+Si en flasque de 1L dans lequel les pré-cultures de microalgues avaient été diluées 10 fois (suivi de croissance sur environ 5 jours pour avoir 3 points alignés permettant de déterminer le μ_{max}) ou 20 fois (suivi sur environ 7 jours pour avoir 5 points alignés permettant de déterminer le μ_{max}). Ainsi, 40 ou 20 mL de pré-culture microalgale a été inoculé dans 360 ou 380 mL de milieu K+Si. Un volume de suspension bactérienne correspondant à une concentration bactérienne 50 fois supérieure à la concentration

microalgale a également été ajouté. Pour les mono-cultures bactériennes (contrôle bactérien), ce même volume de suspension bactérienne a été ajouté dans du milieu K+Si (Vf = 400 mL), supplémenté avec 5 μm de glucose. Pour les mono-cultures de microalgues (contrôle microalgue axénique), 40 ou 20 mL de pré-culture microalgale a été inoculé dans 360 mL de milieu K+Si.

2.3.2. Prélèvements et suivi de la croissance algale et bactérienne

Pour le suivi de croissance des microalgues, 500 μL de chaque culture ont été transférés dans une plaque 48 puits et la fluorescence a été analysée au spectrofluorimètre ($\lambda_{\text{ex}440}$ and $\lambda_{\text{em}680}$). A l'issue de l'analyse, les cultures ont été fixées avec 5 μL de glutaraldéhyde par puits et stockées à +4°C afin de mesurer les concentrations algales par cellule de Malassez. Pour le dénombrement des cellules bactériennes, 100 μL de chaque culture (mono-cultures et co-cultures) ont été prélevés et déposés en barrettes 8 puits contenant 1 μL de glutaraldéhyde 25% par puits, puis congelé à -80°C. Ces prélèvements ont été analysés par cytométrie en flux.

3. Résultats

3.1. Axénisation des cultures algales

Des cultures axéniques de *T. delicatula* RCC 2560 et *C. danicus* RCC 2565 ont été obtenues à partir de la méthode décrite précédemment. Pour *T. delicatula* RCC 2560, les conditions ayant permis l'axénisation correspondaient à un traitement fort en termes de concentration en antibiotiques (concentrations 3, 5 et 6) et des durées d'exposition inhabituellement longues (9 et 15 jours). L'axénisation de la culture de *C. danicus* RCC 2565 a été également obtenue après exposition à de fortes concentrations en antibiotiques (concentrations 4 et 5) mais des temps d'exposition plus courts (3 et 3,5 jours). Cette expérience a montré que les conditions d'obtention de l'axénie sont très dépendantes de la sensibilité des différentes algues aux antibiotiques et de la variabilité de la résistance de la microflore associée.

3.2. Expériences de co-cultures

Les expériences de co-cultures ont consisté à réaliser dans un premier temps de nombreux tests en petits volumes (microplaques 48 puits, 500 μ L de culture par puits), puis quelques tests en volumes intermédiaires (30 mL de culture), jusqu'à obtenir un candidat pour l'analyse transcriptomique pour laquelle de grands volumes sont nécessaires (au moins un volume total de 1200 mL de culture, soit 3 cultures de 400 mL) de culture. Une partie des souches bactériennes isolées des deux microalgues a été mise en co-culture avec les deux souches microalgales axénisées. Les taux de croissance des co-cultures ont été comparés à ceux des mono-cultures de microalgues axéniques.

En comparant les tendances générales des co-cultures réalisées, il est possible de dire que la culture de *T. delicatula* RCC 2560 semble avoir une meilleure croissance dans sa version axénique qu'en présence de bactéries (majorité des taux de croissance relatifs ≤ 0 dans le Tableau 12). Les effets très légèrement inhibants observés en présence de bactéries ne sont pas caractéristiques d'une activité algicide, qui se manifeste par un déclin rapide de la densité algale. Il s'agirait plutôt d'une compétition entre les organismes pour les nutriments, et qui n'implique pas forcément une interaction entre les deux partenaires. En revanche, il semblerait que ce soit l'inverse pour *C. danicus* RCC 2565 (majorité de valeurs ≥ 0 dans le Tableau 13), où la croissance algale est plus souvent améliorée en présence de bactéries. Dans ce cas, les bactéries concernées contribueraient à la croissance algale en leur apportant des composés nutritifs absents du milieu de culture et/ou des facteurs de croissance. Par ailleurs, *C. danicus* RCC 2565 axénique a présenté des courbes de croissances assez hétérogènes pour les différents répliquats réalisés lors d'un même test (écart-types importants ; Figure 43). En revanche, l'ajout de bactéries semblait homogénéiser sa croissance (écart-types plus faibles ; Figure 43).

Nous avons également remarqué que la croissance des microalgues était impactée de manière très similaire par leurs bactéries d'origine et par les bactéries issues de l'autre microalgue. Dans le chapitre 2, nous avons mis en évidence que la composition des communautés bactériennes associées à chaque microalgue était différente pour chaque algue et donc spécifique. Ces deux résultats peuvent signifier que la phycosphère algale génère un

environnement propice au développement de bactéries spécifiques (capables de se développer à partir des exsudats algaux), mais qu'il ne s'agit pas forcément de bactéries ayant une influence spécifique sur leur microalgue hôte.

Tableau 12 : Résultats des différentes co-cultures réalisées entre les souches de bactéries épibiontes et la culture axénique de *T. delicatula* RCC 2560. Plusieurs tests ont été réalisés avec les bactéries provenant de l'hôte algal initial (*T. delicatula* RCC 2560) et avec des bactéries provenant d'une autre microalgue (*C. danicus* RCC 2565). Au sein d'un test, chaque co-culture comprend 2 à 4 répliquats et le contrôle mono-culture algal au moins 8 répliquats. Les résultats exprimés en pourcentage correspondent au ratio du taux de croissance algal de la co-culture sur celui de la microalgue axénique. Les données proches du rouge correspondent aux effets inhibiteurs des bactéries sur l'algue (action négative) alors que les données se rapprochant du vert correspondent aux effets promoteurs (action positive).

Origine	Classe	Ordre	Genre	Souche	1er test (plaque 48 puits, 0,5mL/puits, 2 répliquats par co-culture)		2e test (plaque 48 puits, 0,5mL/puits, 2 répliquats par co-culture)		3e test (plaque 48 puits, 0,5mL/puits, 4 répliquats par co-culture)		4e test (plaque 48 puits, 0,5mL/puits, 4 répliquats par co-culture)		
					Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	
<i>T. delicatula</i> RCC 2560 (Co-cultures par réintroduction avec l'hôte algal initial)	Alphaproteobacteria	Shpingomonadales	<i>Altererythrobacter</i>	KC4	P3T	-8	P3Tbis	2					
				KC12	P2T	-3							
			<i>Erythrobacter</i>	KC13	P3T	-3	P3Tbis	13	P4D	-15			
				KC18	P3T	-17	P3Tbis	1					
				KC19	P2T	2							
				KC19D	P3T	-3	P3Tbis	-2					
				KC19F	P3T	-8	P3Tbis	-4					
				KC19H	P3T	-8	P3Tbis	9	P4E	5			
				KC20	P2T	7							
				KC21	P2T	5							
				KC21B	P3T	-4	P3Tbis	9	P4E	7			
				KC22	P2T	-3							
			<i>Porphyrobacter</i>	KC82	P2T	-2							
				<i>Silicimonas</i>	KC90	P2T	3						
			KC91		P2T	-4			P4D	55			
	KC10	P2T	-2										
	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Paracoccus</i>	KC10E	P3T	-9	P3Tbis	-3						
			KC11	P2T	14			P4D	-26				
		<i>Oceaniovalibus</i>	KC86G	P3T	-7	P3Tbis	7	P4E	-1				
	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	<i>Marinobacter</i>	KC86H	P3T	-5	P3Tbis	6	P4E	-11			
				KC16	P1T	-5	P1Tbis	-1					
				KC16B	P3T	-8	P3Tbis	6	P4E	-28			
				KC31	P1T	2	P1Tbis	-1					
				KC32B	P1T	-10	P1Tbis	3	P4D	-16			
				KC87	P1T	8	P1Tbis	-13	P4D	-60			
	Actinobacteria	Actinomycetales	<i>Kocuria</i>	KC2	P1T	-4	P1Tbis	-5					
				KC3	P2T	0							
				KC3B	P2T	2							
	<i>C. danicus</i> RCC 2565 (Co-cultures avec un nouvel hôte algal)	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	<i>Algimonas</i>	KC23	P1T	-10	P1Tbis	-6	P4C	4		
					KC5A	P3T	-9	P3Tbis	1				
KC5B					P1T	-3	P1Tbis	-11	P4C	-16	P4E	24	
KC5C					P3T	-8	P3Tbis	2	P4D	-27			
KC5D					P3T	-5	P3Tbis	6					
KC5E					P3T	-14	P3Tbis	4					
KC6B					P1T	-4	P1Tbis	-19	P4C	-12			
KC6C					P1T	-10	P1Tbis	-10	P4C	-15	P4E	2	
KC6D					P3T	2	P3Tbis	-4					
KC6F					P3T	-12	P3Tbis	6	P4D	-16			
KC7A					P3T	-8	P3Tbis	1					
KC7B					P3T	-10	P3Tbis	5	P4D	-18			
KC7C					P3T	-8	P3Tbis	0					
KC8B					P3T	5	P3Tbis	0					
<i>Rhodobacterales</i>					<i>Sulfitobacter</i>	KC38	P1T	2	P1Tbis	5			
	KC38B	P1T	-7	P1Tbis		-2	P4D	-16					
	KC39	P1T	0	P1Tbis		-10							
Gammaproteobacteria	Alteromonadales	<i>Marinobacter</i>	KC25	P1T	-13	P1Tbis	-15	P4C	-3				
			KC25B	P1T	-16	P1Tbis	0	P4C	-15	P4E	-14		
			KC26	P1T	-11	P1Tbis	-14	P4C	-9				
			KC26D	P2T	-2								
			KC27	P1T	-9	P1Tbis	-10	P4C	-12				
KC30	P1T	-36	P1Tbis	-11	P4C	-28	P4E	8					

Tableau 13 : Résultats des différentes co-cultures réalisées entre les souches de bactéries épibiontes et la culture axénique de *C. danicus* RCC 2565. Plusieurs tests ont été réalisés avec les bactéries provenant de l'hôte algal initial (*C. danicus* RCC 2565) et avec des bactéries provenant d'une autre microalgue (*T. delicatula* RCC 2560). Au sein d'un test, chaque co-culture comprend 2 à 4 répliquats et le contrôle mono-culture algal au moins 8 répliquats. Les résultats exprimés en pourcentage correspondent au ratio du taux de croissance algal de la co-culture sur celui de la microalgue axénique obtenue par plusieurs répliquats pour chaque test). Les données proches du rouge correspondent aux effets inhibiteurs des bactéries sur l'algue (action négative) alors que les données se rapprochant du vert correspondent aux effets promoteurs (action positive).

		Bactéries épibiontes testées											
Origine	Classe	Ordre	Genre	Souche	1er test (plaque 48 puits, 0,5mL/puits, 2 répliquats par co-culture)		2e test (plaque 48 puits, 0,5mL/puits, 2 répliquats par co-culture)		3e test (plaque 48 puits, 0,5mL/puits, 4 répliquats par co-culture)		4e test (flasque 50mL, 30mL/flasque, 3 répliquats par co-culture)		
					Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	
<i>C. danicus</i> RCC 2565 (Co-cultures par réintroduction avec l'hôte algal initial)	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Algimonas	KC5A	P3C	6							
				KC5B	P1C	2	P1Cbis	1					
				KC5C	P3C	7				P4B	10		
				KC5D	P3C	7				P4B	14		
				KC5E	P3C	5							
				KC6B	P1C	1	P1Cbis	0					
				KC6C	P1C	2	P1Cbis	-8					
				KC6D	P3C	-3							
				KC6F	P3C	-8							
				KC7A	P3C	1							
		KC7B	P3C	23				P4B	18	F5	1		
		KC7C	P3C	7				P4B	13				
		KC8B	P3C	8				P4B	14				
		KC38	P1C	-1	P1Cbis	-3							
		KC38B	P1C	22	P1Cbis	6	P4A	23					
		KC39	P1C	8	P1Cbis	9	P4A	24	F5	18			
Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Marinobacter	KC25	P1C	8	P1Cbis	4	P4A	-33				
			KC25B	P1C	0	P1Cbis	-11	P4A	-10				
			KC26	P1C	0	P1Cbis	0						
			KC26D	P2C	2								
			KC27	P1C	-1	P1Cbis	0						
			KC30	P1C	13	P1Cbis	-1	P4A	3				
<i>T. delicatula</i> RCC 2560 (Co-cultures avec un nouvel hôte algal)	Alphaproteobacteria	Shpingomonadales	Erythrobacter	Altererythrobacter	KC4	P3C	1						
				KC12	P2C	1							
				KC13	P3C	4							
				KC18	P3C	6							
				KC19	P2C	-4							
				KC19D	P3C	3							
				KC19F	P3C	1							
				KC19H	P3C	10			P4B	7			
				KC20	P2C	0							
				KC21	P2C	-6							
		KC21B	P3C	-1									
		KC22	P2C	-6			P4B	14					
		Porphyrobacter	KC82	P2C	-1								
		Rhodobacteriales	Silicimonas	KC90	P2C	-3							
				KC91	P2C	2							
				KC10	P2C	-1							
			Paracoccus	KC10E	P3C	4							
				KC11	P2C	-6							
				KC86G	P3C	21			P4B	-5			
		Oceaniovalibus	KC86H	P3C	4								
		Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Marinobacter	KC16	P1C	0	P1Cbis	-3				
					KC16B	P3C	10			P4B	14		
KC31	P1C				10	P1Cbis	11	P4A	29				
KC32B	P1C				12	P1Cbis	5	P4A	25	F5			
KC87	P1C				0	P1Cbis	-15						
Actinobacteria	Actinomycetales	Kocuria	KC2	P1C	10	P1Cbis	-5						
			KC3	P2C	-24			P4A	22				
		Nocardioiodes	KC3B	P2C	-2								
		Micrococcus	KC23	P1C	3	P1Cbis	4	P4A	21				

Le criblage de l'ensemble des bactéries (Tableau 12 et Tableau 13), montre l'importance de la répétition des tests indépendants, puisque les différents tests consécutifs sur un même couple bactérie-microalgue ont régulièrement donné des taux croissance relatifs différents. Par exemple, la souche *Paracoccus* sp. KC11 a induit une augmentation du taux de croissance algale sur *T. delicatula* RCC 2560 de 14% dans le test P2T, alors que dans le test P4D, elle induisait une diminution de ce taux de 26%. Il n'était donc pas possible de définir un type d'interaction pour les souches présentant de telles hétérogénéités. Néanmoins, pour

d'autres souches, quelques tendances peuvent être remarquées. Par exemple, la majorité des épibiontes ont présenté un effet négligeable (effet neutre, qualifié par des valeurs de taux de croissance de plus ou moins 10% par rapport à celles du contrôle, et/ou avec des fluctuations entre 2 tests indépendants) sur les microalgues testées.

Quelques souches bactériennes ont cependant présenté des effets relativement importants et constants sur la croissance algale. Il s'agissait des souches bactériennes *Sulfitobacter* sp. KC39, *Marinobacter* sp. KC32B et *Algimonas* sp. KC7B, qui exerçaient toutes un effet promoteur sur la microalgue axénique *C. danicus* RCC 2565 lors des co-cultures en microplaques (1^{er}, 2^e et 3^e tests du Tableau 13 et Figure 43).

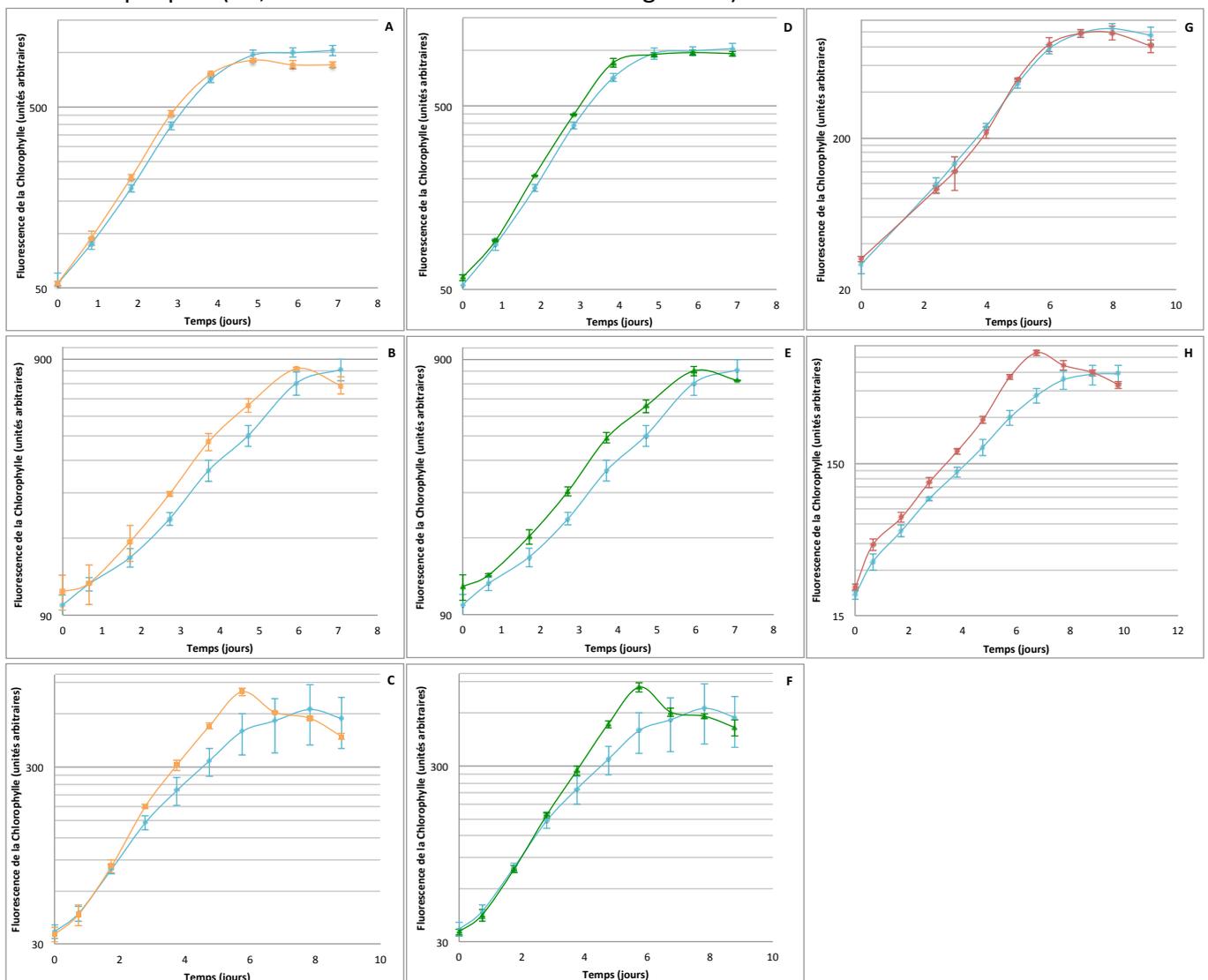


Figure 43 : Suivis de croissance algale sur des mono-culture de *C. danicus* RCC 2565 (en bleu clair) et des co-cultures entre cette diatomée et la bactérie (A-C) *Sulfitobacter* sp. KC39 (en orange), (D-F) *Marinobacter* sp. KC32B (en vert), (G,H) *Algimonas* sp. KC7B (en rouge). Les suivis A et D correspondent au test P1C, les suivis B et E correspondent au test P1Cbis, les suivi C et F correspondent au test P4A et les suivis G et H correspondent respectivement aux test P3C et P4B. Les suivis ont été réalisés en microplaques 48 puits dans un volume de 500µL. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types (n= 3).

Un nouveau test augmentant le volume de culture (30 mL) a ensuite été réalisé afin de valider ou non la sélection des premiers candidats bactériens (expérience F5). A l'issue de cette expérience (Tableau 13, Figure 44), il s'est avéré que la souche *Sulfitobacter* sp. KC39 isolée de *C. danicus* RCC 2565 était celle qui présentait l'effet promoteur le plus important sur le taux de croissance de son hôte d'origine (+18%). La souche *Marinobacter* sp. KC32B, isolée de *T. delicatula* RCC 2560, présentait un effet promoteur identique sur *C. danicus* RCC 2565.. La souche *Algimonas* sp. KC7B n'induisait, quant à elle, plus l'effet promoteur identifié dans les cultures en microplaques. Sur la base de ces résultats, nous avons retenu la souche *Sulfitobacter* sp. KC39 pour réaliser les co-cultures en grand volume (250 à 500 ml) afin d'élucider les effets mutualistes entre ces partenaires par approche transcriptomique.

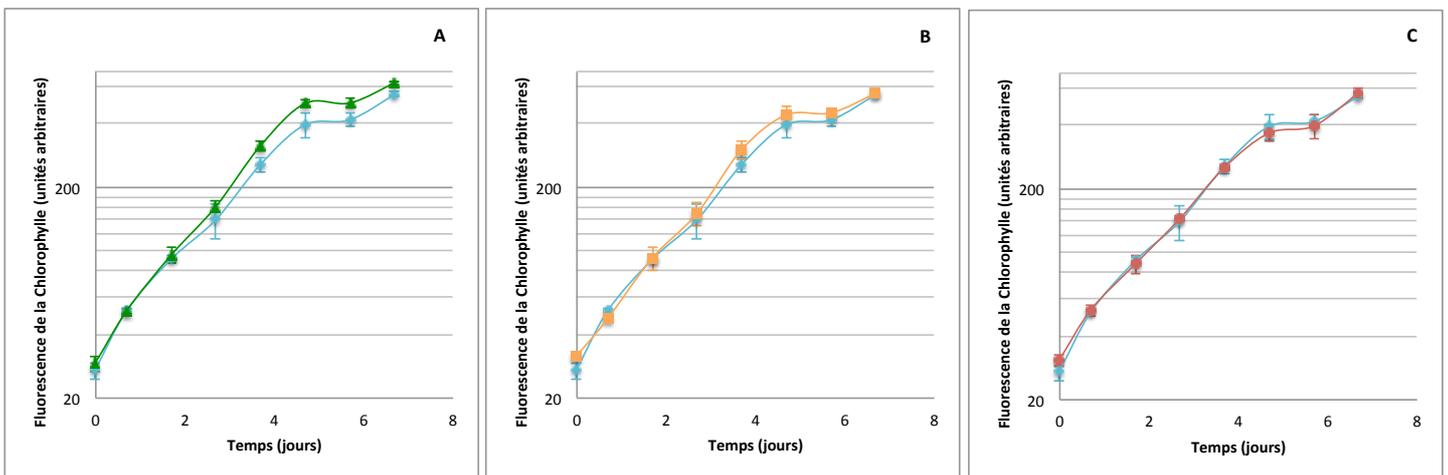


Figure 44 : Suivis de croissance algale sur des mono-culture de *C. danicus* RCC 2565 (bleu clair) et des co-cultures entre cette diatomée et la bactérie *Marinobacter* sp. KC32B (A), *Sulfitobacter* sp. KC39 (B), *Algimonas* sp. KC7B (C). Les suivis ont été réalisés en flasques ventilées dans un volume de 30 mL. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types (n= 3).

Cependant, au cours des expériences en grands volumes, l'effet promoteur de la bactérie *Sulfitobacter* sp. KC39 sur la culture axénique *C. danicus* RCC 2565 n'a pas été constant et un effet proche de la neutralité a été observé (Tableau 14 et Figure 45). Ces observations confirmées à plusieurs reprises ont donc remis en question l'intérêt que pouvait avoir une analyse transcriptomique sur ce couple bactérie-microalgue.

Tableau 14 : Résultats des différentes co-cultures réalisées entre quelques souches de bactéries épibiontes d'intérêt et la culture axénique de *C. danicus* RCC 2565. Les résultats sont exprimés en pourcentage correspondent aux ratios du taux de croissance algale de la co-culture par rapport à celui de la mono-culture de microalgues axénique (réalisé en plusieurs réplicats pour chaque test). Les données proches du jaune correspondent à une absence d'effets des bactéries sur l'algue (action neutre) alors que les données se rapprochant du vert correspondent aux effets promoteurs (action positive).

Bactéries épibiontes testées					5e test (flasque 1L, 250mL/flasque, 3 réplicats par co-culture)		6e test (flasque 1L, 300mL/flasque, 3 réplicats par co-culture)		7e test (flasque 1L, 500mL/flasque, 3 réplicats par co-culture)		8e test (flasque 1L, 400mL/flasque, 3 réplicats par co-culture)		9e test (flasque 1L, 250mL/flasque, 3 réplicats par co-culture)	
Origine	Classe	Ordre	Genre	Souche	Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)	Nom du test	croissance (en % par rapport au taux de croissance du contrôle)
<i>C. danicus</i> RCC 2565	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	<i>Sulfitobacter</i>	KC38B							F9	20		
				KC39	F6	22	F7	5	F8	14	F9	29	F10	12
<i>T. delicatula</i> RCC 2560	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	<i>Marinobacter</i>	KC31							F9	23		
	Actinobacteria	Actinomycetales	<i>Micrococcus</i>	KC23							F9	8		

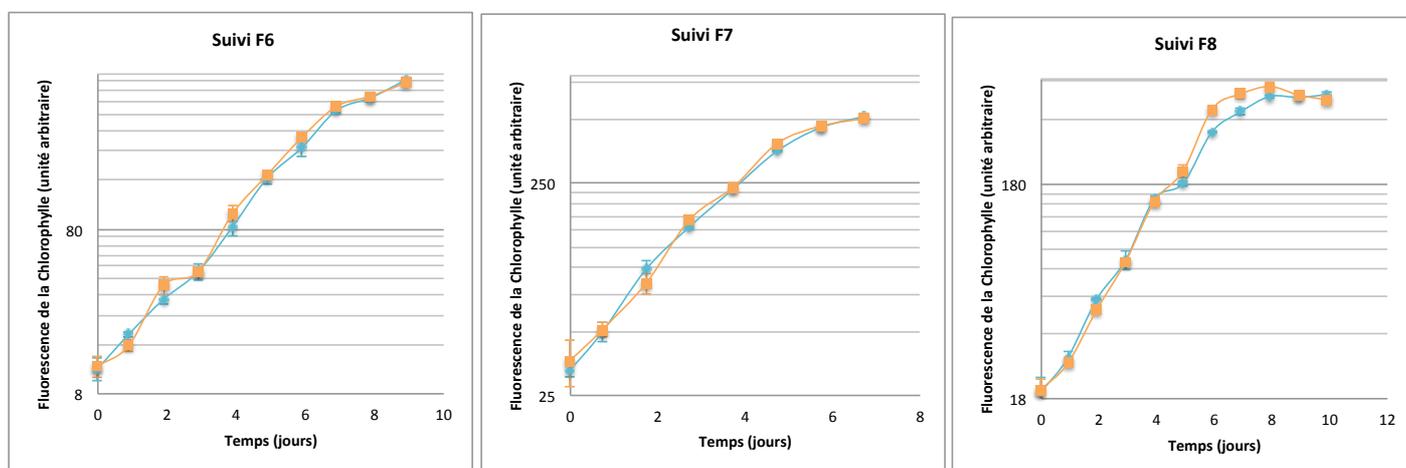


Figure 45 : Suivis de croissance algale sur des mono-culture de *C. danicus* RCC 2565 (bleu) et des co-cultures entre cette diatomée et la bactérie *Sulfitobacter* sp. KC39 (orange). Trois suivis indépendants sont présentés (tests F6, F7 et F8) et correspondent à des suivis réalisés dans des volumes respectifs de 250, 200 et 500 mL. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types (n= 3).

Nous avons alors émis l'hypothèse que la perte de l'effet promoteur de la souche bactérienne KC39 sur la microalgue était potentiellement due à ces changements de volumes et donc de conditions de culture. En effet, lorsque l'on compare les Figure 43, Figure 44 et Figure 45, qui correspondent respectivement à des cultures en petits (500 µL), moyens (30 mL) et grands volumes (200 à 500 mL), on remarque que l'impact des bactéries sur la croissance algale est généralement plus marqué dans les petits volumes (microplaques) et tend à s'estomper dans les moyens et davantage encore dans les grands volumes. Les différences liées aux types des contenants que sont les microplaques et les flasques sont la plus faible turbulence en microplaque qu'en flasque, mais aussi des différences dans la hauteur de milieu ou encore dans la surface permettant les échanges gazeux. Par exemple,

lors du prélèvement quotidien pour le suivi de croissance, la remise en suspension des cellules et l'homogénéisation de la culture est plus efficace en flasque qu'en microplaque. Il est possible que cette perturbation plus importante du tapis cellulaire gêne les interactions, qui sont donc moins marquées en flasque qu'en microplaque. Pour identifier un candidat bactérien présentant un effet sur la croissance algale dans les conditions qui seront appliquées pour la transcriptomique, nous avons choisi de réaliser tester plusieurs souches bactériennes directement en grands volumes. Toujours en se basant sur le criblage initial en microplaque, nous avons cette fois sélectionné les souches *Sulfitobacter* sp. KC39 et KC38B, *Micrococcus* sp. KC23, *Marinobacter* sp. KC31. Cette fois encore, la souche *Sulfitobacter* sp. KC39 semblait être la bactérie à l'effet promoteur le plus marqué sur le taux de croissance algal, même si celui-ci n'était pas très important (Tableau 14 et Figure 46).

Une dernière expérience de co-culture a confirmé l'effet trop négligeable de *Sulfitobacter* sp. KC39 sur la culture axénique *C. danicus* RCC 2565 (Figure 47). La décision a donc été prise de ne pas poursuivre l'analyse de l'interaction entre ce couple bactérie-microalgue par une analyse transcriptomique.

De plus amples analyses en co-cultures sont en cours à partir des souches axéniques de *C. danicus* RCC 2565 et *T. delicatula* RCC 2560, afin de sélectionner une souche bactérienne présentant un effet significatif et reproductible sur ces microalgues. En se basant sur les études qui indiquent que les métabolites secondaires sont principalement produits pendant la phase stationnaire de croissance des cellules (Lereclus *et al.*, 2000; McCarthy *et al.*, 1994; Skerratt *et al.*, 2002), nous avons repris le protocole expérimental, en inoculant cette fois les bactéries avec leur surnageant de culture (et non lavées avant mise en contact avec les microalgues). Ainsi, les éventuels métabolites produits par les bactéries lors de leur préculture sont également inoculés et peuvent influencer sur la croissance algale dès le début de la co-culture. Cette fois, les cultures sont directement réalisées en flasques dans des volumes de 30 mL, afin d'enlever les biais potentiels liés à la culture en microplaque.

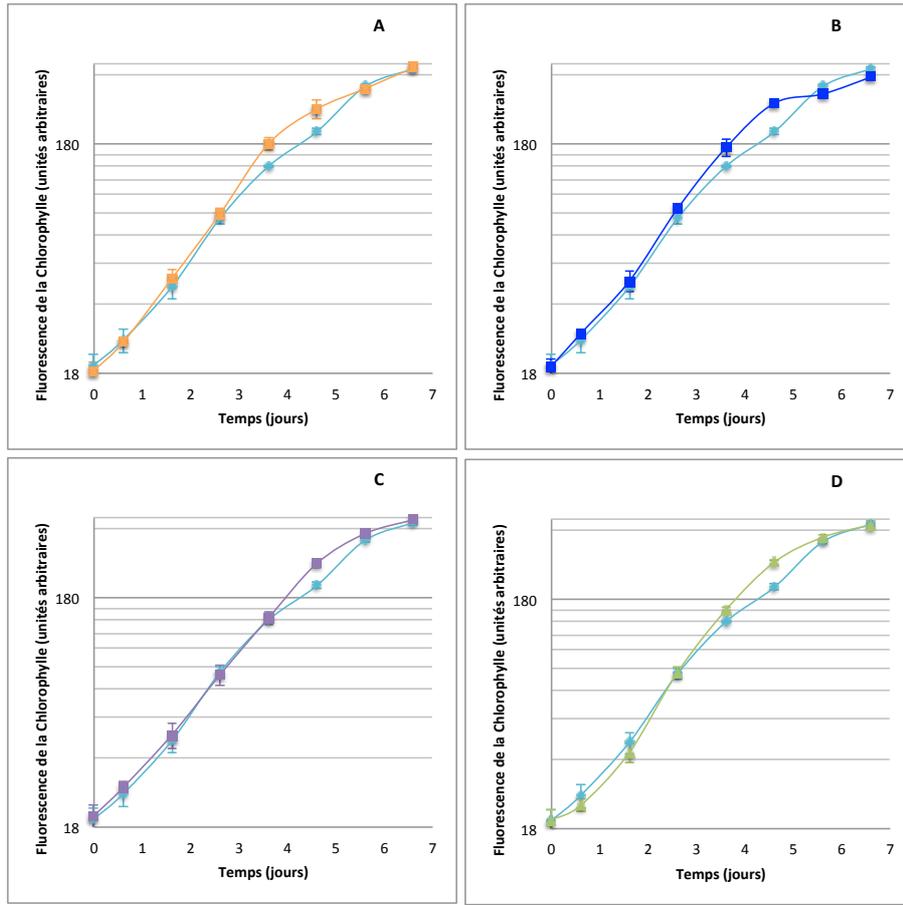


Figure 46 : Suivis de croissance algale sur des mono-culture de *C. danicus* RCC 2565 (en bleu clair) et des co-cultures entre cette diatomée et la bactérie (A) *Sulfitobacter* sp. KC39 en orange, (B) *Sulfitobacter* KC38B en bleu foncé, (C) *Micrococcus* sp. KC23 en violet, (D) *Marinobacter* sp. KC31 en vert. Les résultats de croissances sont issus du test F9, réalisés dans 400 mL (flasque ventilée de 1 L). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types (n= 3).

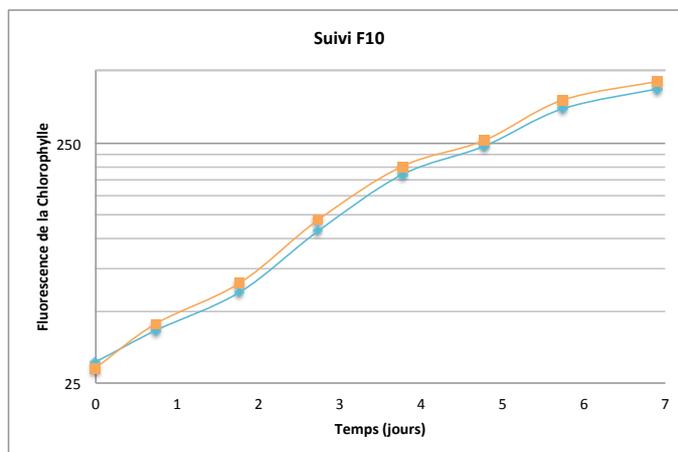


Figure 47 : Suivi de croissance algale sur des mono-culture de *C. danicus* RCC 2565 (bleu clair) et des co-cultures entre cette diatomée et la bactérie *Sulfitobacter* sp. KC39 (orange). Les résultats de croissance correspondent au suivi F10, réalisé en volumes de 250 mL (flasque ventilée de 1L). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types (n= 3).

4. Pour aller plus loin, la transcriptomique

Même si les expériences de co-culture n'ont pas permis d'obtenir un bon candidat dont l'interaction avec la microalgue pourra être analysée par transcriptomique, nous avons tout de même réalisé une mise au point de la méthode d'obtention des ARN à partir de *C. danicus* RCC 2565 et *Sulfitobacter* sp. KC39, en parallèle des tests F6, F7 et F8. Dans cette partie, les particularités de la transcriptomique dans le cas des interactions entre bactéries et microalgues et la méthodologie mise au point pour l'obtention des ARN seront présentés.

4.1. La transcriptomique dans le cas particulier des interactions microalgues-bactéries

La transcriptomique est un outil visant à analyser l'expression (transcription) des gènes à travers l'étude de l'ensemble des ARN messagers (ARNm). Les techniques utilisées en transcriptomique sont diverses, mais comprennent toutes une étape d'extraction de l'ARN total, suivi de différentes étapes visant à purifier cet ARN pour obtenir uniquement les ARNm. Différentes études de transcriptomique ont permis de mettre en lumière certains mécanismes liés aux interactions entre bactéries et microalgues (Amin *et al.*, 2015; Durham *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014).

4.1.1. Récolte de cellules pour extraction d'ARN : rapidité et efficacité

L'un des principes fondamentaux à appliquer lors des récoltes de cellule dans le but de réaliser une analyse transcriptomique est d'utiliser une méthode rapide et efficace.

La durée de récolte conditionnera deux facteurs. (i) Le premier est la qualité des ARNm. En effet, plus le temps de récolte sera long, plus les ARNm, qui sont des molécules très instables seront dégradés. Réduire au maximum la durée de la récolte permet donc d'obtenir des ARNm en bon état. Ce phénomène est d'autant plus vrai chez les cellules procaryotes, pour lesquelles la durée de vie des ARNm est encore plus courte (Rauhut & Klug, 1999). (ii) Le second facteur est la représentativité des ARNm. Si le temps de récolte est trop long, les cellules récoltées peuvent moduler l'expression de leurs gènes en réponse au stress engendré par la récolte (pression exercée par la filtration, cellules émergées de leur milieu de culture,

etc.) et produire des ARNm qui ne seront plus représentatifs des conditions de cultures appliquées au préalable (co-culture ou mono-culture). Généralement, la durée de récolte pratiquée (entre le début de la filtration/centrifugation et la congélation des échantillon) peut aller jusqu'à 20 min (Frias-Lopez *et al.*, 2008; Gifford *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014).

L'efficacité de la récolte est également un élément majeur, car un nombre de cellules insuffisant réduira la quantité de données exploitables, d'autant plus que les ARNm ne représentent qu'une faible partie des ARN totaux. En effet, pour analyser les transcrits issus de l'expression des gènes, la totalité de l'ARN cellulaire doit être extrait. Or, cet ARN est majoritairement composé d'ARNr, puis dans de moindres proportions d'ARN de transfert ou ARNt, et très minoritairement d'ARNm comme l'indique les proportions de 80/15/5 décrites chez *Escherichia coli* (Norris & Koch, 1972). Ces proportions sont très variables d'un échantillon à un autre, mais les ARNm restent toujours très minoritaires (Giannoukos *et al.*, 2012; Palazzo & Lee, 2015). Ces différents types d'ARN ont des fonctions très différentes (Figure 48) et sont présents en permanence au sein de la cellule. Cette faible quantité relative d'ARNm nécessite donc d'extraire un très grand nombre de cellules pour réussir à caractériser finement l'expression des gènes.

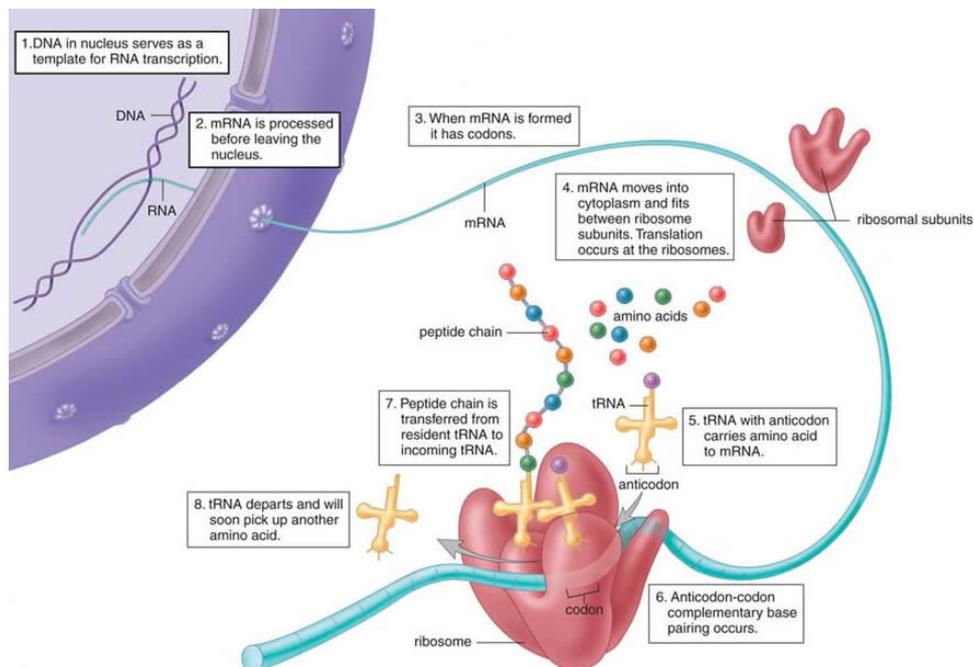


Figure 48 : Rôle des ARNm, ARNr et ARNt dans la synthèse protéique. La transcription (qui se produit dans le noyau) et la traduction (dans le cytoplasme au niveau des ribosomes) sont deux étapes indispensables à formation de protéines. (Source : <http://www.mheducation.co.uk/he/chapters/9780071102087.pdf>)

En réduisant au maximum la durée de la récolte et en choisissant une méthode de récolte efficace, il sera alors possible d'obtenir un maximum d'ARNm en bon état et qui reflète au mieux la condition de culture appliquée (i.e. mono culture ou co-culture).

Dans le cas de mono-cultures (bactéries seules ou microalgues seules, par exemple), la totalité des cellules est récoltée en même temps par centrifugation ou par filtration. La centrifugation est une méthode rapide surtout lorsque l'on traite des échantillons à forte densité cellulaire où les cellules pourraient colmater le filtre. Cette méthode est donc préférée dans le cadre d'analyse de mono-cultures.

Lorsque l'on travaille à partir d'une co-culture, contenant par exemple des microalgues et des bactéries, différentes stratégies peuvent être envisagées.

La première stratégie utilisée par Amin *et al.* (2015) se base sur le fait que les ARN de l'un des deux organismes peut venir masquer les ARN de l'autre organisme, en particulier lorsqu'il y a d'importantes différences dans les quantités d'ARN entre les différents organismes. Pour remédier à cela, une séparation des cellules par filtration sur le critère de la taille est réalisée. Les cellules ainsi triées sont ensuite extraites séparément. Dans le cadre des interactions entre bactéries et microalgues, cette stratégie soulève des problèmes importants qui sont l'allongement du temps de récolte dû aux deux filtrations successives (dégradation des ARNm, production d'ARNm en réponse au stress de récolte), le caractère imparfait de la filtration (chloroplastes algaux dans la fraction bactérienne, bactéries attachées dans la fraction algale). La séparation et donc l'exclusion des bactéries attachées peuvent être considérées comme problématiques puisque ce sont les bactéries ayant la plus forte activité métabolique.

La seconde stratégie utilisée par Wang *et al.* (2014) utilise une récolte simultanée des cellules algales et bactérienne par centrifugation avec 5000 tour/min pendant 10 min. Wang *et al.* (2014) indiquent qu'ils n'ont pas réussi à obtenir suffisamment d'ARNm représentatifs des bactéries après élimination des autres ARN par l'utilisation de différents kits. Ces quantités insuffisantes d'ARNm bactériens sont probablement dues à la méthode qui engendre une « contamination » des ARN bactériens par les ARN microalgaux présents en plus fortes quantités. Mais il est plus probable que ces résultats soient dus aux trop faibles volumes de récoltes que Wang *et al.* (2014) ont utilisés (50mL contre 2L pour Amin *et al.* (2015).

4.1.2. Extraction des ARN totaux

Cette étape d'extraction utilise des procédés d'extraction relativement classiques en biologie moléculaires qui sont repris dans différents kits commerciaux d'extraction d'ARN. On retrouve notamment les kits Nucleospin RNA II purification (Clontech Laboratories), RNeasy Mini (Qiagen), ToTALLY RNA Total RNA Isolation (Ambion, Life Technologies) ou Direct-zol™ (Zymo Research) utilisés dans différentes études (Amin *et al.*, 2015; Moustafa *et al.*, 2010). L'extraction d'ARN sur colonne, utilisée dans la plupart des kits, consiste à lyser les cellules par traitement thermique et chimique, puis à précipiter l'ARN à l'éthanol afin de le piéger dans une la résine d'une colonne, puis à laver l'échantillon plusieurs fois, avant de récupérer l'ARN à l'aide d'une solution d'élution.

4.1.3. Analyse de la qualité des ARN totaux extraits

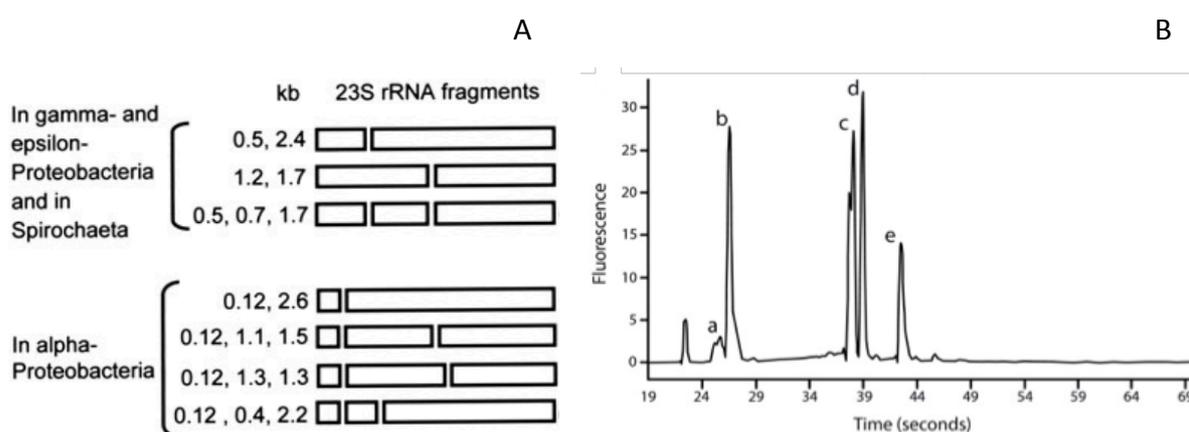
Les ARN totaux extraits doivent être analysés dans le but de savoir si ils correspondent aux exigences requises pour la technique de séquençage, en terme de quantité et de qualité.

La première exigence concerne la quantité. Elle peut être calculée par mesure d'absorbance à l'aide d'un spectromètre tel que le NanoDrop (Thermo Scientific) ou par une mesure de fluorescence sur des ARN marqués d'un fluorophore à l'aide d'un Bioanalyzer 2100 (Agilent) ou d'un fluorimètre quantitatif Qubit™ (ThermoFisher Scientific).

La seconde exigence concerne la qualité. Elle peut être estimée notamment à partir de mesures d'absorbance obtenues à l'aide d'un NanoDrop (Thermo Scientific) qui calcule différents ratios de valeurs d'absorbance (260/280 et 260/230), ces derniers devant s'approcher de 2. La qualité peut aussi être estimée grâce au RIN (RNA Integrity Number) qui est un indice aidant à définir l'intégrité des échantillons d'ARN et une valeur comprise entre 0 (ARN totalement dégradé) et 10 (ARN non dégradé). Le RIN est calculé automatiquement lors de l'analyse au Bioanalyzer 2100 par analyse de l'électrophorégramme entier issu de la migration des ARN totaux qui permet de visualiser le ratio en ARNr et la dégradation des différents ARN. En effet, présents en grande quantité (partie 4.1.1), les ARNr sont des marqueurs clés de la qualité de échantillon d'ARN et leur ratio est relativement connu et constant chez de nombreux organismes testés.

Plusieurs précautions importantes sont à prendre pour réaliser les analyses quantitatives et qualitatives sur le Bioanalyzer 2100 à l'aide du kit RNA 6000 Nano (Agilent):

- (1) Concernant les analyses d'ARN de microalgues, le kit RNA 6000 Nano doit être utilisé en appliquant l'analyse pour plantes. Il ne faut pas utiliser l'analyse pour eucaryotes pour tester les ARN de microalgues car elle n'est pas adaptée aux eucaryotes photosynthétiques et considère les ANRr chloroplastiques comme des anomalies conduisant à une absence de calcul du RIN ou à un RIN bas.
- (2) Concernant les analyses d'ARN de bactéries, le kit RNA 6000 Nano doit être utilisé en appliquant l'analyse pour procaryotes. En revanche, il est important de prendre en compte le phénomène de fragmentation de l'ARNr 23S qui est parfois rencontré chez les procaryotes (Evguenieva-Hackenberg, 2005). Cette fragmentation se produit lors



de la maturation de l'ARNr et ne modifierait pas sa fonctionnalité, car elle a lieu dans des zones hypervariables. Cette fragmentation peut différer entre les espèces, mais les tendances ont été observées avec des sites de fragmentation précis et avec parfois une certaine récurrence entre les différents groupes bactériens (Figure 49A). Les sites de fragmentation concernent les hélices 9-10, 25, 45, 46 et le domaine DIII. Cette fragmentation ne reflète en aucun cas un ARN de mauvaise qualité (Figure 49B), mais peut avoir des conséquences sur le calcul du RIN en lui attribuant une valeur basse ou en empêchant son calcul.

Figure 49 : Fragmentation de l'ARNr 23S. (A) Tendances de fragmentation de l'ARNr 23S rencontrées chez différents groupes bactériens (Evguenieva-Hackenberg, 2005). Les longueurs des différents fragments d'ARNr 23S sont en kilobases (kb). L'ARNr 23S intact a une longueur de 2,9kb. (B) Exemple d'ARN de haute qualité, illustrant la fragmentation de l'ARNr 23S : (a) petit ARN incluant l'ARNr 5S et les ARN non codants, (b) deux fragments de l'ARNr 23S d'environ 135pb, (c) deux fragments de l'ARNr 23S d'environ 1300pb, (d) ARNr 16S et (e) ARNr 23S intact (Vercruyse *et al.*, 2010).

4.1.4. Purification des ARN totaux pour obtenir des ARNm bactériens et algaux

Dans les différentes études de transcriptomique traitant des bactéries et des microalgues eucaryotes, un véritable arsenal de techniques utilisant divers kits commerciaux peut être utilisé pour purifier les ARNm. Cependant, en raison de la nature de l'expérience, ces kits ne sont pas forcément adaptés aux organismes étudiés.

4.1.4.1. Elimination des traces d'ADN

La première étape de purification consiste à éliminer les traces d'ADN co-extraits en même temps que les ARN. Ils ne reflètent pas l'expression des gènes et correspondraient donc à des contaminants lors des analyses de transcriptomes. Les kits Turbo-DNase (Ambion, Life Technologies), Turbo DNA-free (Applied Biosystems) ou DNase I (Qiagen) sont couramment employés pour cette étape (Amin *et al.*, 2015; Gifford *et al.*, 2011; Marchetti *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Plusieurs cycles de traitement doivent être appliqués pour éliminer complètement les ADN. Pour vérifier l'efficacité des traitements, une analyse par PCR ciblant un gène d'intérêt (celui de l'ARNr 16S chez les bactéries ou de l'ARNr 18S chez les eucaryotes) ou un dosage des ADN à l'aide d'un fluorimètre (Qubit™, ThermoFisher Scientific) peuvent être réalisés.

4.1.4.2. Diminution de la quantité relative d'ARNr

La seconde étape consiste à diminuer la quantité relative d'ARNr, majoritaire dans l'extrait. Pour cela, des techniques basées sur des principes très variés existent et sont à utiliser en fonction des conditions d'expérimentations et des organismes à analyser.

La technique la plus simple consiste à sélectionner les ARNm en utilisant une propriété commune à de nombreux ARNm eucaryotes et procaryotes, qui est la présence d'une queue polyadénylée (poly-A). En effet, lors de leur formation, une queue poly-A vient s'ajouter en bout de séquence nucléotidique des ARNm. Cependant, chez les procaryotes, cette queue poly(A) est généralement plus courte (15 à 60 résidus adénylés contre 80 à 200 chez les eucaryotes) et associée à une plus faible proportion d'ARNm (1 à 40% des ARNm) (Sarkar, 1997). C'est pourquoi cette propriété est principalement utilisée chez les eucaryotes, pour lesquels divers kits ont été développés comme MicroPoly(A)Purist (Ambion, Life

Technologies), PolyAtract System IV (Promega) ou Oligotex mRNA Mini (Qiagen) et sont utilisés dans les études transcriptomiques traitant des interactions microalgues-bactéries (Amin *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014).

Information pré-requise : particularité des eucaryotes photosynthétiques et de leurs ARNr

Les cellules eucaryotes renferment des ARNr issus de leur noyau (18S, 28S et 5S) auxquels peuvent s'ajouter les ARNr de leurs différents potentiels organites tels que la mitochondrie ou le chloroplaste. En effet, ces deux organites proviendraient d'une endosymbiose entre cellule eucaryote et cellules procaryotes (Chapitre 1, partie 2.1.2.2), d'où la présence de matériel génétique extranucléaire comme des ARNr chloroplastiques et mitochondriaux 16S et 23S, qui viennent s'ajouter aux ARNr nucléaires. Les diatomées étant des eucaryotes photosynthétiques réalisant la respiration, ils sont dotés de mitochondries et d'un ou plusieurs chloroplastes selon les espèces. Par exemple, *C. danicus* est caractérisée par la présence d'un grand nombre de petits chloroplastes, comme en témoigne la Figure 50, et devrait donc présenter d'importantes quantités d'ARNr chloroplastiques.

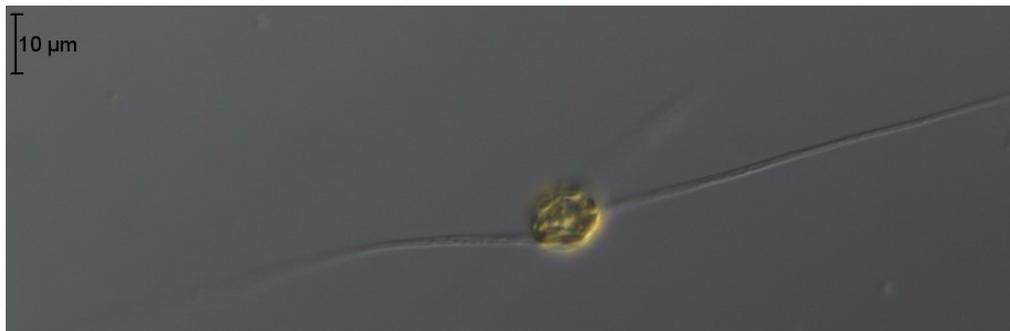


Figure 50 : Cellule de *C. danicus* RCC 2565, obtenue par microscopie optique. Source : Equipe RCC .

Une autre technique consiste à éliminer sélectivement les ARNr en les capturant à l'aide de sondes spécifiques. La principale complexité de cette étape d'élimination des ARNr est due à une adaptation insuffisante des kits de biologie moléculaire pour traiter des bactéries marines ou des eucaryotes photosynthétiques comme les microalgues. En effet, la majorité des kits ont été optimisés pour traiter des organismes types de laboratoire comme *E. coli* chez les bactéries ou l'humain, le rat ou la souris chez les eucaryotes. Parfois des kits plus spécifiques d'eucaryotes photosynthétiques sont développés, mais sont optimisés pour traiter des végétaux types tels qu'*Arabidopsis* ou le maïs *Zea mays*. Quelques exemples sont présentés dans les paragraphes suivants.

(1) Wang *et al.* (2014) ont tenté de purifier les ARNm bactériens contenus dans un mélange dinoflagellés-bactéries en utilisant successivement les kits MICROBEnrich™ et MICROBExpress™ (Ambion, Life Technologies). Le kit MICROBEnrich™ permet de purifier les

ARN bactériens dans un mélange d'ARN bactérien-mammalien en éliminant les ARN mammaliens par capture des ARNr 18S et 28S et des ARNm poly-A à l'aide de billes aimantées. Le kit MICROBExpress™ permet ensuite d'éliminer les ARNr 16S et 23S. Cependant cette approche n'est pas efficace pour éliminer les ARNr car les sondes utilisées dans ces kits n'étaient pas suffisamment adaptées aux ARNr de dinoflagellés. En effet, ces sondes sont optimisées pour des ARNr de mammifères tels que l'humain, la souris ou le rat (groupe des Opisthocontes) et qui sont phylogénétiquement très éloignés des eucaryotes appartenant au groupe des SAR (Figure 7). De plus, elles ne permettent pas d'éliminer les ARNr chloroplastiques ou mitochondriaux contenus dans les cellules microalgales, mais qui sont peut être partiellement éliminées par les sondes spécifiques des ARNr 16S et 23S. Enfin, l'utilisation de sondes qui éliminent l'ensemble des ARNm poly-A élimine à la fois des ARNm eucaryotes et procaryotes, entraînant une perte du matériel d'intérêt. L'étude de Wang *et al.* (2014) a indiqué qu'à l'issue de l'utilisation des deux kits, il restait plus de 90% d'ARNr dans les échantillons. Une étude de Giannoukos *et al.* (2012) comparant différents kits d'élimination de l'ARNr confirmait la faible efficacité du kit MICROBExpress™ sur les trois souches testées (*Prochlorococcus marinus*, *E. coli*, et *Rhodobacter sphaeroides*).

(2) Wang *et al.* (2014) ont également testé le kit Ribo-Zero magnetic (Epicenter) qui semblait plus efficace dans l'élimination des ARNr (Giannoukos *et al.*, 2012). La version de ce kit adaptée à l'élimination des ARNr de bactéries gram négatives a permis d'éliminer 50-70% des ARNr issus d'une mono-culture de *D. shibae*. La version de ce kit adaptée à éliminer les ARNr des feuilles de plantes (ciblant ARNr cytosolique, chloroplastique et mitochondrial) n'a pas permis d'améliorer la purification des ARNm comparativement à la première méthode de Wang *et al.* (2014). La spécificité des sondes utilisées dans ce second kit par rapport aux ARNr du dinoflagellé *Prorocentrum minimum* n'était que de 85% pour les sondes ARNr 18S et 83% pour les sondes ARNr 83S, ce qui expliquerait l'inefficacité de la purification.

(3) Amin *et al.* (2015) ont quant à eux utilisé une méthode d'hybridation soustractive (Stewart *et al.*, 2010). Cette méthode utilise des sondes spécifiques des organismes analysés, qui sont produites en fonction de l'ADN de l'échantillon traité. Cette méthode, qui devrait théoriquement donner des résultats très supérieurs aux tests commerciaux (car sondes plus spécifiques de l'échantillon traité), diminue modérément la quantité relative d'ARNr totaux en passant de 80-88% (échantillon non traité) à 52-61% (échantillon traité) et celle d'ARNr procaryotes de 63-65% à 35-46% (Stewart *et al.*, 2010).

Enfin, la troisième stratégie pour augmenter la quantité relative d'ARNm en amplifiant les ARNm contenu dans l'échantillon d'ARN total avec diverses amorces spécifiques. Le kit Ovation® Complete Prokaryotic RNA-Ses Library Systems (NuGEN) utilise ce procédé et a été utilisé dans diverses études donnant des résultats très variables selon les microorganismes analysés (Giannoukos *et al.*, 2012; Peano *et al.*, 2013).

Pour conclure, il est possible de dire que la stratégie à utiliser dépend essentiellement des microorganismes testés (Tableau 15). Pour purifier les ARNm de microalgue, les techniques utilisant la capture des ARNm poly-A sont privilégiées. Pour purifier les ARNm de bactéries, la situation est plus complexe et diverses techniques d'exclusion des ARNr ou d'amplification des ARNm peuvent être utilisées et auront une efficacité très dépendante des organismes testés vis-à-vis de la spécificité des sondes utilisées dans les différents kits. Cependant, il semblerait que malgré l'utilisation de ces kits, il demeure souvent difficile de purifier efficacement les ARNm en raison de la forte abondance d'ARNr et de la faible spécificité des sondes utilisées dans les kits pour les microorganismes testés. L'étude d'Amin *et al.* (2015) sensiblement proche des conditions dans lesquelles nous travaillions (co-cultures bactéries-diatomées) a choisi l'utilisation d'un protocole d'hybridation soustractive (Stewart *et al.*, 2010), mais n'a pas donné de résultats relatifs à l'efficacité de la technique. Ils semblent avoir privilégié l'analyse d'une grande quantité de cellules pour obtenir des résultats représentatifs des conditions d'expérimentation, en récoltant par exemple 5 fois plus de bactéries issues de co-cultures et 15 fois plus de bactéries issues des mono-cultures que Wang *et al.* (2014).

Tableau 15 : Méthodes de purification des ARNm choisies selon les conditions expérimentales pratiquées dans le cadre de l'étude des interactions entre bactéries et microalgues. *abréviations : Cy (cytoplasmique), Ch (Chloroplastiques), M (mitochondriaux)

Conditions expérimentales	Mono-culture de microalgue ou de bactérie		Co-culture de microalgues et de bactéries	
	ARNm microalgaux	ARNm bactériens	ARNm microalgaux	ARNm bactériens
ARNm à analyser	ARNr microalgaux	ARNr bactériens (Cy)	ARNr microalgaux (Cy, Ch, M) et bactériens (Cy), et ARNm bactériens	ARNr microalgaux (Cy, Ch, M) et bactériens (Cy), et ARNm microalgaux
Méthode de purification des ARNm à utiliser	Capture des ARNm Poly-A (ou Exclusion des ARNr)	Exclusion des ARNr ou Amplification des ARNm	Capture des ARNm Poly-A (ou Exclusion des ARNr)	Exclusion des ARNr ou Amplification des ARNm

4.2. Mise au point de la technique d'obtention d'ARN

Nous avons choisi de confier l'analyse de nos échantillons d'ARN au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, qui offre des services de préparation de banques et de séquençage d'ARN. Pour la mise au point de la technique d'obtention d'ARN réalisée durant la thèse, nous avons donc visé comme objectif d'obtenir des ARN qui correspondaient aux exigences de ce prestataire de service (Tableau 16).

Tableau 16 : Sommaire des conditions à remplir pour la soumission d'échantillons d'ARN au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.

Applications	Quantité minimale (ng)	Concentration minimale (ng/μL)	Volume minimal (μL)	RIN
Expression génique eucaryote	700	50	10-15	>6,5
Expression génique procaryote	2000	100	20-25	>6,5

Nous avons procédé à différentes récoltes de cellules algales et bactériennes à partir de mono-cultures ou de co-cultures, faites sur la diatomée *C. danicus* RCC 2565 et la bactérie *Sulfitobacter* sp. KC39 (gène correspondant à l'ARNr 16S avec 99,9% d'identité avec *Sulfitobacter dubius*). A partir de ces récoltes, nous avons procédé à des extractions d'ARN, suivi de différentes analyses pour déterminer si les échantillons correspondaient aux exigences de la structure de séquençage.

4.2.1. Récolte des cellules

Les microalgues ont été récoltées par filtration par gravité (filtre nylon de 11 μm de porosité et de 47 mm de diamètre) et les bactéries ont été récoltées par filtration (filtre polycarbonate de 0,2 μm et de 47 mm de diamètre). Dans le cas des co-cultures, le filtrat issu de la filtration à 11 μm a été re-filtré à 3 μm avant la récolte de bactéries à 0,2μm. Cette filtration intermédiaire permet de retenir les chloroplastes qui pourraient venir contaminer la récolte de cellules bactériennes. En revanche, une filtration initiale à 3 μm plutôt que 11 μm ne conviendrait pas à la technique car elle augmenterait considérablement le temps de récolte des cellules microalgales, ce qui est un point critique pour le travail sur l'ARN. Les filtres ont ensuite été immédiatement plongés dans un tube de 50 mL contenant 2 mL de Qiazol® (Qiagen), où ils ont été vortexés pendant 2 min. La suspension est ensuite congelée à l'azote liquide puis stockée à -80°C jusqu'à l'extraction. La récolte doit se faire dans un délai de moins de 20 min pour éviter une modification dans l'expression des gènes.

4.2.2. Extraction de l'ARN et élimination des traces de l'ADN co-extrait

Une lyse cellulaire a été opérée en plaçant les tubes contenant les suspensions cellulaires congelées directement sur un thermomixeur avec une incubation de 15 min à 65°C avec une agitation maximale. Ce procédé permet d'ajouter à la lyse chimique due au Qiazol® des lyses thermique et mécanique. Les suspensions cellulaires ainsi lysées ont été centrifugées (14000 g, 1 min, 4°C). L'extraction de l'ARN a ensuite été réalisée à l'aide du kit Direct-zol RNA Mini Prep¹⁷ (Zymo Research), selon les recommandations du fabricant, sans réaliser l'étape de traitement par DNase. Lors de l'étape d'élution, un temps d'attente d'une min a été appliqué avant de procéder à la centrifugation (afin de bien imprégner la matrice de la colonne), puis l'échantillon élué a été déposé une seconde fois sur la colonne dans les mêmes conditions afin d'augmenter la quantité d'ARN éluée. L'ARN a ensuite été aliquoté pour les différentes étapes de contrôle avant d'être stocké à -80°C.

Les traces d'ADN ont été éliminées à l'aide du kit Turbo DNA-free (Ambion) en effectuant plusieurs cycles. A l'issue de ces cycles, une amplification par PCR a été réalisée en ciblant les ARNr 16S et 18S pour les échantillons issus des bactéries et des microalgues, respectivement. Comme le montre la Figure 51, l'extrait d'ARN contient des traces d'ADN et il faut réaliser 4 cycles de Turbo DNases sur les ARN extraits de microalgues et 2 cycles sur ceux extraits de bactéries (donnée non montrée) pour parvenir à éliminer toute trace d'ADN détectable par PCR.

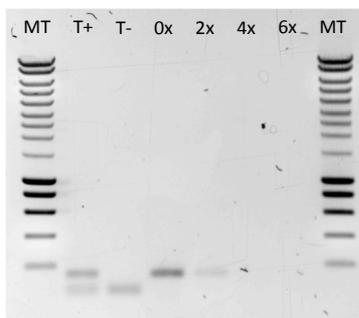


Figure 51 : Analyse de l'efficacité de la Turbo DNase sur un extrait d'ARN obtenu à partir de cellules de *C. danicus* RCC 2565. Un même extrait d'ARN a été aliquoté et traité par 0, 2, 4 et 6 cycles de Turbo DNA-free (0x, 2x, 4x, 6x), avant d'être amplifié par PCR sur la région V9 du gène codant l'ARNr 18S. Les produits d'amplifications ont ensuite été déposés sur le gel d'agarose représenté dans cette figure. Abréviations complémentaires : MT (Marqueur de Taille), T+ (témoin positif contenant de l'ADN bactérien), T- (témoin négatif ne contenant pas d'ADN bactérien).

¹⁷ Le kit d'extraction Direct-zol RNA Mini Prep (Zymo Research) permet de purifier rapidement sur colonne jusqu'à 50µg¹⁷ d'ARN de haute qualité, directement à partir d'échantillon contenant du Qiazol® (ou équivalents comme le Trizol®, etc.). Un des avantages notables de ce kit est l'efficacité d'isolement des petits ARN (17-200nt).

4.2.3. Analyse des ARN extraits

A l'issue des traitements, des résultats satisfaisant les exigences indiquées dans le Tableau 16 ont été obtenus (Tableau 17). La seule exception concerne le calcul du RIN pour l'ARN bactérien, qui n'a pas pu être calculé. Cela est probablement dû à la fragmentation de l'ARNr 23S chez de nombreuses bactéries et en particulier chez les alphaprotéobactéries (Evguenieva-Hackenberg, 2005; Vercruyssen *et al.*, 2010). Cependant, cette absence de calcul du RIN ne semble pas compromettre la qualité, d'autant plus que les électrophorégrammes obtenus pour ces échantillons par le Bioanalyzer 2100 (Agilent) semblent correspondre à des ARN de bonne qualité (Figure 52 et Figure 53).

En ce qui concerne la fragmentation de l'ARNr 23S, nous observons plusieurs fragments observables sur les Figure 52 et Figure 53, avec un fragment minoritaire à 2904pb (qui correspondrait à l'ARNr 23S non fragmenté) et plusieurs fragments majoritaires de 1030 pb, 2000 pb, 137 pb, 160 pb et 2366pb (qui pourraient correspondre à des fragments de l'ARNr 23S). Selon la bibliographie, les alphaprotéobactéries auraient trois sites de fragmentation possibles : hélice 9-10 (vers 130-160pb), hélice 46 (vers 1200pb), domaine III (vers 1420pb). Parmi ces sites, l'hélice 9-10 serait un site de fragmentation toujours rencontré chez les alphaprotéobactéries, ce qui générerait un fragment appelé 5.8S-like rRNA d'environ 120-130pb (Evguenieva-Hackenberg, 2005; Zahn *et al.*, 1999, 2000). Par exemple, chez *Rhodobacter sphaeroides* qui est également une *Rhodobacter-ales/-aceae*, son ARNr 23S est fragmenté au niveau de l'hélice 46 (Kordes *et al.*, 1994). L'ARNr 23S de *Sulfitobacter* sp. KC39 pourrait avoir 2 sites de fragmentations (H9-10 et H46), qui générerait des fragments 137 pb, 1030 pb et 2000 pb, ce qui est proche des observations faites à partir des électrophorégrammes.

Tableau 17 : Analyse quantitative et qualitative des ARN extraits. Abréviations : N/A (pas de RIN calculé).

Type cellulaire	Quantité de cellules traitées	Quantité d'ARN en µg (Nanodrop)	Quantité d'ARN en µg (Agilent)	A260/280 (Nanodrop)	A260/230 (Nanodrop)	RIN (Agilent)
Microalgues	1,5.10 ⁶	14	4	2,03	1,9	7,1
Bactéries	3.10 ⁹	23,9	20,1	2,1	2,2	N/A

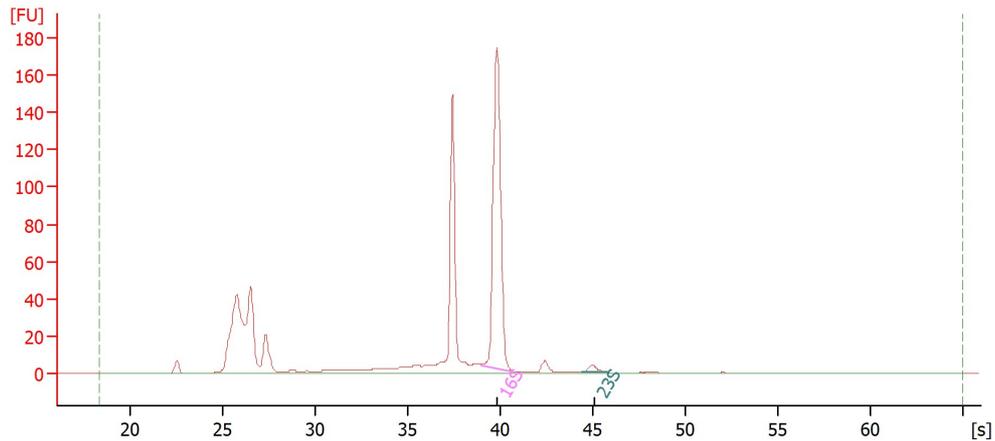


Figure 52 : Analyse Agilent « Prokaryote Total RNA Nano » sur l'ARN bactérien avant Turbo DNase

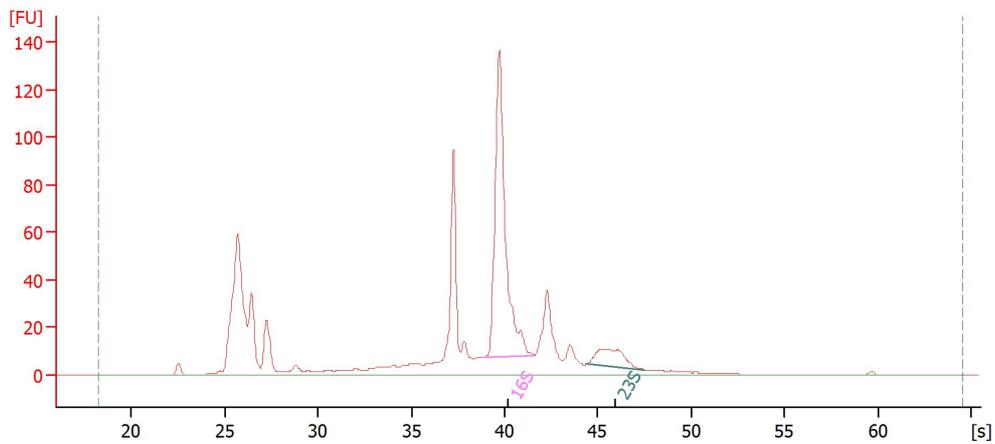


Figure 53 : Analyse Agilent « Prokaryote Total RNA Nano » sur l'ARN bactérien après Turbo DNase

4.2.4. Bilan de la mise au point

Il est important de mettre au point le protocole d'extraction d'ARN pour obtenir des produits correspondant aux critères qualitatifs et quantitatifs requis par la méthode de séquençage utilisée. En ce qui concerne l'ARN microalgale et dans le cadre d'interactions mutualistes, ces critères sont facilement atteignables car la co-culture est réalisée dans des conditions qui optimisent la croissance algale. De plus, les cellules algales génèrent de plus grandes quantités d'ARN que les bactéries en raison de leur plus grande taille. Cela s'est d'ailleurs fait ressentir lors de la mise au point de la technique d'obtention des ARN, où des volumes de récolte nécessaires pour obtenir des quantités d'ARN microalgales suffisantes du point de vue quantitatif et qualitatif n'étaient pas adaptés pour les ARN bactériens et cela,

malgré une plus forte densité cellulaire bactérienne qu'algale. Comme cela a déjà été constaté, il peut être difficile de récolter suffisamment d'ARN bactérien en raison d'une quantité insuffisante de cellules bactériennes (Wang *et al.*, 2014). En effet, le milieu de culture utilisé est favorable à la croissance algale, mais n'optimise pas la croissance bactérienne. Par ailleurs, s'ils sont extraits en même temps, l'ARNr algal présent en forte quantité réduit considérablement l'efficacité de l'extraction de l'ARN bactérien. Les solutions proposées sont dans un premier temps de séparer les cellules algales des cellules bactériennes par filtration, puis de concentrer les cellules bactériennes sur un filtre (Amin *et al.*, 2015). La filtration présente cependant des inconvénients comme un allongement du temps de récolte cellulaire et la modification de la composition des ARNm (variables selon les conditions où sont exposés les cellules), mais ce problème peut être contourné en fractionnant les échantillons filtrés pour ne pas dépasser le temps de récolte recommandé (maximum 20 min). En revanche, la filtration ne permet pas de séparer avec exactitude les microalgues des bactéries, car des chloroplastes (contenant aussi de l'ARN) peuvent être récoltés en même temps que les bactéries libres, mais surtout des bactéries épibiontes peuvent rester attachées dans la fraction algale. Ce dernier élément est particulièrement problématique dans le cadre d'étude d'interactions entre microorganismes physiquement attachés et remet en question l'intérêt de la filtration. Cependant, en raison de la forte proportion d'ARN algal par rapport aux ARN bactériens, il est difficile de procéder autrement pour réussir à obtenir suffisamment de transcrits bactériens. C'est pourquoi, nous avons utilisé la filtration pour récolter les cellules algales et bactériennes.

La principale difficulté a été d'obtenir de l'ARN bactérien qui satisfaisait les critères quantitatifs et qualitatifs. Pour y parvenir, différentes méthodes de lyse cellulaire (pour augmenter la quantité d'ARN extrait) ont été testées en utilisant des billes de lyse, mais aussi un traitement thermique plus fort, sans que les critères qualitatifs et quantitatifs ne s'améliorent. La méthode de filtration a alors été vérifiée pour s'assurer que les cellules étaient correctement triées par des comptages au cytomètre en flux des cellules contenues dans les différents filtrats. Cela nous a permis de voir que l'intégralité des bactéries libres passaient la membrane de 11 μm et étaient bien retenues sur la membrane de 0,2 μm (Tableau 18). Ce comptage réalisé en parallèle sur les cellules algales nous a permis de voir que le filtre 11 μm retenait 97 % des cellules microalgales. Cela nous a permis de conforter

l'idée qu'il était utile d'utiliser un filtre intermédiaire de 3 µm pour retenir les microalgues et chloroplastes restants et les empêcher d'être récoltés en même temps que les bactéries dans le cadre de récolte sur des co-cultures.

Tableau 18 : Concentration cellulaire (en cellules par mL) en bactéries et microalgues dans les différentes fractions de tailles obtenues sans filtration, après filtration à 11µm, à 3µm et à 0,2µm. Les comptages ont été réalisés par cytométrie en flux sur les bactéries et par comptage en cellule de Malassez pour les microalgues.

Type cellulaire	Culture non filtrée	Filtrat < 11µm	Filtrat <3µm	Filtrat <0,2µm
Bactéries	1,7.10 ⁷	1,6.10 ⁷	1,7.10 ⁷	Bruit de fond
Microalgues	3,5.10 ⁴	1,0.10 ³	0	0

Enfin, nous avons augmenté les quantités de cellules bactériennes traitées et avons remarqué que les paramètres de qualité (allure générale de l'électrophorégramme du Bioanalyzer 2100 ainsi que l'allure du spectre d'absorbance et les ratios d'absorbance 260/280 et 260/230 du Nanodrop) des ARN extraits étaient meilleurs lorsque la quantité d'ARN extraite augmentait (Tableau 19).

Tableau 19 : Analyse des ARN bactériens avant (A) et après (B) traitement par DNase, sur différentes quantité de cellules bactériennes. Les paramètres quantitatifs mesurés sur les échantillons après DNase correspondent aux exigences requises par l'entreprise de séquençage.

A	Quantité de cellules bactériennes extraites	Sans DNase			
		Quantité d'ARN en µg (Nanodrop)	Quantité d'ARN en µg (Agilent)	Ratio 260/280	Ratio 260/230
	3,11.10 ⁷	0,8	ND	1,78	0,98
	3,11.10 ⁸	8,0	4,72	1,91	1,72
	3,11.10 ⁹	37,3	15,8	2,03	2,1
B	Quantité de cellules bactériennes extraites	Avec 2 cycles de DNase			
		Quantité d'ARN en µg (Nanodrop)	Quantité d'ARN en µg (Agilent)	Ratio 260/280	Ratio 260/230
	3,11.10 ⁷	ND	ND	ND	ND
	3,11.10 ⁸	4,7	3,2	2,0	1,8
	3,11.10 ⁹	23,9	20,16	2,1	2,2

7. Conclusion

Les expériences de co-culture ont mis en évidence que *T. delicatula* RCC 2560 avait une croissance généralement meilleure que *C. danicus* RCC 2565 en absence de bactérie. Cependant, les différences de croissance algales entre les mono-cultures de microalgue axénique et les co-cultures microalgues-bactéries n'étaient pas très importantes. La répétition des expériences, et aussi l'augmentation des volumes de culture a mis en évidence que l'effet des bactéries sur la croissance algale n'était pas suffisamment fort et reproductible. Ainsi, nous n'avons pas pu poursuivre l'exploration des interactions par une analyse transcriptomique.

En revanche, nous avons mis en évidence que *C. danicus* RCC 2565 présentait une croissance assez fluctuante en absence de bactérie, mais que l'ajout de bactéries permettait de générer une croissance répétable. Nous avons également établi que les bactéries épibiontes associées spécifiquement à un hôte algal n'exerçaient pas forcément d'influence spécifique sur le développement de leur hôte algal d'origine. Par ailleurs, ces expériences ont permis de générer des cultures de microalgues axéniques pérennes (cultures maintenues depuis plus d'un an), qui sont toujours exploitables pour de futures analyses. Ce travail fut également l'occasion de s'intéresser aux modalités d'obtention d'ARN à partir de co-culture microalgues-bactéries. La technique permettant d'obtenir ces ARN a été mise au point et pourra être employée pour de futures analyses. Des expériences de co-cultures sont en cours pour permettre d'identifier un couple microalgue-bactérie dont les interactions mériteront une exploration par analyse transcriptomique.

CHAPITRE 5

Discussion générale et perspectives

Au cours de cette thèse, l'étude des interactions entre bactéries et microalgues dans l'environnement marin a permis de déterminer et de comparer la diversité des communautés bactériennes épibiontes de diatomées ubiquistes issues de cultures et de l'environnement naturel (Chapitre 2). Les différents isolats de bactéries épibiontes ont révélé une importante nouveauté taxonomique, ce qui a conduit à analyser plus en détail les souches correspondant à des nouveaux taxons (Chapitre 3). Enfin, l'impact des bactéries épibiontes sur les microalgues a été étudié par des co-cultures dans le but d'identifier des interactions fortes qui pourront être explorées par transcriptomique (Chapitre 4). Les résultats issus de ces différents chapitres sont discutés et différentes perspectives sont proposées pour approfondir l'étude initiée à travers cette thèse.

1. Sélection des microalgues d'intérêt, de nouveaux éléments à considérer

L'une des difficultés rencontrées au cours de cette thèse a été de retrouver dans les échantillons naturels les mêmes espèces de microalgues que celles utilisées en culture. Seules des cellules appartenant aux mêmes genres algaux ont pu être retrouvées. En effet, lors de l'isolement des cellules par micropipetage au microscope optique, il est possible d'identifier celles correspondant aux genres *Chaetoceros* et *Thalassiosira*. Par contre, l'identification des cellules au niveau de l'espèce est plus délicate. Par exemple *C. danicus* est une espèce aisément identifiable par microscopie optique, alors que *T. delicatula* n'est identifiable que sur la base de critères morphologiques impossibles à analyser en microscopie optique. Malheureusement, *C. danicus* est peu abondante dans les eaux côtières de Roscoff (d'après la base de données des suivis phytoplanctoniques réalisés à SOMLIT-Astan entre 2000 et 2013). Il n'a jamais été possible de réisoler cette espèce malgré de très nombreux prélèvements réalisés à différentes périodes de l'année.

Par ailleurs, des différences hautement significatives ont été relevées entre les communautés de bactéries épibiontes issues de *C. danicus* RCC 2565 et de *T. delicatula* RCC 2560. Ces résultats suggèrent que les bactéries épibiontes pourraient être spécifiques d'une microalgue mais sans définir le rang taxonomique où pourrait se positionner cette spécificité (genre, espèce, souche algale). Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de comparer les communautés de bactéries épibiontes issues de différentes espèces appartenant aux

genres *Chaetoceros* et *Thalassiosira*, et à différentes souches correspondant d'une même espèce. Différentes cultures correspondant à des diatomées isolées des eaux côtières de Roscoff et correspondant aux genres *Chaetoceros* et *Thalassiosira* sont disponibles à la collection de culture de Roscoff (Tableau 20). Selon l'étude d' Amin *et al.* (2015), différentes souches appartenant à l'espèce *P. multiseriis*, ayant différentes origines géographiques (Océan Pacifique et Atlantique) ont montré une composition assez variée de leur communauté bactérienne associée. Dans cette étude, la spécificité des bactéries associées à une microalgue pourrait être liée à la souche algale et à son origine géographique.

Tableau 20 : Microalgues de la collection de culture de Roscoff correspondant aux genres *Chaetoceros* et *Thalassiosira*, en plus des souches étudiées durant cette thèse (RCC 2565 et RCC 2560) et qui ont été isolées dans les eaux côtières de Roscoff.

RCC #	Genre	Espèce	Nom de souche	Date d'isolement
1717	<i>Chaetoceros</i>	<i>diadema</i>	RA080513-06	13/05/2008
2023	<i>Chaetoceros</i>	<i>peruvianus</i>	RA090716-01	01/09/2010
2564	<i>Chaetoceros</i>	sp.	RA110113-4F2	31/01/2011
4208	<i>Chaetoceros</i>	sp.	MACUMBA-SC3	16/10/2013
778	<i>Thalassiosira</i>	<i>rotula</i>	I 9	06/04/2004
780	<i>Thalassiosira</i>	sp.	I 12	06/04/2004
1714	<i>Thalassiosira</i>	sp.	RA080513-03	13/05/2008
1861	<i>Thalassiosira</i>	sp.	RA090120-03	21/01/2009
1864	<i>Thalassiosira</i>	sp.	RA090205-01	05/02/2009
1867	<i>Thalassiosira</i>	sp.	RA090205-04	05/02/2009
2562	<i>Thalassiosira</i>	sp.	RA110113-4C1	31/01/2011

2. Bactéries et diatomées : et si l'union faisait la force ?

Avec une contribution équivalente à celle des forêts tropicales, les diatomées sont les microorganismes eucaryotes photosynthétiques qui contribuent le plus à la production primaire sur Terre. Actuellement, différentes hypothèses sont avancées pour expliquer de telles performances énergétiques. Leur paroi cellulaire si particulière, mais aussi leur cycle de vie ou encore leur machinerie photosynthétiques sont notamment au cœur de nombreuses théories. Cependant, d'autres facteurs peuvent également entrer en ligne de compte. Une étude de Li *et al.* (2014) présente différents mécanismes dits de « facilitation » qui améliorent la productivité des plantes, grâce à des interactions inter-espèces à effet positifs. Ces interactions peuvent inclure des organismes rendant accessibles certains substrats ou alors éliminant les compétiteurs potentiels ou les prédateurs. Ces interactions peuvent notamment

permettre à un organisme de survivre face à un stress biotique ou abiotique trop intense. La persistance de certaines interactions peut conduire à une évolution génomique des organismes, modulant potentiellement la structure et le fonctionnement des écosystèmes (Andrade-Domínguez *et al.*, 2014). A travers cette thèse, nous avons mis en évidence une forte spécificité de la diversité bactérienne attachée aux diatomées. Certaines études sont allées plus loin et ont mis en évidence, chez certaines diatomées, des exemples d'évolution du génome due à une association symbiotique avec une bactérie (Helliwell *et al.*, 2011; Kazamia *et al.*, 2012). Cet exemple renforce la théorie du fort impact des bactéries sur le développement et même l'évolution des diatomées. De plus, les analyses des génomes des diatomées a révélé que *P. tricornutum* possédait 5% de gènes d'origine bactérienne acquis après l'endosymbiose secondaire (Bowler *et al.*, 2008) et qu'il pourrait s'agir de l'organisme eucaryote séquencé présentant la plus forte permissivité aux transferts de gènes horizontaux bactériens. Ces gènes auraient apporté de nouvelles capacités métaboliques aux diatomées, et auraient des origines multiples (protéobactéries, archées et cyanobactéries). Ainsi, en influençant leur évolution, les bactéries auraient contribué à façonner les diatomées. Cependant, peu de génomes de diatomées ont été analysés et l'étude d'un plus grand nombre de génomes mais aussi de métagénomes pourrait permettre de mieux comprendre de l'évolution de ces microalgues (Bhattacharya *et al.*, 2015; Graham *et al.*, 2015) et le rôle des bactéries dans cette évolution.

3. Comment expliquer l'apparente spécificité des taxons bactériens vis-à-vis des taxons microalgaux ?

Les cultures de *C. danicus* RCC 2565 et *T. delicatula* RCC 2560 proviennent de cellules algales isolées à partir d'un même échantillon d'eau de mer, collecté au large de Roscoff le 31/01/2011. Et si l'on compare la communauté de bactéries épibiontes isolés de *C. danicus* RCC 2565 et celle de *T. delicatula* RCC 2560, il est possible de remarquer qu'il y a moins de diversité dans la première que dans la seconde. De plus, même s'il existe une certaine constance dans les classes bactériennes rencontrées, la composition des communautés est différente à l'échelle des espèces. Il s'agit donc de deux cultures de microalgues ayant la même provenance, mais la différence dans la diversité et la composition des communautés bactériennes épibiontes des deux microalgues laisse penser qu'il y aurait eu une influence

algale sur la communauté bactérienne. En effet, la phycosphère des microalgues est un environnement très influencé par le métabolisme algal et les signaux chimiques émis. Ces signaux sont la base de la communication chez les organismes microscopique et sont propres à chaque espèce. En effet, les diatomées sont des organismes biominéralisants. Elles produisent des complexes biochimiques, spécifiques à chaque espèce, dans les vésicules de dépôt de silice qui permettent de façonner les ornements de leur paroi cellulaire (Stonik & Stonik, 2015). Par ailleurs, dans le cycle de reproduction des diatomées, la production d'une molécule (la diproline) induisant une attraction spécifique des partenaires sexuels a été mise en évidence (Frenkel *et al.*, 2014; Moeys *et al.*, 2016). Il est donc possible d'envisager que de tels mécanismes existent entre bactéries et microalgues, permettant une attraction spécifique de certains taxons bactériens. Il n'est pas non plus exclu que les bactéries soient sensibles à ces molécules d'attraction normalement impliquées dans la reproduction sexuée. En effet, la capacité des bactéries à capter les composés émis par des plantes ou des animaux suggère qu'un même phénomène pourrait exister avec les bactéries marines associées aux diatomées. D'ailleurs, des mécanismes de chimiotactisme entre microalgues et bactéries ont déjà été mis en évidence (Miller *et al.*, 2004), où les attractants algaux forts correspondaient à des acides aminés et des métabolites du DMSP. Cependant il existe peu d'informations sur ces mécanismes régissant l'attraction chimique des bactéries par les microalgues, et surtout concernant la spécificité de ces signaux entre différents partenaires algaux et bactériens. A l'inverse, il est possible que des signaux émis par bactéries induisent des réponses chez les microalgues. La majorité des recherches faites sur la communication inter-règne dans l'environnement terrestre s'est intéressée aux effets des molécules bactériennes du QS (et en particulier des HLA) sur les organismes eucaryotes (Hughes & Sperandio, 2008). Une grande diversité de signaux spécifiques aux différentes espèces bactériennes permet des communications intercellulaires variées. Par exemple, chez les végétaux, une bactérie va émettre un signal spécifique qui va moduler l'expression des gènes des végétaux. Ces signaux permettent notamment aux végétaux de distinguer bactéries pathogènes des bactéries non pathogènes, et d'éventuellement déclencher des mécanismes de protection. L'analyse des génomes de diatomées suggère l'existence de plusieurs régions impliquées dans la réponse ou la liaison aux molécules de types HLA émises par les bactéries (Amin *et al.*, 2012). Très peu de communications inter-règnes ont été décrites entre les bactéries et les microalgues, mise à part l'action pathogène d'une bactérie sur un coccolithophoridé, par l'intermédiaire de d'HHQ

(Harvey *et al.*, 2016). Par ailleurs, le fait que les deux microalgues n'aient pas sélectionné les mêmes espèces bactériennes pourrait s'expliquer par des mécanismes physico-chimiques cellulaires différents impliquant des actions antagonistes, comme la sécrétion de composés antibactériens différents (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2010; Viso *et al.*, 1987), ou encore la promotion d'espèces bactériennes capables d'un antagonisme anti-bactérien fort (Gram *et al.*, 2010; Long & Azam, 2001). Pour tester ces hypothèses, il serait intéressant d'étudier s'il existe des antagonismes entre les différentes bactéries épibiontes isolées des deux cultures algales, mais aussi d'analyser l'action des microalgues axéniques sur la croissance des bactéries issues des différentes cultures. Identifier des signaux et leurs molécules cibles pourraient conduire à mieux caractériser les interactions entre bactéries et diatomées, et aussi à expliquer l'apparente spécificité qui existe dans la composition des bactéries épibiontes associées à chaque microalgue.

D'autres hypothèses peuvent expliquer la spécificité rencontrée dans les études d'interactions entre bactéries et microalgues. Il est possible d'envisager que cette spécificité soit due à un sous-échantillonnage des populations algales. En effet, lors des études de diversité, pour être représentatif des associations bactéries-microalgue auxquelles on s'intéresse, il est crucial d'analyser un grand nombre de cellules algales afin de détecter le maximum de taxons bactériens différents et de ne pas omettre les taxons rares. Or la technique d'isolement des bactéries épibiontes par micropipetages successifs des cellules algales ne permet pas d'analyser de grandes quantités d'organismes, comparativement à la filtration. Ainsi, un échantillonnage de trop petite taille augmente la probabilité de détecter des taxons différents, pouvant conduire à des conclusions hâtives de spécificité des associations.

4. La richesse taxonomique des bactéries épibiontes

Les résultats du chapitre 3 font état de l'important intérêt taxonomique des bactéries isolées de la surface de cellules algales. En tenant compte de l'écart considérable existant entre la diversité bactérienne totale et la diversité bactérienne cultivée, l'isolement de nouveaux taxons est devenu un enjeu majeur pour les microbiologistes.

Les analyses phylogénétiques présentées dans le chapitre 3 ont été réalisées à partir de séquences partielles du gène codant l'ARNr 16S qui faisait 800 à 900 pb, ce qui constitue une taille de séquence suffisamment informative pour la classification bactérienne et ainsi identifier les souches présentant un intérêt taxonomique. Cependant, pour confirmer cette position et surtout déterminer plus précisément les différences avec la séquence nucléotidique des bactéries décrites les plus proches, il serait intéressant d'obtenir une séquence codant l'ARNr 16S de plus de 1300pb. Ensuite, les caractéristiques distinctives de ces différentes souches devront être déterminées par rapport aux plus proches bactéries décrites (morphologie, activité enzymatique, etc.), comme cela a été le cas pour *Silicimonas algicola* KC90B^T, afin de décrire ces nouveaux taxons.

Différents éléments peuvent justifier l'importante proportion de souches d'intérêt taxonomique. Comme mentionné dans la partie 3 de ce chapitre, chaque espèce algale crée au niveau de sa phycosphère un environnement physique et chimique qui lui est propre. Cet environnement permet l'attraction et le développement de souches bactériennes spécifiques. De plus, il a été démontré que différentes espèces de microalgues émettaient des composés antibactériens distincts, comme le montre l'étude de Viso *et al.* (1987) sur différentes espèces appartenant au genre *Chaetoceros*. Isoler des bactéries issues de ces environnements particuliers, qui sont très différents de l'eau de mer environnante, permet donc de cibler des souches nouvelles. Par ailleurs, dans cette étude, nous nous sommes intéressés à des espèces de diatomées dont le microbiote épibionte n'avait pas été analysé. En effet, les diatomées majoritairement étudiées correspondent aux espèces dont le génome est séquencé (*Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Pseudo-nitzschia multiseriis* ou *Fragilariopsis cylindrus*) ou qui sont retrouvées dans les efflorescences algales (*Phaeocystis globosa* par exemple).

Par ailleurs, nous avons rencontré une certaine difficulté à maintenir certains isolats bactériens sur du long terme. Les conditions d'isolement et de culture employées miment les conditions environnementales (salinité, pH, éléments traces, etc.). Cependant, il est possible que le milieu utilisé ne soit pas complètement adapté à la croissance des bactéries épibiontes isolées. Pour pallier ce problème, l'utilisation de co-cultures de ces bactéries avec des cultures axéniques de leur hôte algal initial pourrait permettre de maintenir plus durablement les

cultures bactériennes. En effet, la co-culture fait partie des stratégies actuellement privilégiées pour élargir la gamme de bactéries cultivables (Stewart, 2012; Vartoukian *et al.*, 2010). Dans ce contexte, les co-cultures impliquent une souche auxiliaire (ou « helper strain ») qui apporte un facteur de croissance indispensable à la souche bactérienne difficile à cultiver. La finalité de ces co-cultures est d'identifier les molécules responsables de la promotion de la croissance, dans l'optique de les synthétiser afin que la souche dépendante puisse se développer indépendamment dans un milieu supplémenté en cette molécule de synthèse. Ce type de démarche a déjà été réalisé entre différentes bactéries avec la mise en évidence de facteurs de croissance tels que des HLA (Bruns *et al.*, 2002). Ces stratégies de co-cultures ont souvent été envisagées entre deux souches bactériennes. Cependant, grâce aux découvertes faites sur la signalisation inter-règne, les stratégies de co-culture promouvant la croissance bactérienne pourraient s'étendre aux co-cultures entre bactéries et eucaryotes.

Par ailleurs, en plus de découvrir de nouveaux taxons bactériens, s'intéresser aux bactéries épibiontes pourrait aussi permettre de cibler des micro-organismes d'intérêt écologique et économique. En effet, parmi les bactéries pélagiques, il est reconnu que les bactéries associées à des particules, que ce soit grâce à leur mécanismes de mobilité et/ou d'attachement, sont celles qui interagissent de façon privilégiée avec le phytoplancton, mais sont aussi celles qui exercent la plus forte activité (Long & Azam, 2001). Une étude approfondie des composés actifs produits par les bactéries est devenue un enjeu majeur pour les écologistes, dans la compréhension des mécanismes régissant le fonctionnement des écosystèmes. En parallèle, cet intérêt est partagé par les industriels qui tendent à innover en découvrant et produisant des molécules d'intérêt pour la cosmétique, la pharmaceutique ou encore l'agro-alimentaire et l'agronomie. Dans ce contexte, les bactéries épibiontes, qui sont actuellement sous-exploitées tant par les écologistes que par les industriels, pourraient bien devenir des organismes clés apportant des réponses et solutions à de nombreuses problématiques contemporaines.

5. Identification d'interactions fortes

A travers le chapitre 4, nous avons tenté d'identifier des bactéries épibiontes ayant un fort impact sur le développement des microalgues testés. A l'issue de différents tests de co-cultures, aucune amélioration ou inhibition forte et répétable n'a été mise en évidence chez les microalgues co-cultivées avec les bactéries par rapport aux microalgues axéniques. Différents éléments peuvent expliquer ce constat.

Dans un premier temps, il faut considérer l'origine des microalgues, qui ont été isolées sans tenir compte des bactéries apportées dans le milieu. Il s'agit de cultures monoclonales de microalgues isolées avec un ensemble de bactéries libres et potentiellement quelques bactéries attachées. Sachant que peu de microalgues possèdent des bactéries attachées à leur paroi cellulaire, il est possible que lors du prélèvement initial de l'eau de mer, seules des bactéries libres aient été collectées. En émettant l'hypothèse que, dans l'environnement pélagique, la faible densité cellulaire implique que les interactions fortes soient favorisées par un attachement, cet isolement a potentiellement permis de collecter exclusivement des bactéries libres qui n'avaient pas d'interaction (positive ou négative) avec la microalgue. Dans les cultures de microalgues, les densités cellulaires en microalgues et bactéries sont plus fortes que dans l'environnement pélagique (à l'exception des zones d'efflorescences), ce qui favorise les rencontres et augmente la proportion de microalgues colonisées par des bactéries épibiontes. De plus, dans les expériences de co-cultures, les bactéries testées correspondaient aux épibiontes de seulement deux cultures algales monoclonales et n'ont pas montré d'effet important et répétable sur la croissance algale. Pour tenter d'identifier une interaction forte, il serait intéressant de tester des bactéries épibiontes issues d'autres microalgues, comme celles isolées des différentes cellules algales prélevées dans l'eau de mer naturelle. Une autre stratégie consisterait à isoler des cellules algales sans les bactéries libres, par la méthode de micropipetages successifs, et de cultiver cette fois la cellule algale et ses potentiels épibiontes comme réalisé par Sapp *et al.* (2007b), plutôt que de n'isoler que les bactéries épibiontes. En procédant de la sorte, les microalgues cultivées correspondraient soit à des cultures axéniques, soit à des cultures xéniques dont les bactéries auraient toutes une origine épibionte. En revanche, étant donné la versatilité du comportement de certaines bactéries (Seyedsayamdost *et al.*, 2011a; Wang *et al.*, 2014), il n'est pas exclu que des bactéries

épibiontes présentant des comportements de type « Jekyll-and-Hyde » soient co-isolées. Mais en multipliant les isollements de cellules algales et leur mise en culture, la probabilité de rencontrer des microorganismes présentant des interactions fortes serait augmentée.

Dans un deuxième temps, il faut aussi considérer les conditions de cultures appliquées lors des expériences de co-culture. Nous avons choisi de conserver les conditions dans lesquelles les microalgues étaient cultivées pour garder le maximum de constance dans les paramètres abiotiques. Le but de l'opération étant d'étudier les interactions entre bactéries et microalgues dans un environnement stable, il ne fallait pas que les paramètres abiotiques rentrent en considération dans l'interprétation des réponses cellulaires. Cependant, cette stratégie peut soulever d'autres problématiques.

(i) En effet, la composition du milieu et notamment la présence de vitamines est un élément potentiellement apporté par les bactéries dans l'environnement marin. Supplémenter le milieu de culture en vitamines conduit donc à masquer la potentielle dépendance de la microalgue pour les bactéries capable de synthétiser ces composés. L'étude de Wang *et al.* (2014) illustre bien ce phénomène. En effet, la dépendance des microalgues vis-à-vis d'une source exogène de vitamines est un élément qui a été démontré pour plusieurs espèces algales, dont *T. pseudonana* (Croft *et al.*, 2006). Les bactéries joueraient un rôle important dans l'apport de vitamines à ces microalgues (Croft *et al.*, 2005), mais aussi envers les microalgues auxotrophes vis-à-vis de ce composés, qui utiliseraient préférentiellement la vitamine exogène (Kazamia *et al.*, 2012). Ce dernier constat appuie l'hypothèse que la dépendance en vitamine de certaines microalgues pourrait être due à une symbiose entre microalgue auxotrophe et une bactérie ayant conduit à une perte d'un gène impliqué dans la synthèse de vitamine chez l'hôte algal (Helliwell *et al.*, 2011; Kazamia *et al.*, 2012). L'hypothèse de la perte de l'auxotrophie vis-à-vis de la vitamine B12 a récemment été démontrée par une étude impliquant l'évolution d'une microalgue auxotrophe dans un milieu enrichi en vitamine sur plus de 500 générations (Helliwell *et al.*, 2015). Ainsi, les organismes présentant une dépendance vis-à-vis de la vitamine B12 seraient probablement des organismes présentant des interactions fortes avec les bactéries, qui sont les principales productrices de ce composé dans l'environnement marin.

(ii) Ensuite, l'ensemble des paramètres appliqués (nutriments, lumière, température, salinité, etc.) ont été maintenus constant pendant toute la durée des expériences. Ces

conditions ne miment pas les différents stress abiotiques auxquels sont confrontées les microalgues dans l'environnement naturel, et masquent les potentiels impacts que les bactéries peuvent avoir sur la résistance au stress des microalgues. Par exemple, une étude a mis en évidence le rôle mutualiste entre bactéries et microalgue, qui se produisait uniquement lors d'un stress thermique (Xie *et al.*, 2013). Moduler séparément les différents paramètres abiotiques permettrait éventuellement d'observer des interactions améliorant la résistance algale. Dans un contexte de réchauffement climatique et d'acidification des océans, s'intéresser aux interactions microbiennes pourrait permettre de faire des prévisions quant au devenir de ces microorganismes, premiers maillons des réseaux trophiques (Scholz *et al.*, 2016). A l'heure actuelle, les effets des changements climatiques sur les interactions entre bactéries et diatomées ne sont par exemple pas connus. Etant donné leur importance écologique actuelle, il devient urgent de mieux connaître le devenir de ces microorganismes face à l'accélération des changements climatiques planétaires.

(iii) Enfin, les expériences de co-culture ont consisté à moduler seulement deux paramètres abiotiques (1 souche algale et 1 souche d'épibionte bactérien). La possibilité que les bactéries aient un impact lors de co-culture avec des organismes potentiellement nocives (pathogène, prédateur, compétiteur) pour la microalgue n'est cependant pas écartée. En effet, les bactéries sont connues pour exercer des actions antagonistes vis-à-vis d'autres bactéries (Long & Azam, 2001) ou virus (Tomaru *et al.*, 2015), mais peuvent aussi produire des toxines à action spécifique vers certaines espèces algales (Lovejoy *et al.*, 1998). Ajouter d'autres organismes dans les expériences permettrait peut être de mettre en évidence des interactions facilitant la résistance algale. Des espèces appartenant au genre *Sulfitobacter* ont par exemple été identifiées comme capable d'apporter une résistance à la diatomée *Chaetoceros tenuissimus* face aux virus (Kimura & Tomaru, 2014). Il s'agit d'un genre bactérien retrouvé dans plusieurs cultures de diatomées étudiées dans cette thèse (*C. danicus* RCC 2565 et *Skeletonema* sp. RCC 1866). Les mécanismes impliqués dans cette résistance aux virus restent assez obscures, même s'il existe des hypothèses concernant l'implication de certaines voies métaboliques biochimiques, notamment par l'intermédiaire de molécules impliquées dans le QS (Ng & Bassler, 2009) ou de molécules de reconnaissance des pathogènes (Ausubel, 2005). Explorer cette voie afin d'élucider les mécanismes cellulaires impliqués dans cette résistance virale pourrait donc se révéler très intéressante, d'autant plus que l'étude des virus

de diatomées est une thématique étudiée à Roscoff et que dans ce cadre plusieurs virus de diatomées ont déjà été isolés dans les eaux côtières de Roscoff.

Nous avons mis en évidence une certaine stabilité de la réponse algale dans les expériences de co-cultures menées dans un environnement homogène, favorisant le développement algal. Il serait intéressant de moduler certains paramètres de culture (abiotiques ou biotiques) pour générer un environnement moins favorable, afin de voir si la présence de bactéries influe sur la résistance de l'algue à ces stress. Les différentes perspectives proposées dans ce chapitre sont autant de pistes qui pourront être explorées ultérieurement. Comme mentionné dans le chapitre 4, de plus amples analyses de co-cultures sont en cours, pour permettre d'identifier des interactions fortes. De plus, le génome de la souche *Silicimonas algicola* KC90B^T, caractérisée dans le chapitre 3, est en cours de séquençage. Il s'agit d'une bactérie retrouvée à de nombreuses reprises sur la surface de *T. delicatula* RCC 2560, et l'analyse de son génome pourrait permettre d'émettre des hypothèses sur les éventuelles fonctions métaboliques qu'elle pourrait exercer dans le cadre d'interactions avec les microalgues.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abby, S. S., Touchon, M., De Jode, A., Grimsley, N. & Piganeau, G. (2014).** Bacteria in *Ostreococcus tauri* cultures - friends, foes or hitchhikers? *Front Microbiol* **5**, 505.
- Acinas, S. G., Antón, J. & Rodríguez-Valera, F. (1999).** Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **65**, 514–522.
- Adachi, M., Kanno, T., Okamoto, R., Itakura, S., Yamaguchi, M. & Nishijima, T. (2003).** Population structure of *Alexandrium* (*Dinophyceae*) cyst formation-promoting bacteria in Hiroshima Bay, Japan. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6560–6568.
- Afi, L., Metzger, P., Largeau, C., Connan, J., Berkaloff, C. & Rousseau, B. (1996).** Bacterial degradation of green microalgae: incubation of *Chlorella emersonii* and *Chlorella vulgaris* with *Pseudomonas oleovorans* and *Flavobacterium aquatile*. *Org Geochem* **25**, 117–130.
- Agogué, H., Casamayor, E. O., Bourrain, M., Obernosterer, I., Joux, F., Herndl, G. J. & Lebaron, P. (2005).** A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* **54**, 269–280.
- Agogué, H., Mallet, C., Orvain, F., De Crignis, M., Mornet, F. & Dupuy, C. (2014).** Bacterial dynamics in a microphytobenthic biofilm: a tidal mesocosm approach. *J Sea Res* **92**, 36–45. Elsevier B.V.
- Agusti, S., González-Gordillo, J. I., Vaqué, D., Estrada, M., Cerezo, M. I., Salazar, G., Gasol, J. M. & Duarte, C. M. (2015).** Ubiquitous healthy diatoms in the deep sea confirm deep carbon injection by the biological pump. *Nat Commun* **6**.
- Ahamed, S. A. K., Kim, J.-J., Choi, T.-O. & Choi, T.-J. (2015).** Growth promotion of *Pavlova viridis* by bacteria isolated from the microalga. *J Life Sci* **25**, 568–576.
- Akagawa-Matsushita, M., Matsuo, M., Koga, Y. & Yamasato, K. (1992).** *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 621–627.
- Alavi, M., Miller, T., Erlandson, K., Schneider, R. & Belas, R. (2001).** Bacterial community associated with *Pfesteria*-like dinoflagellate cultures. *Environ Microbiol* **3**, 380–396.
- Albertsen, M., Hugenholtz, P., Skarshewski, A., Nielsen, K. L., Tyson, G. W. & Nielsen, P. H. (2013).** Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat Biotechnol* **31**, 533–8.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.
- Alverson, A. J., Jansen, R. K. & Theriot, E. C. (2007).** Bridging the Rubicon: phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. *Mol Phylogenet Evol* **45**, 193–210.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143–169.
- Amaro, A. M., Fuentes, M. S., Ogalde, S. R., Venegas, J. a. & Suárez-Isla, B. a. (2005).** Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *J Eukaryot Microbiol* **52**, 191–200.

- Amin, S. A., Parker, M. S. & Armbrust, E. V. (2012).** Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 667–684.
- Amin, S. A., Hmelo, L. R., van Tol, H. M., Durham, B. P., Carlson, L. T., Heal, K. R., Morales, R. L., Berthiaume, C. T., Parker, M. S. & other authors. (2015).** Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature* **522**, 98–101.
- Amin, S. A., Green, D. H., Hart, M. C., Küpper, F. C., Sunda, W. G. & Carrano, C. J. (2009).** Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17071–17076.
- Amzil, Z., Fresnel, J., Le Gal, D. & Billard, C. (2001).** Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima*. *Toxicon* **39**, 1245–1251.
- Anderson, D. M., Glibert, P. M. & Burkholder, J. M. (2002).** Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, compositions, and consequences. *Estuaries* **25**, 704–726.
- Andrade-Domínguez, A., Salazar, E., Vargas-Lagunas, M. del C., Kolter, R. & Encarnación, S. (2014).** Eco-evolutionary feedbacks drive species interactions. *ISME J* **8**, 1041–1054.
- Armbrust, E. V., Berges, J. a, Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E. & other authors. (2004).** The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* **306**, 79–86.
- Armbrust, E. V. (2009).** The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* **459**, 185–192.
- Armbrust, E. V. & Chisholm, S. W. (1992).** Patterns of cell size change in a marine centric diatom: variability evolving from clonal isolates. *J Phycol* **28**, 146–156.
- Austin, B., Baudet, E. & Stobie, M. (1992).** Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetrasetimis suecica*. *J Fish Dis* **15**, 55–61.
- Ausubel, F. M. (2005).** Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* **6**, 973–979.
- Azam, F. & Malfatti, F. (2007).** Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Microbiol* **5**, 782–791.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F. & Gordon, J. I. (2004).** The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15718–15723.
- Bagatini, I. L., Eiler, A., Bertilsson, S., Klaveness, D., Tessarolli, L. P. & Vieira, A. A. H. (2014).** Host-specificity and dynamics in bacterial communities associated with bloom-forming freshwater phytoplankton. *PLoS One* **9**, e85950.
- Bagwell, C. E., Abernathy, A., Barnwell, R., Milliken, C. E., Noble, P. A., Dale, T., Beauchesne, K. R. & Moeller, P. D. (2016).** Discovery of bioactive metabolites in biofuel microalga that offer protection against predatory bacteria. *Front Microbiol* **7**, 516.
- Bailleul, B., Berne, N., Murik, O., Petroustos, D., Prihoda, J., Tanaka, A., Villanova, V., Bligny, R., Flori, S. & other authors. (2015).** Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms. *Nature* **524**, 366–369.
- Baker, K. H. & Herson, D. S. (1978).** Interactions between the diatom *Thalassiosira pseudonana* and an associated *Pseudomonad* in a mariculture system. *Appl Environ Microbiol* **35**, 791–796.
- Baker, L. & Kemp, P. (2014).** Exploring bacteria–diatom associations using single-cell whole genome amplification. *Aquat Microb Ecol* **72**, 73–88.

- Bates, S. S., Douglas, D. J., Doucette, G. J. & Léger, C. (1995).** Effects of reintroducing bacteria on domoic acid production by axenic cultures of the diatom *Pseudonitzschia multiseries*. *Nat Toxins* **3**, 428–435.
- Bates, S. S., Gaudet, J., Kaczmarzka, I. & Ehrman, J. M. (2004).** Interaction between bacteria and the domoic-acid-producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle) Hasle; Can bacteria produce domoic acid autonomously? *Harmful Algae* **3**, 11–20.
- Béjà, O., Suzuki, M. T., Heidelberg, J. F., Nelson, W. C., Preston, C. M., Hamada, T., Eisen, J. A., Fraser, C. M. & DeLong, E. F. (2002).** Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* **415**, 630–633.
- Beliaev, A. S., Romine, M. F., Serres, M., Bernstein, H. C., Linggi, B. E., Markillie, L. M., Isern, N. G., Chrisler, W. B., Kucek, L. a & other authors. (2014).** Inference of interactions in cyanobacterial-heterotrophic co-cultures via transcriptome sequencing. *ISME J* 1–13.
- Bell, W. & Mitchell, R. (1972).** Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol Bull* **143**, 265–277.
- Bell, W. H., Lang, J. M. & Mitchell, R. (1974).** Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *Limnol Oceanogr* **19**, 833–839.
- Ben-haim, Y., Zicherman-keren, M. & Rosenberg, E. (2003).** Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4236–4241.
- Berg, K. A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P. & Rapala, J. (2009).** High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J* **3**, 314–25.
- Bhattacharya, D., Qiu, H., Price, D. C. & Yoon, H. S. (2015).** Why we need more algal genomes. *J Phycol* **51**, 1–5.
- Bird, D. F. & Kalff, J. (1984).** Empirical relationships between bacterial abundance and chlorophyll concentration in fresh and marine waters. *Can J Fish Aquat Sci* **41**, 1015–1023.
- Bismuto, A., Setaro, A., Maddalena, P., De Stefano, L. & De Stefano, M. (2008).** Marine diatoms as optical chemical sensors: a time-resolved study. *Sensors Actuators, B Chem* **130**, 396–399.
- Björn, L. O. & Govindjee. (2009).** The evolution of photosynthesis. *Curr Sci* **96**, 1466–1474.
- Blank, C. E. & Sanchez-Baracaldo, P. (2010).** Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria - A key to understanding the rise in atmospheric oxygen. *Geobiology* **8**, 1–23.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911–917.
- Boettcher, K. J., Geaghan, K. K., Maloy, A. P. & Barber, B. J. (2005).** *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1531–1537.
- Bolch, C. J. S., Subramanian, T. A. & Green, D. H. (2011).** The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (*Dinophyceae*) requires marine bacteria for growth. *J Phycol* **47**, 1009–1022.
- Borowitzka, M. a. (1997).** Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *J Appl Phycol* **9**, 393–401.
- Borowitzka, M. A. (2013).** High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J Appl Phycol* **25**, 743–756.

- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F. & other authors. (2008).** The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **456**, 239–244.
- Bowler, C., Vardi, A. & Allen, A. E. (2010).** Oceanographic and biogeochemical insights from diatom genomes. *Ann Rev Mar Sci* **2**, 333–365.
- Bratbak, G., Egge, J. K. & Heldal, M. (1993).** Viral mortality of the marine alga *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Mar Ecol Prog Ser* **93**, 39–48.
- Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Müller, R. & Häussler, S. (2005).** Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *J Bacteriol* **187**, 3630–3635.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. & Dunstan, G. A. (1997).** Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* **151**, 315–331.
- Bruckner, C. G., Rehm, C., Grossart, H. P. & Kroth, P. G. (2011).** Growth and release of extracellular organic compounds by benthic diatoms depend on interactions with bacteria. *Environ Microbiol* **13**, 1052–1063.
- Brugnano, C., Granata, A., Guglielmo, L., Minutoli, R., Zagami, G. & Ianora, A. (2016).** The deleterious effect of diatoms on the biomass and growth of early stages of their copepod grazers. *J Exp Mar Bio Ecol* **476**, 41–49. Elsevier B.V.
- Bruns, A., Cypionka, H. & Overmann, J. (2002).** Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3978–3987.
- Buchan, A., González, J. M. & Moran, M. A. (2005).** Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5665–5677.
- Buchan, A., LeCleir, G. R., Gulvik, C. A. & González, J. M. (2014).** Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Microbiol* **12**, 686–698.
- Bull, A. T. & Stach, J. E. M. (2007).** Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol* **15**, 491–499.
- Bunse, C., Bertos-fortis, M., Sassenhagen, I., Sildever, S., Sjöqvist, C., Godhe, A., Gross, S., Kremp, A., Lips, I. & other authors. (2016).** Spatio-temporal interdependence of bacteria and phytoplankton during a Baltic Sea spring bloom. *Front Microbiol* **7**, 517.
- Burki, F. & Keeling, P. J. (2014).** *Rhizaria*. *Curr Biol* **24**, 103–107.
- Burrows, L. L. (2012).** Twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol* **66**, 493–520.
- Button, D. K., Schut, F., Quang, P., Martin, R. & Robertson, B. R. (1993).** Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microbiol* **59**, 881–891.
- Cai, G., Yang, X., Lai, Q., Yu, X., Zhang, H., Li, Y., Chen, Z., Lei, X., Zheng, W. & other authors. (2016).** Lysing bloom-causing alga *Phaeocystis globosa* with microbial algicide: an efficient process that decreases the toxicity of algal exudates. *Sci Rep* **6**, 20081.
- Calfee, M. W., Shelton, J. G., Mccubrey, J. A. & Pesci, E. C. (2005).** Solubility and bioactivity of the *Pseudomonas* quinolone signal are increased by a *Pseudomonas aeruginosa*-produced surfactant. *Infect Immun* **73**, 878–882.
- Campbell, B. J., Waidner, L. A., Cottrell, M. T. & Kirchman, D. L. (2008).** Abundant proteorhodopsin genes in the North Atlantic Ocean. *Environ Microbiol* **10**, 99–109.

- Canfield, D. E., Ngombi-Pemba, L., Hammarlund, E. U., Bengtson, S., Chaussidon, M., Gauthier-Lafaye, F., Meunier, A., Riboulleau, A., Rollion-Bard, C. & other authors. (2013). Oxygen dynamics in the aftermath of the Great Oxidation of Earth's atmosphere. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 16736–41.
- Canter, C. E., Razon, L. F. & Blowers, P. (2015). Large-scale cultivation of microalgae for fuel. In *Process Des Strateg Biomass Convers Syst*, pp. 135–160. Edited by D. K. S. Ng, R. R. Tan, D. C. Y. Foo & M. M. El-Halwagi. Wiley.
- Carini, P., Steindler, L., Beszteri, S. & Giovannoni, S. J. (2013). Nutrient requirements for growth of the extreme oligotroph 'Candidatus *Pelagibacter ubique*' HTCC1062 on a defined medium. *ISME J* **7**, 592–602.
- Cervino, J. M., Hayes, R., Goreau, T. J. & Smith, G. W. (2004). Zooxanthellae regulation in yellow blotch/band and other coral diseases contrasted with temperature related bleaching: In situ destruction vs expulsion. *Symbiosis* **37**, 63–85.
- Chan, A. M., Kacsmarska, I. & Suttle, C. A. (1997). Isolation and characterization of a species-specific bacterial pathogen which lyses the marine bacterium *Navicula pulchripora*. Current and Emerging Issues in Aquatic Sciences, Abstracts. Aquatic Sciences Meeting, Santa Fe, New Mexico, 10–14 February. In *Am Soc Limnol Oceanogr*, p. 121.
- Chandrasekaran, S., Sweetman, M. J., Kant, K., Skinner, W., Losic, D., Nann, T. & Voelcker, N. H. (2014). Silicon diatom frustules as nanostructured photoelectrodes. *Chem Commun* **50**, 10441–10444. Royal Society of Chemistry.
- Chelius, M. K. & Triplett, E. W. (2001). The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb Ecol* **41**, 252–263.
- Chen, W. M., Sheu, F. S. & Sheu, S. Y. (2011). Novel l-amino acid oxidase with algicidal activity against toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* synthesized by a bacterium *Aquimarina* sp. *Enzyme Microb Technol* **49**, 372–379. Elsevier Inc.
- Chen, W. M., Sheu, F. S. & Sheu, S. Y. (2012). *Aquimarina salinaria* sp. nov., a novel algicidal bacterium isolated from a saltpan. *Arch Microbiol* **194**, 103–112.
- Chepurnov, V. A., Mann, D. G., Vyverman, W., Sabbe, K. & Danielidis, D. B. (2002). Sexual reproduction, mating system, and protoplast dynamics of *Seminavis* (*Bacillariophyceae*). *J Phycol* **38**, 1004–1019.
- Chepurnov, V. A., Mann, D. G., Sabbe, K. & Vyverman, W. (2004). Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *Int Rev Cytol* **237**, 91–154.
- Chepurnov, V. A., Mann, D. G., von Dassow, P., Vanormelingen, P., Gillard, J., Inze, D., von Dassow, P., Inzé, D., Sabbe, K. & Vyverman, W. (2008). In search of new tractable diatoms for experimental biology. *Bioessays* **30**, 692–702.
- Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J.-B., Fouilland, E., Bernard, O. & Cadoret, J.-P. (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Res* **2**, 212–222.
- Cho, D. H., Ramanan, R., Kim, B. H., Lee, J., Kim, S., Yoo, C., Choi, G. G., Oh, H. M. & Kim, H. S. (2013). Novel approach for the development of axenic microalgal cultures from environmental samples. *J Phycol* **49**, 802–810.
- Cho, J. Y. (2012). Algicidal activity of marine *Alteromonas* sp. KNS-16 and isolation of active compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 1452–1458.
- 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.

- Choi, D. H., Cho, J. C., Lanoil, B. D., Giovannoni, S. J. & Cho, B. C. (2007).** *Maribius salinus* gen. nov., sp. nov., isolated from a solar saltern and *Maribius pelagius* sp. nov., cultured from the Sargasso Sea, belonging to the Roseobacter clade. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 270–275.
- Choi, D. H., Park, K. T., An, S. M., Lee, K., Cho, J. C., Lee, J. H., Kim, D., Jeon, D. & Noh, J. H. (2015).** Pyrosequencing revealed sar116 clade as dominant dddp-containing bacteria in oligotrophic nw pacific ocean. *PLoS One* **10**, e0116271.
- Christie-oleza, J. A., Scanlan, D. J. & Armengaud, J. (2015).** ‘ You produce while I clean up ’, a strategy revealed by exoproteomics during *Synechococcus-Roseobacter* interactions. *Proteomics* **15**, 3454–3462.
- Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. & Cascales, E. (2005).** Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* **59**.
- Christoffersen, K., Riemann, B., Hansen, L. R., Klysner, A. & Sørensen, H. B. (1990).** Qualitative importance of the microbial loop and plankton community structure in a eutrophic lake during a bloom of cyanobacteria. *Microb Ecol* **20**, 253–272.
- Cole, J. J. (1982).** Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annu Rev Ecol Syst* **13**, 291–314.
- Cole, J. J., Findlay, S. & Pace, M. L. (1988).** Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar Ecol Prog Ser* **43**, 1–10.
- Collins, M. D. & Jones, D. (1981).** Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol Rev* **45**, 316–354.
- Colwell, F., Matsumoto, R. & Reed, D. (2004).** A review of the gas hydrates, geology, and biology of the Nankai Trough. *Chem Geol* **205**, 391–404.
- Conley, D. J. & Carey, J. C. (2015).** Biogeochemistry: Silica cycling over geologic time. *Nat Geosci* **8**, 431–432.
- Connon, S. A. & Giovannoni, S. J. (2002).** High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3878–3885.
- Cooper, M. B. & Smith, A. G. (2015).** Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Curr Opin Plant Biol* **26**, 147–153. Elsevier Ltd.
- Cooper, S., Battat, A., Marsot, P. & Sylvestre, M. (1983).** Production of antibacterial activities by two *Bacillariophyceae* grown in dialysis culture. *Can J Microbiol* **29**, 338–341. NRC Research Press Ottawa, Canada.
- Cottrell, M. T. & Kirchman, D. L. (2000).** Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5116–5120.
- Coutteau, P. & Sorgeloos, P. (1992).** The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *J Shellfish Res* **11**, 467–476.
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J. & Smith, A. G. (2005).** Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* **438**, 90–93.
- Croft, M. T., Warren, M. J. & Smith, A. G. (2006).** Algae need their vitamins. *Eukaryot Cell* **5**, 1175–1183.
- Crump, B. C., Armbrust, E. V & Baross, J. A. (1999).** Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3192–3204.

- Crump, B. C., Baross, J. A. & Simenstad, C. A. (1998).** Dominance of particle-attached bacteria in the Columbia River estuary, USA. *Aquat Microb Ecol* **14**, 7–18.
- Cruz-López, R. & Maske, H. (2016).** The vitamin B1 and B12 required by the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* can be provided by its associated bacterial community in culture. *Front Microbiol* **7**.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T. & Scannell, J. W. (2002).** Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10494–10499.
- Cushing, D. H. (1989).** A difference in structure between ecosystems in strongly stratified waters and in those that are only weakly stratified. *J Plankton Res* **11**, 1–13.
- D’Alelio, D., Amato, A., Luedeking, A. & Montresor, M. (2009).** Sexual and vegetative phases in the planktonic diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *Harmful Algae* **8**, 225–232.
- Davis, C. O., Harrison, P. J. & Dugdale, R. C. (1973).** Continuous culture of marine diatoms under silicate limitation. I. Synchronized life cycle of *Skeletonema costatum*. *J Phycol* **9**, 175–180.
- De-Bashan, L. E. & Bashan, Y. (2010).** Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour Technol* **101**, 1611–1627. Elsevier Ltd.
- Delalat, B., Sheppard, V. C., Rasi Ghaemi, S., Rao, S., Prestidge, C. A., McPhee, G., Rogers, M.-L., Donoghue, J. F., Pillay, V. & other authors. (2015).** Targeted drug delivery using genetically engineered diatom biosilica. *Nat Commun* **6**, 8791.
- Delong, E. F., Franks, D. G. & Alldredge, A. L. (1993).** Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol Oceanogr* **38**, 924–934.
- Delucca, R. & Mccracken, M. D. (1977).** Observations on interactions between naturally-collected bacteria and several species of algae. *Hydrobiologia* **55**, 71–75.
- Demuez, M., González-Fernández, C. & Ballesteros, M. (2015).** Algicidal microorganisms and secreted algicides: new tools to induce microalgal cell disruption. *Biotechnol Adv* **33**, 1615–1625. Elsevier B.V.
- Desbois, A. P., Lebl, T., Yan, L. & Smith, V. J. (2008).** Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**, 755–764.
- Desbois, A. P., Mearns-Spragg, A. & Smith, V. J. (2009).** A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Mar Biotechnol* **11**, 45–52.
- Deschamps, P. & Moreira, D. (2012).** Reevaluating the green contribution to diatom genomes. *Genome Biol Evol* **4**, 795–800.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G. & Rahme, L. G. (2004).** Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1339–1344.
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Alagely, A., Gunasekera, S. P. & Paul, V. J. (2010).** Malyngolide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with quorum sensing circuitry. *Environ Microbiol Rep* **2**, 739–744.
- Doucette, G. J., MCGovern, E. R. & Babinchak, J. a. (1999).** Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (*Dinophyceae*). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *J Phycol* **35**, 1447–1454.

- Doucette, G. J. (1995).** Interactions between bacteria and harmful algae: a review. *Nat Toxins* **3**, 65–74.
- Drebes, G. (1966).** On the life history of the marine plankton diatom *Stephanopyxis palmeriana*. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* **13**, 101–114.
- Droop, M. R. & Elson, K. G. R. (1966).** Are pelagic diatoms free from bacteria? *Nature* **211**, 1096–1097.
- Dubert, J., Fernandez-Pardo, A., Novoa, S., Barja, J. L. & Prado, S. (2015).** Phytoplankton production systems in a shellfish hatchery: variations of the bacterial load and diversity of vibrios. *J Appl Microbiol* **118**, 1264–1275.
- Dulcey, C. E., Dekimpe, V., Fauvelle, D. A., Milot, S., Groleau, M. C., Doucet, N., Rahme, L. G., L??pine, F. & D??ziel, E. (2013).** The end of an old hypothesis: The pseudomonas signaling molecules 4-hydroxy-2-alkylquinolines derive from fatty acids, not 3-ketofatty acids. *Chem Biol* **20**, 1481–1491.
- Dupont, C. L., Rusch, D. B., Yooseph, S., Lombardo, M.-J., Richter, R. A., Valas, R., Novotny, M., Yee-Greenbaum, J., Selengut, J. D. & other authors. (2012).** Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage. *ISME J* **6**, 1186–1199.
- Dupraz, C., Reid, R. P., Braissant, O., Decho, A. W., Norman, R. S. & Visscher, P. T. (2009).** Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Rev* **96**, 141–162. Elsevier B.V.
- Durham, B. P., Sharma, S., Luo, H., Smith, C. B., Amin, S. A., Bender, S. J., Dearth, S. P., Van Mooy, B. A. S., Campagna, S. R. & other authors. (2015).** Cryptic carbon and sulfur cycling between surface ocean plankton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 453–457.
- Durkin, C. A., Mock, T. & Armbrust, E. V. (2009).** Chitin in diatoms and its association with the cell wall. *Eukaryot Cell* **8**, 1038–1050.
- Dykhuisen, D. E. (1998).** Santa Rosalia revisited: Why are there so many species of bacteria? *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* **73**, 25–33.
- Dziallas, C. & Grossart, H. P. (2011).** Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Environ Microbiol* **13**, 1632–1641.
- van Eenennaam, J. S., Wei, Y., Grolle, K. C. F., Foekema, E. M. & Murk, A. J. (2016).** Oil spill dispersants induce formation of marine snow formation by phytoplankton-associated bacteria. *Mar Pollut Bull* **104**, 294–302. Elsevier Ltd.
- Egan, S., Thomas, T., Holmström, C. & Kjelleberg, S. (2000).** Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environ Microbiol* **2**, 343–347.
- Egan, S., James, S., Holmstro, C., Holmström, C. & Kjelleberg, S. (2001).** Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 67–73.
- Eigemann, F., Hilt, S., Salka, I. & Grossart, H. P. (2013).** Bacterial community composition associated with freshwater algae: species specificity vs. dependency on environmental conditions and source community. *FEMS Microbiol Ecol* **83**, 650–663.
- Eiler, A. & Bertilsson, S. (2004).** Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol* **6**, 1228–1243.
- Euzéby, J. P. (1997).** List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 590–592.

- Evguenieva-Hackenberg, E. (2005).** Bacterial ribosomal RNA in pieces. *Mol Microbiol* **57**, 318–325.
- Falkowski, P. G., Fenchel, T. & Delong, E. F. (2008).** The microbial engines that drive Earth 's biogeochemical cycles. *Science* **320**, 1034–1039.
- Falkowski, P. G., Barber, R. T. & Smetacek, V. (1998).** Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* **281**, 200–206.
- Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. a, Schofield, O. & Taylor, F. J. R. (2004).** The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* **305**, 354–360.
- Falkowski, P. G., Katz, M. E., Milligan, A. J., Fennel, K., Cramer, B. S., Aubry, M. P., Berner, R. a, Novacek, M. J. & Zapol, W. M. (2005).** The rise of oxygen over the past 205 million years and the evolution of large placental mammals. *Science* **309**, 2202–2204.
- Falkowski, P. G., Knoll, A. H., Arvidson, R. S., Aubry, M.-P., Baldauf, S. L., Bhattacharya, D., Blankenship, R. E., Butterfield, N. J., Delwiche, C. E. & other authors. (2007).** *Evolution of Primary Producers in the Sea* (P. G. Falkowski & A. H. Knoll, Eds.). Academic Press.
- Farnelid, H. M., Turk-Kubo, K. A. & Zehr, J. P. (2016).** Identification of associations between bacterioplankton and photosynthetic picoeukaryotes in coastal waters. *Front Microbiol* **7**, 339.
- Faust, K. & Raes, J. (2012).** Microbial interactions: from networks to models. *Nat Rev Microbiol* **10**, 538–550.
- Feng, G., Cheng, Y., Wang, S.-Y., Borca-Tasciuc, D. A., Worobo, R. W. & Moraru, C. I. (2015).** Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough? *npj Biofilms Microbiomes* **1**, 15022.
- Fernández-Gómez, B., Richter, M., Schüler, M., Pinhassi, J., Acinas, S. G., González, J. M. & Pedrós-Alió, C. (2013).** Ecology of marine *Bacteroidetes*: a comparative genomics approach. *ISME J* **7**, 1026–1037.
- Fernández-Pardo, A., da Costa, F., Rial, D., Nóvoa, S., Martínez-Patiño, D. & Vázquez, J. A. (2016).** Use of response surface methodology to determine optimum diets for *Venerupis corrugata* larvae: effects of ration and microalgal assemblages. *Aquaculture* **425**, 283–290. Elsevier B.V.
- Ferrier, M., Martin, J. L. & Rooney-Varga, J. N. (2002).** Stimulation of *Alexandrium fundyense* growth by bacterial assemblages from the Bay of Fundy. *J Appl Microbiol* **92**, 706–716.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. & Falkowski, P. (1998).** Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281**, 237–240.
- Filippidou, S., Jaussi, M., Junier, T., Wunderlin, T., Jeanneret, N., Regenspurg, S., Li, P.-E., Lo, C., Johnson, S. & other authors. (2015).** Genome sequence of *Aeribacillus pallidus* strain GS3372, an endospore-forming bacterium isolated in a deep geothermal reservoir. *Genome Announc* **3**, e00981–15.
- Findlay, J. A. & Patil, A. D. (1984).** Antibacterial constituents of the diatom *Navicula delognei*. *J Nat Prod* **47**, 815–818.
- Fon Sing, S., Isdepsky, A., Borowitzka, M. A. & Moheimani, N. R. (2013).** Production of biofuels from microalgae. *Mitig Adapt Strateg Glob Chang* **18**, 47–72.
- Foster, R. A. & Zehr, J. P. (2006).** Characterization of diatom-cyanobacteria symbioses on the basis of nifH, hetR and 16S rRNA sequences. *Environ Microbiol* **8**, 1913–1925.
- Fouilland, E. (2012).** Biodiversity as a tool for waste phycoremediation and biomass production. *Rev Environ Sci Biotechnol* **11**, 1–4.

- Freire, I., Cortina, A., Grille, P., Arizcun, M., Martínez, E. A., Segura, M., Witt, F. & Otero, A. (2016). *Nannochloropsis limnetica*: a freshwater microalga for marine aquaculture. *Aquaculture* **459**, 124–130. Elsevier B.V.
- Frenkel, J., Vyverman, W. & Pohnert, G. (2014). Pheromone signaling during sexual reproduction in algae. *Plant J* **79**, 632–644.
- Frias-Lopez, J., Shi, Y., Tyson, G. W., Coleman, M. L., Schuster, S. C., Chisholm, S. W. & DeLong, E. F. (2008). Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3805–3810.
- Frommlet, J. C., Sousa, M. L., Alves, A., Vieira, S. I., Suggett, D. J. & Serôdio, J. (2015). Coral symbiotic algae calcify ex hospite in partnership with bacteria. *Proc Natl Acad Sci* **112**, 6158–6163.
- Fuhrmann, T., Landwehr, S., El Rharbi-Kucki, M. & Sumper, M. (2004). Diatoms as living photonic crystals. *Appl Phys B Lasers Opt* **78**, 257–260.
- Fukami, K., Yuzawa, A., Nishijima, T. & Hata, Y. (1992). Isolation and properties of a bacterium Inhibiting of the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**, 1073–1077.
- Fulbright, S. P. (2015). Crop protection in industrial algae farming: detecting weedy algae and characterizing bacterial communities, *PhD thesis*. Colorado State University.
- Furuki, M. (1992). Ecology of the bacteria that destroys *Chattonella*. *Cent Environ Manag Enclosed Coast Seas Newsl* **2**, 8.
- Furuki, M. & Kabayashi, M. (1991). Interaction between *Chattonella* and bacteria and prevention of this red tide. *Mar Pollutiuion Bull* **23**, 189–193.
- Furusawa, G., Yoshikawa, T., Yasuda, A. & Sakata, T. (2003). Algicidal activity and gliding motility of *Saprospira* sp. SS98-5. *Can J Microbiol* **49**, 92–100.
- Gage, D. A., Rhodes, D., Nolte, K. D., Hicks, W. A., Leustek, T., Cooper, A. J. & Hanson, A. D. (1997). A new route for synthesis of dimethylsulphonioacetate in marine algae. *Nature* **387**, 891–894.
- Gallacher, S., Flynn, K. J., Franco, J. M., Brueggemann, E. E. & Hines, H. B. (1997). Evidence for production of paralytic shellfish toxins by bacteria associated with *Alexandrium* spp. (*Dinophyta*) in culture. *Appl Environ Microbiol* **63**, 239–245.
- Ganesh, S., Parris, D. J., DeLong, E. F. & Stewart, F. J. (2014). Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone. *ISME J* **8**, 187–211.
- Garcés, E., Vila, M., Reñé, A., Alonso-Sáez, L., Anglès, S., Lugliè, A., Masó, M. & Gasol, J. M. (2007). Natural bacterioplankton assemblage composition during blooms of *Alexandrium* spp. (*Dinophyceae*) in NW Mediterranean coastal waters. *Aquat Microb Ecol* **46**, 55–70.
- Gärdes, A., Iversen, M. H., Grossart, H. P., Passow, U. & Ullrich, M. S. (2011). Diatom-associated bacteria are required for aggregation of *Thalassiosira weissflogii*. *ISME J* **5**, 436–445.
- Gasol, J. M. & Duarte, C. M. (2000). Comparative analyses in aquatic microbial ecology: How far do they go? *FEMS Microbiol Ecol* **31**, 99–106.
- Gauthier, M. J., Bernard, P. & Aubert, M. (1978). Production d'un antibiotique lipidique photo-sensible par la diatomée marine *Chaetoceros lauderi* (RALFS). *Ann Microbiol (Institut Pasteur)* **129B**, 63–70.
- Geng, H. & Belas, R. (2010). Molecular mechanisms underlying *Roseobacter*-phytoplankton symbioses. *Curr Opin Biotechnol* **21**, 332–338. Elsevier Ltd.
- Gersonde, R. & Harwood, D. M. (1990). Lower Cretaceous diatoms from ODP Leg 113 Site 693 (Weddell Sea). Part 1: vegetative cells. In *Proc Ocean Drill Program, Sci Results*, pp. 365–402.

- Ghai, R., McMahon, K. D. & Rodriguez-Valera, F. (2012).** Breaking a paradigm: cosmopolitan and abundant freshwater actinobacteria are low GC. *Environ Microbiol Rep* **4**, 29–35.
- Ghai, R., Mizuno, C. M., 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.
- Ghasemi, Y., Moradian, A., Mohagheghzadeh, A., Shokravi, S. & Morowvat, M. H. (2007).** Antifungal and antibacterial activity of the microalgae collected from paddy fields of Iran: characterization of antimicrobial activity of *Chroococcus dispersus*. *J Biol sciences* **7**, 904–910.
- Ghosh, A., Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Saini, S., Bhowmick, T. K. & Gayen, K. (2016).** Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals: A review. *Energy Convers Manag* **113**, 104–118. Elsevier Ltd.
- Ghyselinck, J., Van Hoorde, K., Hoste, B., Heylen, K. & De Vos, P. (2011).** Evaluation of MALDI-TOF MS as a tool for high-throughput dereplication. *J Microbiol Methods* **86**, 327–336. Elsevier B.V.
- Ghyselinck, J., Pfeiffer, S., Heylen, K., Sessitsch, A. & De Vos, P. (2013).** The effect of primer choice and short read sequences on the outcome of 16S rRNA gene based diversity studies. *PLoS One* **8**, e71360.
- Giannoukos, G., Ciulla, D. M., Huang, K., Haas, B. J., Izard, J., Levin, J. Z., Livny, J., Earl, A. M., Gevers, D. & other authors. (2012).** Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes. *Genome Biol* **13**, R23.
- Gifford, S. M., Sharma, S., Rinta-Kanto, J. M. & Moran, M. A. (2011).** Quantitative analysis of a deeply sequenced marine microbial metatranscriptome. *ISME J* **5**, 461–472.
- del Giorgio, P. a & Duarte, C. M. (2002).** Respiration in the open ocean. *Nature* **420**, 379–384.
- Giovannoni, S. J. & Rappé, M. (2000).** Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In *Microb Ecol Ocean 1st Ed*, 1st edn., pp. 47–84. Edited by D. L. Kirchman. Wiley-Liss.
- Giovannoni, S. J. (1990).** Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. *Nature* **345**, 183–187.
- Giovannoni, S. J. & Stingl, U. (2005).** Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* **437**, 343–348.
- Giovannoni, S. J., Tripp, H. J., Givan, S., Podar, M., Vergin, K. L., Baptista, D., Bibbs, L., Eads, J., Richardson, T. H. & other authors. (2005).** Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* **309**, 1242–1245.
- Giovannoni, S. J., Hayakawa, D. H., Tripp, H. J., Stingl, U., Givan, S. A., Cho, J. C., Oh, H. M., Kitner, J. B., Vergin, K. L. & Rappé, M. S. (2008).** The small genome of an abundant coastal ocean methylotroph. *Environ Microbiol* **10**, 1771–1782.
- Giovannoni, S. J., Cameron Thrash, J. & Temperton, B. (2014).** Implications of streamlining theory for microbial ecology. *ISME J* **8**, 1553–1565.
- Godhe, A., Kremp, A. & Montresor, M. (2014).** Genetic and microscopic evidence for sexual reproduction in the centric diatom *Skeletonema marinoi*. *Protist* **165**, 401–416. Elsevier GmbH.

- González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltos, K., Marco, E. & Fernández-Piñas, F. (2013).** Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Res* **47**, 2050–2064.
- Gonzalez, J. M. & Moran, M. A. (1997).** Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4237–4242.
- Gonzalez, J. M., Simo, R., Casamayor, E. O., Pedro, C. & Moran, M. A. (2000).** Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4237–4246.
- Gonzalez, L. E. & Bashan, Y. (2000).** Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1527–31.
- Goodfellow, M. & Williams, S. T. (1983).** Ecology of *Actinomycetes*. *Annu Rev Microbiol* **37**, 189–216.
- Gordon, R., Losic, D., Tiffany, M. A., Nagy, S. S. & Sterrenburg, F. A. S. (2009).** The glass menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology. *Trends Biotechnol* **27**, 116–127.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. & Tiedje, J. M. (2007).** DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 81–91.
- Graham, L. E., Wilcox, L. W. & Knack, J. J. (2015).** Why we need more algal metagenomes. *J Phycol* **51**, 1029–1036.
- Gram, L., Melchiorson, J. & Bruhn, J. B. (2010).** Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a global sampling of ocean surface waters and surface swabs of marine organisms. *Mar Biotechnol* **12**, 439–451.
- Grant, M. A., Kazamia, E., Cicuta, P. & Smith, A. G. (2014).** Direct exchange of vitamin B12 is demonstrated by modelling the growth dynamics of algal-bacterial cocultures. *ISME J* **8**, 1418–1427.
- Green, D. H., Llewellyn, L. E., Negri, A. P., Blackburn, S. I. & Bolch, C. J. S. (2004).** Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *FEMS Microbiol Ecol* **47**, 345–357.
- Green, D. H., Echavarri-bravo, V., Brennan, D. & Hart, M. C. (2015).** Bacterial diversity associated with the coccolithophorid algae *Emiliania huxleyi* and *Coccolithus pelagicus* f. *braarudii*. *Biomed Res Int* **2015**, 194540.
- Grossart, H. P. & Simon, M. (2007).** Interactions of planktonic algae and bacteria: Effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquat Microb Ecol* **47**, 163–176.
- Grossart, H. P. (1999).** Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquat Microb Ecol* **19**, 1–11.
- Grossart, H. P. (2010).** Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: Changes in concepts are needed. *Environ Microbiol Rep* **2**, 706–714.
- Grossart, H. P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M. & Brinkhoff, T. (2005).** Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ Microbiol* **7**, 860–873.

- Grossart, H. P., Czub, G. & Simon, M. (2006).** Algae-bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. *Environ Microbiol* **8**, 1074–1084.
- Grote, J., Bayindirli, C., Bergauer, K., Carpintero de Moraes, P., Chen, H., D'Ambrosio, L., Edwards, B., Fernández-Gómez, B., Hamisi, M. & other authors. (2011).** Draft genome sequence of strain HIMB100, a cultured representative of the SAR116 clade of marine *Alphaproteobacteria*. *Stand Genomic Sci* **5**, 269–278.
- Grote, J., Thrash, J. C. & Huggett, M. J. (2012).** Streamlining and core genome conservation among highly divergent members of the SAR11 clade. *MBio* **3**, e00252–12.
- Gruner, E., von Graevenitz, A. & Altwegg, M. (1992).** The API ZYM system: a tabulated review from 1977 to date. *J Microbiol Methods* **16**, 101–118.
- Guan, C., Guo, X., Cai, G., Zhang, H., Li, Y., Zheng, W. & Zheng, T. (2014).** Novel algicidal evidence of a bacterium *Bacillus* sp. LP-10 killing *Phaeocystis globosa*, a harmful algal bloom causing species. *Biol Control* **76**, 79–86.
- Guan, C., Guo, X., Li, Y., Zhang, H., Lei, X., Cai, G., Guo, J., Yu, Z. & Zheng, T. (2015).** Photoinhibition of *Phaeocystis globosa* resulting from oxidative stress induced by a marine algicidal bacterium *Bacillus* sp. LP-10. *Sci Rep* **5**, 17002.
- Guannel, M. L., Horner-Devine, M. C. & Rocap, G. (2011).** Bacterial community composition differs with species and toxicity of the diatom *Pseudo-nitzschia*. *Aquat Microb Ecol* **64**, 117–133.
- Guedes, A. C. & Malcata, F. X. (2012).** Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In *Aquaculture*, pp. 281–292. Edited by Z. A. Muchlisin. InTech.
- Guillou, L., Nézan, E., Cueff, V., Erard-Le Denn, E., Cambon-Bonavita, M.-A., Gentien, P. & Barbier, G. (2002).** Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French coasts. *Protist* **153**, 223–238.
- Guilloux, L., Rigaut-Jalabert, F., Jouenne, F., Ristori, S., Viprey, M., Not, F., Vaultot, D. & Simon, N. (2013).** An annotated checklist of Marine Phytoplankton taxa at the SOMLIT-Astan time series off Roscoff (Western English Channel, France): data collected from 2000 to 2010. *Cah Biol Mar* **54**, 247–256.
- Guiry, M. D. (2012).** How many species of algae are there? *J Phycol* **48**, 1057–1063.
- Guo, J., Selby, K. & Boxall, A. (2016).** Comparing the sensitivity of chlorophytes, cyanobacteria and diatoms to major-use antibiotics. *Environ Toxicol Chem* **In press**.
- Guzman-Murillo, M. A. & Ascencio, F. (2000).** Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and helicobacter pylori to tissue culture cells. *Lett Appl Microbiol* **30**, 473–478.
- Haines, K. C. & Guillard, R. R. L. (1974).** Growth of vitamin B12-requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B12-producing marine bacteria. *J Phycol*.
- Hallegraeff, G. M. (1993).** A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* **32**, 79–99.
- Hamady, M., Lozupone, C. & Knight, R. (2010).** Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J* **4**, 17–27.

- Hamm, C. E., Merkel, R., Springer, O., Jurkojc, P., Maier, C., Prectel, K. & Smetacek, V. (2003). Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. *Nature* **421**, 841–843.
- Hamsher, S. E., Evans, K. M., Mann, D. G., Poulíčková, A. & Saunders, G. W. (2011). Barcoding diatoms: exploring alternatives to COI-5P. *Protist* **162**, 405–422.
- Hamsher, S. E., LeGresley, M. M., Martin, J. L. & Saunders, G. W. (2013). A comparison of morphological and molecular-based surveys to estimate the species richness of *Chaetoceros* and *Thalassiosira* (*Bacillariophyta*), in the Bay of Fundy. *PLoS One* **8**.
- Han, J., Wang, S., Zhang, L., Yang, G., Zhao, L. & Pan, K. (2016). A method of batch-purifying microalgae with multiple antibiotics at extremely high concentrations. *Chinese J Oceanol Limnol* **34**, 79–85.
- Harvey, E. L., Deering, R. W., Rowley, D. C., El Gamal, A., Schorn, M., Moore, B. S., Johnson, M. D., Mincer, T. J. & Whalen, K. E. (2016). A bacterial quorum-sensing precursor induces mortality in the marine coccolithophore, *Emiliania huxleyi*. *Front Microbiol* **7**, 59.
- Hasle, G. R. & Syvertsen, E. (1996). Marine diatoms. In *Identifying Mar Diatoms Dinoflag*, pp. 5–385. Edited by C. R. Tomas. San Diego, USA: Academic Press, Inc.
- Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., Dortch, Q., Gobler, C. J., Heil, C. A. & other authors. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae* **8**, 3–13.
- Hellebust, J. A. (1965). Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr* **10**, 192–206.
- Helliwell, K. E., Collins, S., Kazamia, E., Purton, S., Wheeler, G. L. & Smith, A. G. (2015). Fundamental shift in vitamin B12 eco-physiology of a model alga demonstrated by experimental evolution. *ISME J* **9**, 1446–1455.
- Helliwell, K. E., Wheeler, G. L., Leptos, K. C., Goldstein, R. E. & Smith, A. G. (2011). Insights into the evolution of vitamin B 12 auxotrophy from sequenced algal genomes. *Mol Biol Evol* **28**, 2921–2933.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V. & Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol* **27**, 1737–1746.
- Hernández-Becerril, D., Moreno-Gutiérrez, S. & Barón-Campis, S. (2009). Morphological variability of the planktonic diatom *Thalassiosira delicatula* Ostenfeld emend. Hasle from the Mexican Pacific, in culture conditions. *Acta Bot Croat* **68**, 313–323.
- van den Hoek, C., Mann, D. & Jahns, H. (1996). *Algae: an introduction to phycology*, Cambridge. Cambridge.
- Hold, G. L., Smith, E. A., Rappé, M. S., Maas, E. W., Moore, E. R. B., Stroempl, C., Stephen, J. R., Prosser, J. I., Birkbeck, T. H. & Gallacher, S. (2001a). Characterisation of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. *FEMS Microbiol Ecol* **37**, 161–173.
- Hold, G. L., Smith, E. a., Harry Birkbeck, T. & Gallacher, S. (2001b). Comparison of paralytic shellfish toxin (PST) production by the dinoflagellates *Alexandrium lusitanicum* NEPCC 253 and *Alexandrium tamarense* NEPCC 407 in the presence and absence of bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **36**, 223–234.
- Holland, H. D. (2006). The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos Trans R Soc B* **361**, 903–915.

- Holland, H. D. (1999).** When did the Earth's atmosphere become oxic? A Reply. *Geochemical News* **100**, 20–22.
- Holmström, C. & Kjelleberg, S. (1999).** Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microb Ecol* **30**, 285–293.
- Hom, E. F., Aiyar, P., Schaeme, D., Mittag, M. & Sasso, S. (2015).** A chemical perspective on microalgal–microbial interactions. *Trends Plant Sci* **20**, 689–693. Elsevier Ltd.
- Houdan, A., Bonnard, A., Fresnel, J., Fouchard, S., Billard, C. & Probert, I. (2004).** Toxicity of coastal coccolithophores (*Prymnesiophyceae*, *Haptophyta*). *J Plankton Res* **26**, 875–883.
- Huang, D.-R., Jiang, Y.-J., Liou, R.-L., Chen, C.-H., Chen, Y.-A. & Tsai, C.-H. (2015).** Enhancing the efficiency of dye-sensitized solar cells by adding diatom frustules into TiO₂ working electrodes. *Appl Surf Sci* **347**, 64–72. Elsevier B.V.
- Hughes, D. T. & Sperandio, V. (2008).** Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol* **6**, 111–120.
- Humble, M. W., King, A. & Phillips, I. (1977).** API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *J Clin Pathol* **30**, 275–277.
- Humily, F., Farrant, G. K., Marie, D., Partensky, F., Mazard, S., Perennou, M., Labadie, K., Aury, J. M., Wincker, P. & other authors. (2014).** Development of a targeted metagenomic approach to study a genomic region involved in light harvesting in marine *Synechococcus*. *FEMS Microbiol Ecol* **88**, 231–249.
- Hünken, M., Harder, J. & Kirst, G. O. (2008).** Epiphytic bacteria on the Antarctic ice diatom *Amphiprora kufferathii* Manguin cleave hydrogen peroxide produced during algal photosynthesis. *Plant Biol* **10**, 519–526.
- Hwang, C. Y., Bae, G. D., Yih, W. & Cho, B. C. (2009).** *Marivita cryptomonadis* gen. nov., sp. nov. and *Marivita litorea* sp. nov., of the family *Rhodobacteraceae*, isolated from marine habitats. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1568–1575.
- Ianora, A., Miralto, A., Poulet, S. A., Carotenuto, Y., Buttino, I., Romano, G., Casotti, R., Pohnert, G., Wichard, T. & other authors. (2004).** Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. *Nature* **429**, 403–407.
- Ianora, A., Bastianini, M., Carotenuto, Y., Casotti, R., Roncalli, V., Miralto, A., Romano, G., Gerecht, A., Fontana, A. & Turner, J. T. (2015).** Non-volatile oxylipins can render some diatom blooms more toxic for copepod reproduction. *Harmful Algae* **44**, 1–7. Elsevier B.V.
- Imai, I., Ishida, Y., Sawayama, S. & Hata, Y. (1991).** Isolation of a marine gliding bacterium that kills *Chattonella antiqua* (*Raphidophyceae*). *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**.
- Imai, I., Ishida, Y. & Hata, Y. (1993).** Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar Biol* **116**, 527–532.
- Imai, I., Ishida, Y., Sakaguchi, K. & Hata, Y. (1995).** Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan. *Fish Sci* **61**, 628–636.
- Inaba, N., Watanabe, T., Sakami, T., Nishi, H., Tahara, Y. & Imai, I. (2014).** Temporal and spatial distribution of algicidal and growth-inhibiting bacteria in the coastal sea of southwest Japan. *J Plankton Res* **36**, 388–397.
- Jarrell, K. F. & McBride, M. J. (2008).** The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* **6**, 466–476.

- Jasti, S., Sieracki, M. E., Poulton, N. J., Giewat, M. W. & Rooney-Varga, J. N. (2005). Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* spp. and other phytoplankton. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3483–3494.
- Jeong, H. J., Seong, K. A., Kang, N. S., Yoo, Y. Du, Nam, S. W., Park, J. Y., Shin, W., Glibert, P. M. & Johns, D. (2010). Feeding by raphidophytes on the cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Aquat Microb Ecol* **58**, 181–195.
- Jeong, H., Yim, J. H., Lee, C., Choi, S.-H., Park, Y. K., Yoon, S. H., Hur, C.-G., Kang, H.-Y., Kim, D. & other authors. (2005). Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucleic Acids Res* **33**, 7066–7073.
- Jiang, X., Ren, C., Hu, C. & Zhao, Z. (2014). Isolation and algicidal characterization of *Bowmanella denitrificans* S088 against *Chlorella vulgaris*. *World J Microbiol Biotechnol* **30**, 621–629.
- Johansen, M. N. (2012). *Microalgae: biotechnology, microbiology and energy*. Nova Science Publishers.
- Johnson, M. D., Tengs, T., Oldach, D. & Stoecker, D. K. (2006). Sequestration, performance, and functional control of cryptophyte plastids in the ciliate *Myrionecta rubra* (ciliophora). *J Phycol* **42**, 1235–1246.
- Johnson, W. M., Soule, M. C. K. & Kujawinski, E. B. (2016). Evidence for quorum sensing and differential metabolite production by the marine heterotroph, *Ruegeria pomeroyi*, in response to DMSP. *ISME J* In press.
- Jones, H. M., Simpson, G. E., Stickle, A. J. & Mann, D. G. (2005). Life history and systematics of *Petronis* (*Bacillariophyta*), with special reference to British waters. *Eur J Phycol* **40**, 61–87.
- Kaczmarek, I., Ehrman, J. M., Bates, S. S., Green, D. H., Léger, C. & Harris, J. (2005). Diversity and distribution of epibiotic bacteria on *Pseudo-nitzschia multiseriata* (*Bacillariophyceae*) in culture, and comparison with those on diatoms in native seawater. *Harmful Algae* **4**, 725–741.
- Kaebnick, M. & Neilan, B. A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 1–9.
- Karl, D. M., Hebel, D. V., Björkman, K. & Letelier, R. M. (1998). The role of dissolved organic matter release in the productivity of the oligotrophic North Pacific Ocean. *Limnol Oceanogr* **43**, 1270–1286.
- Kato, J., Amie, J., Murata, Y., Kuroda, A., Mitsutani, A. & Ohtake, H. (1998). Development of a genetic transformation system for an alga-lysing bacterium. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2061–2064.
- Kazamia, E., Czesnick, H., Nguyen, T. T. Van, Croft, M. T., Sherwood, E., Sasso, S., Hodson, S. J., Warren, M. J. & Smith, A. G. (2012). Mutualistic interactions between vitamin B12-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environ Microbiol* **14**, 1466–1476.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**, 634–44.
- Keller, M. D., Selvin, R. C., Claus, W. & Guillard, R. R. L. (1987). Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J Phycol* **23**, 633–638.
- Kettles, N. L., Kopriva, S. & Malin, G. (2014). Insights into the regulation of DMSP synthesis in the diatom *Thalassiosira pseudonana* through APR activity, proteomics and gene expression analyses on cells acclimating to changes in salinity, light and nitrogen. *PLoS One* **9**, e94795.

- Khandeparker, L., D'Costa, P. M., Anil, A. C. & Sawant, S. S. (2014).** Interactions of bacteria with diatoms: influence on natural marine biofilms. *Mar Ecol* **35**, 233–248.
- Kim, J. H., Park, J. H., Song, Y. H. & Chang, D. S. (1999).** Isolation and characterization of the marine bacterium, *Alteromonas* sp. SR-14 inhibiting the growth of diatom *Chaetoceros* species. *Korean J Fish Aquat Sci* **32**, 155–159ki.
- Kim, J. M., Jung, J. Y., Chae, H. B., Park, W. & Jeon, C. O. (2010).** *Hwanghaeicola aestuarii* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a tidal flat of the Yellow Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2877–2881.
- Kim, J., Kim, C., Youn, S. & Choi, T. (2015a).** Isolation and physiological characterization of a novel algicidal virus infecting the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Plant Pathol J* **31**, 186–191.
- Kim, Y. O., Park, S., Nam, B. H., Kang, S. J., Hur, Y. B., Kim, D. G., Oh, T. K. & Yoon, J. H. (2012).** Description of *Litoreibacter meonggei* sp. nov., isolated from the sea squirt *Halocynthia roretzi*, reclassification of *Thalassobacter arenae* as *Litoreibacter arenae* comb. nov. and emended description of the genus *Litoreibacter* Romanenko et al. 2011. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 1825–1831.
- Kim, Y. S., Lee, D.-S., Jeong, S.-Y., Lee, W. J. & Lee, M.-S. (2009).** Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the harmful raphidophyceae *Chattonella marina*. *J Microbiol* **47**, 9–18.
- Kim, Y. S., Son, H.-J. & Jeong, S.-Y. (2015b).** Isolation of an algicide from a marine bacterium and its effects against the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and other harmful algal bloom species. *J Microbiol* **53**, 511–517.
- Kimura, K. & Tomaru, Y. (2014).** Coculture with marine bacteria confers resistance to complete viral lysis of diatom cultures. *Aquat Microb Ecol* **73**, 69–80.
- Kirchman, D. L. (2002).** The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* **39**, 91–100.
- Kirchman, D. L. (2008).** *Microbial ecology of the oceans*, 2nd edition, 2nd edn. (D. L. Kirchman, Ed.). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Kirschvink, J. L. & Kopp, R. E. (2008).** Palaeoproterozoic ice houses and the evolution of oxygen-mediating enzymes: the case for a late origin of photosystem II. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**, 2755–2765.
- Kneip, C., Voss, C., Lockhart, P. J. & Maier, U. G. (2008).** The cyanobacterial endosymbiont of the unicellular algae *Rhopalodia gibba* shows reductive genome evolution. *BMC Evol Biol* **8**, 30.
- Kobayashi, K., Takata, Y. & Kodama, M. (2009).** Direct contact between *Pseudonitzschia multiseries* and bacteria is necessary for the diatom to produce a high level of domoic acid. *Fish Sci* **75**, 771–776.
- Kodama, M. (2010).** Paralytic Shellfish Poisoning Toxins: Biochemistry and Origin. *Aqua-BioScience Monogr* **3**, 1–38.
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M. & Divanach, P. (2012).** Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquac Res* **43**, 1520–1527.
- Konstantinidis, K. T., Ramette, A. & Tiedje, J. M. (2006).** The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 1929–1940.
- Kooistra, W. H. C. F., Sarno, D., Hernández-Becerril, D. U., Assmy, P., Di Prisco, C. & Montresor, M. (2010).** Comparative molecular and morphological phylogenetic analyses of taxa in the *Chaetocerotaceae* (*Bacillariophyta*). *Phycologia* **49**, 471–500.

- Kooistra, W. H. C. F. & Medlin, L. K. (1996).** Evolution of the Diatoms (*Bacillariophyta*): IV. A Reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and the fossil record. *Mol Phylogenet Evol* **6**, 391–407.
- Kopp, M., Doucette, G. J., Kodama, M., Gerdt, G., Schutt, C. & Medlin, L. K. (1997).** Phylogenetic analysis of selected toxic and non-toxic bacterial strains isolated from the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Fems Microbiol Ecol* **24**, 251–257.
- Kordes, E., Jock, S., Fritsch, J., Bosch, F. & Klug, G. (1994).** Cloning of a gene involved in rRNA precursor processing and 23S rRNA cleavage in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **176**, 1121–1127.
- Kotrc, B. & Knoll, A. H. (2015).** A morphospace of planktonic marine diatoms. I. Two views of disparity through time. *Paleobiology* **41**, 45–67.
- Kröger, N. & Poulsen, N. (2008).** Diatoms-from cell wall biogenesis to nanotechnology. *Annu Rev Genet* **42**, 83–107.
- Krupke, A., Lavik, G., Halm, H., Fuchs, B. M., Amann, R. I. & Kuypers, M. M. M. (2014).** Distribution of a consortium between unicellular algae and the N₂ fixing cyanobacterium UCYN-A in the North Atlantic Ocean. *Environ Microbiol* **16**, 3153–3167.
- Lai, P. Y., Miao, L., Lee, O. O., Liu, L. L., Zhou, X. J., Xu, Y., Al-Suwailem, A. & Qian, P. Y. (2013).** *Profundibacterium mesophilum* gen. nov., sp. nov., a novel member in the family *Rhodobacteraceae* isolated from deep-sea sediment in the Red Sea, Saudi Arabia. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 1007–1012.
- Lambers, H., Mougél, C., Jaillard, B. & Hinsinger, P. (2009).** Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant Soil* **321**, 83–115.
- Landsberg, J., Van Dolah, F. & Doucette, G. (2005).** Marine and estuarine harmful algal blooms: impacts on human and animal health. In *Ocean Heal Pathog Mar Environ*, pp. 165–215. Edited by S. Belkin & R. R. Colwell. Springer New York.
- Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S. A. & Arias, C. R. (2013).** Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. *FEMS Microbiol Ecol* **85**, 483–494.
- Lasken, R. S. (2012).** Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nat Rev Microbiol* **10**, 631–640.
- Lebeau, T. & Robert, J. M. (2003).** Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: current and putative products. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 624–632.
- Leblanc, K., Arístegui, J., Armand, L., Assmy, P., Beker, B., Bode, A., Breton, E., Cornet, V., Gibson, J. & other authors. (2012).** A global diatom database – abundance, biovolume and biomass in the world ocean. *Earth Syst Sci Data* **4**, 149–165.
- Lee, R. E. (2008).** *Phycology (Fourth Edition)*. Cambridge New York: Cambridge University Press.
- Lee, S., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ikeda, T., Mitsutani, A. & Ohtake, H. (2000).** Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4334–4339.
- Lee, W.-J. & Park, Y.-T. (1998).** Isolation of marine bacteria killing red-tide microalgae II. Isolation and algicidal properties of *Pseudomonas* sp. LG-2 possessing killing activity for dinoflagellate, *Prorocentrum micans*. *Korean J Fish Aquat Sci* **31**, 852–858.
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G. O. & Granéli, E. (2003).** Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia* **42**, 406–419.

- Lei, X., Li, D., Li, Y., Chen, Z., Chen, Y., Cai, G., Yang, X., Zheng, W. & Zheng, T. (2015). Comprehensive insights into the response of *Alexandrium tamarense* to algicidal component secreted by a marine bacterium. *Front Microbiol* **6**.
- Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P. & Bates, S. S. (2012). *Pseudo-nitzschia* (*Bacillariophyceae*) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia* **51**, 168–216.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamitou, S. & Gominet, M. (2000). Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int J Med Microbiol* **290**, 295–299.
- Lewin, R. A. (1997). *Saprospira grandis*: a *Flexibacterium* that can catch bacterial prey by 'ixotrophy'. *Microb Ecol* **34**, 232–236.
- Lewis, W. M. J. (1984). The diatom sex clock and its evolutionary significance. *Am Nat* **123**, 73–80.
- Li, C., Xiao, S. & Ju, L.-K. (2016a). Cultivation of phagotrophic algae with waste activated sludge as a fast approach to reclaim waste organics. *Water Res* **91**, 195–202. Elsevier Ltd.
- Li, L., Tilman, D., Lambers, H. & Zhang, F. S. (2014). Plant diversity and overyielding: Insights from belowground facilitation of intercropping in agriculture. *New Phytol* **203**, 63–69.
- Li, W. K. W. (1994). Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eucaryotic ultraphytoplankton: Measurements from flow cytometric sorting. *Limnol Oceanogr* **39**, 169–175.
- Li, Y., Zhu, H., Lei, X., Zhang, H., Guan, C., Chen, Z., Zheng, W., Xu, H., Tian, Y. & other authors. (2015). The first evidence of deinoxanthin from *Deinococcus* sp. Y35 with strong algicidal effect on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *J Hazard Mater* **290**, 87–95.
- Li, Y., Lei, X., Zhu, H., Zhang, H., Guan, C., Chen, Z., Zheng, W., Fu, L. & Zheng, T. (2016b). Chitinase producing bacteria with direct algicidal activity on marine diatoms. *Sci Rep* **6**, 21984.
- Lidicker, W. Z. (1979). A clarification of interactions in ecological systems. *Bioscience* **29**, 475–477. Oxford University Press.
- Littman, R. A., Bourne, D. G. & Willis, B. L. (2010). Responses of coral-associated bacterial communities to heat stress differ with *Symbiodinium* type on the same coral host. *Mol Ecol* **19**, 1978–1990.
- Liu, J., Lewitus, A. J., Brown, P. & Wilde, S. B. (2008). Growth-promoting effects of a bacterium on raphidophytes and other phytoplankton. *Harmful Algae* **7**, 1–10.
- Liu, M., Xiao, T., Sun, J., Wei, H., Wu, Y., Zhao, Y. & Zhang, W. (2013). Bacterial community structures associated with a natural spring phytoplankton bloom in the Yellow Sea, China. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* **97**, 85–92. Elsevier.
- Long, R. A. & Azam, F. (2001). Antagonistic interactions among marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4875–4983.
- Long, R. A., Rowley, D. C., Zamora, E., Bartlett, D. H., Azam, F. & Liu, J. (2005). Antagonistic interactions among marine bacteria impede the proliferation of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8531–8536.
- Losic, D., Pillar, R. J., Dilger, T., Mitchell, J. G. & Voelcker, N. H. (2007). Atomic force microscopy (AFM) characterisation of the porous silica nanostructure of two centric diatoms. *J Porous Mater* **14**, 61–69.
- Lovejoy, C., Bowman, J. P. & Hallegraeff, G. M. (1998). Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class *Proteobacteria*, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2806–2813.

- Lozupone, C., Hamady, M. & Knight, R. (2006).** UniFrac-an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* **7**, 371.
- Lu, X., Zhou, B., Xu, L., Liu, L., Wang, G., Liu, X. & Tang, X. (2016).** A marine algicidal *Thalassospira* and its active substance against the harmful algal bloom species *Karenia mikimotoi*. *Appl Microbiol Biotechnol* In press.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Kämpfer, P. & Whitman, W. B. (2012).** Road map of the phylum *Actinobacteria*. In *Bergey's Man Syst Bacteriol Vol 5, Actinobacteria, 2nd Ed*, pp. 1–31. Edited by M. Goodfellow, P. Kämpfer, H. J. Busse, M. E. Trujillo, K.-S. Suzuki, W. Ludwig & W. B. Whitman. New York: Springer.
- Luo, H. & Moran, M. A. (2014).** Evolutionary ecology of the marine *Roseobacter* clade. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**, 573–587.
- Lyons, T. W., Reinhard, C. T. & Planavsky, N. J. (2014).** The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature* **506**, 307–15.
- Macdonald, J. D. (1869).** On the structure of the Diatomaceous frustule, and its genetic cycle. *Ann Mag Nat Hist* **3**, 1–8.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. & Clark, D. P. (2010).** *Brock Biology of Microorganisms*, 13th edn. Benjamin-Cummings Publishing Company.
- Mague, T. H., Friberg, E., Hughes, D. J. & Morris, I. (1980).** Extracellular release of carbon by marine phytoplankton; a physiological approach. *Limnol Oceanogr* **25**, 262–279.
- Magurran, A. E. & McGill, B. J. (2011).** *Biological diversity: frontiers in measurement and Assessment*. Oxford University Press.
- Makower, A. K., Schuurmans, J. M., Groth, D., Zilliges, Y., Matthijs, H. C. P. & Dittmann, E. (2015).** Transcriptomics-aided dissection of the intracellular and extracellular roles of microcystin in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl Environ Microbiol* **81**, 544–554.
- Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Bittner, L., Poulain, J., Wincker, P., Iudicone, D. & other authors. (2016).** Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proc Natl Acad Sci* **113**, E1516–1525.
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P. & other authors. (2006).** Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**, 205–211.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. & Kim, S. K. (2013).** Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiol Res* **168**, 311–332. Elsevier GmbH.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. & Kim, S. K. (2014).** Pharmaceutically active secondary metabolites of marine *Actinobacteria*. *Microbiol Res* **169**, 262–278. Elsevier GmbH.
- Mann, D. G. & Droop, S. J. M. (1996).** Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. *Hydrobiologia* **336**, 19–32.
- Mann, D. G. (1999).** The species concept in diatoms. *Phycologia* **38**, 437–495.
- Mann, D. G. & Vanormelingen, P. (2013).** An inordinate fondness? The number, distributions, and origins of diatom species. *J Eukaryot Microbiol* **60**, 414–20.

- Marchetti, A., Schruth, D. M., Durkin, C. A., Parker, M. S., Kodner, R. B., Berthiaume, C. T., Morales, R., Allen, A. E. & Armbrust, E. V. (2012).** Comparative metatranscriptomics identifies molecular bases for the physiological responses of phytoplankton to varying iron availability. *Proc Natl Acad Sci* **109**, E317–E325.
- Martins, C. A., Alvito, P., Tavares, M. J., Doucette, G., Franca, S., Joa, M. & Pereira, P. (2003).** Reevaluation of production of paralytic shellfish toxin by bacteria associated with dinoflagellates of the Portuguese coast. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5693–5698.
- Mather, W. W., Emmons, E., Vanuxem, L. & Hall, J. (1843).** Geology of New-York: Part 1, Comprising the geology of the first geological district. Carroll & Cook, Printers to the Assembly.
- Matteson, A. R., Loar, S. N., Pickmere, S., DeBruyn, J. M., Ellwood, M. J., Boyd, P. W., Hutchins, D. a & Wilhelm, S. W. (2012).** Production of viruses during a spring phytoplankton bloom in the South Pacific Ocean near of New Zealand. *FEMS Microbiol Ecol* **79**, 709–719.
- Mayali, X. & Azam, F. (2004).** Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *J Eukaryot Microbiol* **51**, 139–144.
- Mayali, X. & Doucette, G. J. (2002).** Microbial community interactions and population dynamics of an algicidal bacterium active against *Karenia brevis* (Dinophyceae). *Harmful Algae* **1**, 277–293.
- Mayali, X., Franks, P. J. S. & Azam, F. (2008).** Cultivation and ecosystem role of a marine *Roseobacter* clade-affiliated cluster bacterium. *Appl Environ Microbiol* **74**, 2595–2603.
- Mayali, X., Franks, P. J. S. & Burton, R. S. (2011).** Temporal attachment dynamics by distinct bacterial taxa during a dinoflagellate bloom. *Aquat Microb Ecol* **63**, 111–122.
- McCarthy, S. A., Johnson, R. M. & Kakimoto, D. (1994).** Characterization of an antibiotic produced by *Alteromonas luteoviolacea* Gauthier 1982, 85 isolated from Kinko Bay, Japan. *J Appl Bacteriol* **77**, 426–432.
- Medlin, L. K. (2016).** Evolution of the diatoms: major steps in their evolution and a review of the supporting molecular and morphological evidence. *Phycologia* **55**, 79–103.
- Medlin, L. K. & Kaczmarek, I. (2004).** Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. *Phycologia* **43**, 245–270.
- Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P. & Göker, M. (2014).** Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 352–356.
- Menezes, C. B. A., Bonugli-Santos, R. C., Miqueletto, P. B., Passarini, M. R. Z., Silva, C. H. D., Justo, M. R., Leal, R. R., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V. M. & other authors. (2010).** Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiol Res* **165**, 466–482.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989).** Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159–167.
- Mesbah, N. M., Whitman, W. B. & Mesbah, M. (2011).** Determination of the G+C content of prokaryotes. In *Taxon Prokaryotes*, pp. 299–324. Edited by F. Rainey & A. Oren. Academic Press.
- Metting, B. & Pyne, J. W. (1986).** Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb Technol* **8**, 386–394.

- Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Chong, W. T., Lam, M. K., Loh, P. K. & Vellayan, V. (2016).** Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renew Sustain Energy Rev* **58**, 180–197. Elsevier.
- Milici, M., Tomasch, J., Wos-Oxley, M. L., Wang, H., Jáuregui, R., Camarinha-Silva, A., Deng, Z.-L., Plumeier, I., Giebel, H.-A. & other authors. (2016).** Low diversity of planktonic bacteria in the tropical ocean. *Sci Rep* **6**, 19054.
- Miller, T. R., Hnilicka, K., Dziedzic, A., Desplats, P. & Belas, R. (2004).** Chemotaxis of *Silicibacter* sp. strain TM1040 toward dinoflagellate products. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4692–4701.
- Milligan, A. J. & Morel, F. M. M. (2002).** A proton buffering role for silica in diatoms. *Science* **297**, 1848–1850.
- Mincer, T. J. & Aicher, A. C. (2016).** Methanol production by a broad phylogenetic array of marine phytoplankton. *PLoS One* **11**, e0150820.
- Mitra, A. & Mukhopadhyay, S. (2016).** Biofilm mediated decontamination of pollutants from the environment. *AIMS Bioeng* **3**, 44–59.
- Mitsutani, A., Yamasaki, I., Kitaguchi, H., Kato, J., Ueno, S. & Ishida, Y. T. (2001).** Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp strain A25 by two-dimensional electrophoresis. *Phycologia* **40**, 286–291.
- Mitsutani, A., Takesue, K. & Kiritani, M. (1992).** Lysis of *Skeletonema costatum* by *Cytophaga* sp. isolated from the coastal water of the Ariake Sea. *Water* **58**, 2158–2167.
- Moeys, S., Frenkel, J., Lembke, C., Gillard, J. T. F., Devos, V., Van den Berge, K., Bouillon, B., Huysman, M. J. J., De Decker, S. & other authors. (2016).** A sex-inducing pheromone triggers cell cycle arrest and mate attraction in the diatom *Seminavis robusta*. *Sci Rep* **6**, 19252.
- Molina-Cárdenas, C. A., Sánchez-Saavedra, M. del P. & Licea-Navarro, A. F. (2016).** Decreasing of bacterial content in *Isochrysis galbana* cultures by using some antibiotics. *Rev Biol Mar Oceanogr* **51**, 101–112.
- Montanaro, L. & Arciola, C. R. (2000).** Studying bacterial adhesion to irregular or porous surfaces. In *Handb Bact Adhes Princ Methods, Appl*, pp. 331–343. Edited by Y. H. An & R. J. Friedman. Humana Press.
- Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G. B. & Worm, B. (2011).** How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biol* **9**, e1001127.
- Moran, M. A., Buchan, A., González, J. M., Heidelberg, J. F., Whitman, W. B., Kiene, R. P., Henriksen, J. R., King, G. M., Belas, R. & other authors. (2004).** Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature* **432**, 910–913.
- Moran, M. A., Reisch, C. R., Kiene, R. P. & Whitman, W. B. (2012).** Genomic insights into bacterial DMSP transformations. *Ann Rev Mar Sci* **4**, 523–542.
- Morris, R. M., Longnecker, K. & Giovannoni, S. J. (2006).** *Pirellula* and OM43 are among the dominant lineages identified in an Oregon coast diatom bloom. *Environ Microbiol* **8**, 1361–1370.
- Morris, R. M., Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., Siebold, W. A., Carlson, C. A. & Giovannoni, S. J. (2002).** SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* **420**, 806–810.
- Mostafa, S. (2012).** Microalgal biotechnology: prospects and applications. In *Plant Sci*, pp. 275–314. Edited by N. K. Dhal & S. C. Sahu.
- Moustafa, A., Beszteri, B. B., Maier, U. G., Bowler, C., Valentin, K. & Bhattacharya, D. (2009).** Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science* **324**, 1724–1726.

- Moustafa, A., Evans, A. N., Kulis, D. M., Hackett, J. D., Erdner, D. L., Anderson, D. M. & Bhattacharya, D. (2010).** Transcriptome profiling of a toxic dinoflagellate reveals a gene-rich protist and a potential impact on gene expression due to bacterial presence. *PLoS One* **5**.
- Mu, R. min, Fan, Z. qiu, Pei, H. yan, Yuan, X. liang, Liu, S. xiu & Wang, X. rong. (2007).** Isolation and algae-lysing characteristics of the algicidal bacterium B5. *J Environ Sci* **19**, 1336–1340.
- Mullins, T. D., Britschgi, T. B., Krest, R. L. & Giovannoni, S. J. (1995).** Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol Ocean* **40**, 148–158.
- Myklestad, S. M. (1995).** Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Sci Total Environ* **165**, 155–164.
- Nagai, S. & Imai, I. (1999).** Possibility for bio-control of harmful diatom blooms in *Coscinodiscus wailesii* by marine bacteria. *Microbes Environ* **14**, 253–262.
- Nagasaki, K., Yamaguchi, M. & Imai, I. (2000).** Algicidal activity of a killer bacterium against the harmful red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* isolated from Ago Bay, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* **66**, 666–673.
- Nair, S. & Simidu, U. (1987).** Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. *Appl Environ Microbiol* **53**, 2957–2962.
- Naviner, M., Bergé, J. P., Durand, P. & Le Bris, H. (1999).** Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture* **174**, 15–24.
- Needham, D. M. & Fuhrman, J. A. (2016).** Pronounced daily succession of phytoplankton, archaea and bacteria following a spring bloom. *Nat Microbiol* **1**, 16005.
- Nelson, D. M., Tréguer, P., Brzezinski, M. A., Leynaert, A. & Quéguiner, B. (1995).** Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem Cycles* **9**, 359–372.
- Newton, R. J., Griffin, L. E., Bowles, K. M., Meile, C., Gifford, S., Givens, C. E., Howard, E. C., King, E., Oakley, C. A. & other authors. (2010).** Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage. *ISME J* **4**, 784–798.
- Ng, W.-L. & Bassler, B. L. (2009).** Bacterial Quorum-Sensing network architectures. *Annu Rev Genet* **43**, 197–222.
- Nicolas, J. L., Corre, S. & Cochard, J. C. (2004).** Bacterial population association with phytoplankton cultured in a bivalve hatchery. *Microb Ecol* **48**, 400–413.
- Norris, T. E. & Koch, A. L. (1972).** Effect of growth rate on the relative rates of synthesis of messenger, ribosomal and transfer RNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **64**, 633–649.
- Nowack, E. C. M. & Melkonian, M. (2010).** Endosymbiotic associations within protists. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **365**, 699–712.
- Nygaard, K. & Tobiesen, A. (1993).** Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. *Limnol Oceanogr* **38**, 273–279.
- Odjadjare, E. C., Mutanda, T. & Olaniran, A. O. (2015).** Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. *Crit Rev Biotechnol* **In press**.
- Oh, H. M., Ahn, C. Y., Lee, Y. K., Ko, S. R. & Kim, H. S. (2015).** Microorganism *Rhizobium* sp. KB10 having properties of promoting growth of *Botryococcus braunii* and increasing fatty acid content - Patent US 9102972 B2.

- Oh, H.-Y., Cheon, J.-Y., Lee, J.-H., Hur, S.-B. & Ki, J.-S. (2010a). Nuclear rDNA characteristics for DNA taxonomy of the centric diatom *Chaetoceros* (*Bacillariophyceae*). *Algae* **25**, 65–70.
- Oh, H. M., Kwon, K. K., Kang, I., Kang, S. G., Lee, J. H., Kim, S. J. & Cho, J. C. (2010b). Complete genome sequence of ‘*Candidatus puniceispirillum marinum*’ IMCC1322, a representative of the SAR116 clade in the Alphaproteobacteria. *J Bacteriol* **192**, 3240–3241.
- Ōmori, M. & Ikeda, T. (1992). *Methods in marine zooplankton ecology*. USA: Krieger Publishing Company.
- Orsini, L., Sarno, D., Procaccini, G., Poletti, R., Dahlmann, J. & Montresor, M. (2002). Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (*Bacillariophyceae*) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species. *Eur J Phycol* **37**, 247–257.
- Orvain, F., Galois, R., Barnard, C., Sylvestre, A., Blanchard, G. & Sauriau, P. G. (2003). Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: an integrated approach in a tidal mesocosm. *Microb Ecol* **45**, 237–251.
- Paerl, H. W. & Millie, D. F. (1996). Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia* **35**, 160–167.
- Palazzo, A. F. & Lee, E. S. (2015). Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet* **6**.
- Palomo, S., Gonzalez, I., De La Cruz, M., Martin, J., Tormo, J. R., Anderson, M., Hill, R. T., Vicente, F., Reyes, F. & Genilloud, O. (2013). Sponge-derived Kocuria and Micrococcus spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. *Mar Drugs* **11**, 1071–1086.
- Park, K.-Y., Kim, M.-R. & Kim, S.-K. (1999). Isolation and characterization of algicidal bacteria KY1. *Korean J Fish Aquat Sci* **32**, 452–457.
- Park, S., Park, J. M., Lee, K. C., Bae, K. S. & Yoon, J. H. (2014). *Boseongicola aestuarii* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 2618–2624.
- Park, S., Park, J. M., Kang, C. H., Kim, S. G. & Yoon, J. H. (2015). *Pseudoseohaericola caenipelagi* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**, 1819–1824.
- Park, S. & Yoon, J. H. (2013). *Roseovarius sediminilitoris* sp. nov., isolated from seashore sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 1741–1745.
- Park, Y.-T., Park, J.-B., Chung, S.-Y., Song, B.-C., Lim, W.-A., Kim, C.-H. & Lee, W.-J. (1998). Isolation of marine bacteria killing red tide microalgae I. Isolation and algicidal properties of *Micrococcus* sp. LG-1 possessing killing activity for harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. *Korean J Fish Aquat Sci* **31**, 767–773.
- Parker, A. R. & Townley, H. E. (2007). Biomimetics of photonic nanostructures. *Nat Nanotechnol* **2**, 347–353.
- Parte, A. C. (2014). LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res* **42**, 613–616.
- Partensky, F., Hess, W. R. & Vault, D. (1999). *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 106–127.
- Passow, U. (2002). Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Prog Oceanogr* **55**, 287–333.
- Pathom-aree, W., Stach, J. E. M., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T. & Goodfellow, M. (2006). Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* **10**, 181–189.
- Patil, J. S. & Anil, A. C. (2005). Influence of diatom exopolymers and biofilms on metamorphosis in the barnacle *Balanus amphitrite*. *Mar Ecol Prog Ser* **301**, 231–245.

- Paul, C. & Pohnert, G. (2011).** Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis. *PLoS One* **6**, e21032.
- Paul, C. & Pohnert, G. (2013).** Induction of protease release of the resistant diatom *Chaetoceros didymus* in response to lytic enzymes from an algicidal bacterium. *PLoS One* **8**.
- Paul, C., Mausz, M. A. & Pohnert, G. (2013).** A co-culturing/metabolomics approach to investigate chemically mediated interactions of planktonic organisms reveals influence of bacteria on diatom metabolism. *Metabolomics* **9**, 349–359.
- Peano, C., Pietrelli, A., Consolandi, C., Rossi, E., Petiti, L., Tagliabue, L., De Bellis, G. & Landini, P. (2013).** An efficient rRNA removal method for RNA sequencing in GC-rich bacteria. *Microb Inform Exp* **3**.
- Persat, A., Inclan, Y. F., Engel, J. N., Stone, H. A. & Gitai, Z. (2015).** Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 7563–7568.
- Pfitzer, E. (1869).** Über den Bau und die Zellteilung der Diatomeen. *Bot Zeitung* **46**, 774–776.
- Philippe, H., Sörhannus, U., Baroin, A., Perasso, R., Gasse, F. & Adoutte, A. (1994).** Comparison of molecular and paleontological data in diatoms suggests a major gap in the fossil record. *J Evol Biol* **7**, 247–265.
- Pinhassi, J., Sala, M. M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, Ò., Malits, A. & Marrasé, C. (2004).** Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6753–6766.
- Pommier, T., Canbäck, B., Riemann, L., Boström, K. H., Simu, K., Lundberg, P., Tunlid, A. & Hagström, Å. (2007).** Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol Ecol* **16**, 867–880.
- Prasetya, F. S., Safitri, I., Widowati, I., Cognie, B., Decottignies, P., Gastineau, R., Morançais, M., Windarto, E., Tremblay, R. & Mouget, J.-L. (2015).** Does allelopathy affect co-culturing *Haslea ostrearia* with other microalgae relevant to aquaculture? *J Appl Phycol* In press.
- Prechtel, J., Kneip, C., Lockhart, P., Wenderoth, K. & Maier, U. G. (2004).** Intracellular spheroid bodies of *Rhopalodia gibba* have nitrogen-fixing apparatus of cyanobacterial origin. *Mol Biol Evol* **21**, 1477–1481.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2003).** *Microbiology*, 2nd edn. De Boeck.
- Pujalte, M. J., Lucena, T., Ruvira, M. A., Arahall, D. R. & Macian, M. C. (2014).** The family *Rhodobacteraceae*. In *Prokaryotes - Alphaproteobacteria Betaproteobacteria*, pp. 439–512. Edited by E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt & F. Thompson. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ramanan, R., Kang, Z., Kim, B.-H., Cho, D.-H., Jin, L., Oh, H.-M. & Kim, H.-S. (2015).** Phycosphere bacterial diversity in green algae reveals an apparent similarity across habitats. *Algal Res* **8**, 140–144. Elsevier B.V.
- Rappé, M. S. & Giovannoni, S. J. (2003).** The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* **57**, 369–394.
- Rappé, M. S., Kemp, P. F. & Giovannoni, S. J. (1997).** Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. *Limnol Oceanogr* **42**, 811–826.
- Rappé, M. S., Vergin, K. & Giovannoni, S. J. (2000).** Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. *FEMS Microbiol Ecol* **33**, 219–232.

- Rappé, M. S., Connon, S. a, Vergin, K. L. & Giovannoni, S. J. (2002).** Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**, 630–633.
- Rashidan, K. K. & Bird, D. F. (2001).** Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom. *Microb Ecol* **41**, 97–105.
- Rauhut, R. & Klug, G. (1999).** mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 353–370.
- Raven, J. A. & Waite, A. M. (2004).** The evolution of silicification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape? *New Phytol* **45–61**.
- Raven, J. A. (1983).** The transport and function of silicon in plants. *Biol Rev* **58**, 179–207.
- Raven, J. A. & Giordano, M. (2016).** Combined Nitrogen. In *Physiol Microalgae*, pp. 143–154. Edited by M. A. Borowitzka, J. Beardall & J. A. Raven. Springer International Publishing.
- Reen, F. J., Mooij, M. J., Holcombe, L. J., Mcsweeney, C. M., Mcglacken, G. P., Morrissey, J. P. & O’Gara, F. (2011).** The *Pseudomonas quinolone* signal (PQS), and its precursor HHQ, modulate interspecies and interkingdom behaviour. *FEMS Microbiol Ecol* **77**, 413–428.
- Richter, M. & Rosselló-Móra, R. (2009).** Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19126–19131.
- Riemann, L., Steward, G. F. & Azam, F. (2000).** Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom **66**, 578–587.
- Rink, B., Seeberger, S., Martens, T., Duerselen, C. D., Simon, M. & Brinkhoff, T. (2007).** Effects of phytoplankton bloom in a coastal ecosystem on the composition of bacterial communities. *Aquat Microb Ecol* **48**, 47–60.
- Robert, R. & Trintignac, P. (1995).** Microalgues et nutrition larvaire en éclosion de mollusques. *Haliothis* **26**, 1–13.
- Rohwer, F. & Thurber, R. V. (2009).** Viruses manipulate the marine environment. *Nature* **459**, 207–212.
- Rooney-Varga, J. N., Giewat, M. W., Savin, M. C., Sood, S., Legresley, M. & Martin, J. L. (2005).** Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microb Ecol* **49**, 163–175.
- Rosing, M. T. & Frei, R. (2004).** U-rich Archaean sea-floor sediments from Greenland - indications of > 3700 Ma oxygenic photosynthesis. *Earth Planet Sci Lett* **217**, 237–244.
- Rothpletz, A. (1896).** Ueber die Flysch-Fucoiden und einige andere fossile Algen, sowie über liasische, Diatomeen führende Hornschwämme. *Zeitschrift der Dtsch Geol Gesellschaft* **48**, 854–914. Stuttgart, Germany: Schweizerbart Science Publishers.
- Round, F. E., Crawford, R. M. & Mann, D. G. (1990).** *The diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press.
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D. & Kirk, P. M. (2015).** A higher level classification of all living organisms. *PLoS One* **10**, e0119248.
- Rusch, D. B., Lombardo, M.-J., Yee-Greenbaum, J., Novotny, M., Brinkac, L. M., Lasken, R. S. & Dupont, C. L. (2013).** Draft genome sequence of a single cell of SAR86 clade subgroup IIIa. *Genome Announc* **1**, e00030–12.
- Sakata, T. (1990).** Occurrence of marine algicidal *Saprospira* sp. possessing activity for diatoms. *Nippon Suisan Gakkaishi* **56**.

- Sakata, T. & Yasumoto, H. (1991).** Colony formation by algicidal *Saprospira* sp. on marine agar plates. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**, 2139–2143.
- Sakata, T., Fujita, Y. & Yasumoto, H. (1991).** Plaque formation by algicidal *Saprospira* sp. on a lawn of *Chaetoceros ceratosporum*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**, 1147–1152.
- Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K. R. & Briand, J. F. (2013).** Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ Microbiol* **15**, 2879–2893.
- Sánchez-Saavedra, M. D. P., Licea-Navarro, A. & Bernáldez-Sarabia, J. (2010).** Evaluation of the antibacterial activity of different species of phytoplankton. *Rev Biol Mar Oceanogr* **45**, 531–536.
- Sanchez, C. (2015).** Diatomées : de la dynamite au cristal photonique. In *Interfaces Chim des matériaux-biologie-médecine II*.
- Sapp, M., Wichels, A., Wiltshire, K. H. & Gerdts, G. (2007a).** Bacterial community dynamics during the winter-spring transition in the North Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **59**, 622–637.
- Sapp, M., Schwaderer, A. S., Wiltshire, K. H., Hoppe, H. G., Gerdts, G. & Wichels, A. (2007b).** Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? *Microb Ecol* **53**, 683–699.
- Sapp, M., Wichels, A. & Gerdts, G. (2007c).** Impacts of cultivation of marine diatoms on the associated bacterial community. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3117–3120.
- Sarkar, N. (1997).** Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* **66**, 173–197.
- Sarno, D., Kooistra, W. H. C. F., Medlin, L. K., Percopo, I. & Zingone, A. (2005).** Diversity in the genus *Skeletonema* (*Bacillariophyceae*). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *J Phycol* **41**, 151–176.
- Sasser, M. (1990).** Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. In *MIDI Tech Note no 101 Microb ID, Inc, Newark*.
- Sawayama, S., Sako, Y., Ishida, Y., Niimura, K., Abe, A. & Hiroishi, S. (1991).** Purification and structure determination of the bacterial mating inhibitor for *Chlamydomonas reinhardtii* and *Alexandrium catenella*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**, 307–314.
- Scala, S. & Bowler, C. (2001).** Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1666–1673.
- Scalan, D. J. & West, N. J. (2002).** Molecular ecology of the marine cyanobacteria genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiol Ecol* **40**, 1–12.
- Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H. & Muyzer, G. (2002).** Genetic diversity of ‘satellite’ bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiol Ecol* **42**, 25–35.
- Scholin, C. A., Villac, M. C., Buck, K. R., Krupp, J. M., Powers, D. A., Fryxell, G. A. & Chavez, F. P. (1994).** Ribosomal DNA sequences discriminate among toxic and non-toxic *Pseudonitzschia* species. *Nat Toxins* **2**, 152–165.
- Scholin, C. A., Gulland, F., Doucette, G. J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F. P., Cordaro, J., DeLong, R., De Vogelaere, A. & other authors. (2000).** Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* **403**, 80–84.
- Scholz, B., Guillou, L., Marano, A. V., Neuhauser, S., Sullivan, B. K., Karsten, U., Küpper, F. C. & Gleason, F. H. (2016).** Zoosporic parasites infecting marine diatoms – a black box that needs to be opened. *Fungal Ecol* **19**, 59–76.
- Schopf, J. W. (1993).** Microfossils of the early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* **260**, 640–646.

- Schopf, J. W. & Packer, B. M. (1987).** Early Archean (3.3-Billion to 3.5-Billion-Year-Old) Microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* **237**, 70–73.
- Schrader, H.-J. & Fenner, J. (1976).** Norwegian sea cenozoic diatom biostratigraphy and taxonomy. In *DSDP Initial Rep 38*, US Govt Pr., pp. 921–1099. Edited by M. Talwani & G. Udintsev. Washington.
- Senhorinh, G. N. A., Ross, G. M. & Scott, J. A. (2015).** Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics. *Phycologia* **54**, 271–282.
- Seong, K. A., Jeong, H. J., Shin, K., Kim, G. H. & Kang, J. H. (2006).** Bacterivory by co-occurring red-tide algae, heterotrophic nanoflagellates, and ciliates. *Mar Ecol Prog Ser* **322**, 85–97.
- Seyedsayamdost, M. R., Case, R. J., Kolter, R. & Clardy, J. (2011a).** The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nat Chem* **3**, 331–335.
- Seyedsayamdost, M. R., Carr, G., Kolter, R. & Clardy, J. (2011b).** Roseobactin: Small molecule modulators of an algal-bacterial symbiosis. *J Am Chem Soc* **133**, 18343–18349.
- Sharifah, E. N. & Eguchi, M. (2011).** The phytoplankton *Nannochloropsis oculata* enhances the ability of roseobacter clade bacteria to inhibit the growth of fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *PLoS One* **6**, e26756.
- Shen, P., van Rijssel, M., Wang, Y., Songhui, L., Jufang, C. & Qi, Y. (2004).** Toxic *Phaeocystis globosa* strain from China grow at remarkably high temperatures. In *Harmful algae 2002*, pp. 396–398. Edited by K. A. Steidinger, J. H. Landsberg, C. R. Tomas & G. A. Vargo. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Sher, D., Thompson, J. W., Kashtan, N., Croal, L. & Chisholm, S. W. (2011).** Response of *Prochlorococcus* ecotypes to co-culture with diverse marine bacteria. *ISME J* **5**, 1125–1132.
- Shiba, T. (1991).** *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll a. *Syst Appl Microbiol* **14**, 140–145. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart · New York.
- Sieburth, J. M., Smetacek, V. & Lenz, J. (1978).** Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol Oceanogr* **23**, 1256–1263.
- Silver, M. W., Bargu, S., Coale, S. L., Benitez-Nelson, C. R., Garcia, A. C., Roberts, K. J., Sekula-Wood, E., Bruland, K. W. & Coale, K. H. (2010).** Toxic diatoms and domoic acid in natural and iron enriched waters of the oceanic Pacific. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20762–20767.
- Simon, M., Grossart, H. P., Schweitzer, B. & Ploug, H. (2002).** Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat Microb Ecol* **28**, 175–211.
- Simon, M., Cho, B. C. & Azam, F. (1992).** Significance of bacterial biomass in lakes and the ocean: comparison to phytoplankton biomass and biogeochemical implications. *Mar Ecol Prog Ser* **86**, 103–110.
- Sims, P. A., Mann, D. G. & Medlin, L. K. (2006).** Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia* **45**, 361–402.
- Simu, K. & Hagström, Å. (2004).** Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2445–2451.

- Sison-Mangus, M. P., Jiang, S., Tran, K. N. & Kudela, R. M. (2014).** Host-specific adaptation governs the interaction of the marine diatom, *Pseudo-nitzschia* and their microbiota. *ISME J* **8**, 63–76.
- Skerratt, J. H., Bowman, J. P., Hallegraeff, G., James, S. & Nichols, P. D. (2002).** Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Mar Ecol Prog Ser* **244**, 1–15.
- Smetacek, V. (1999).** Diatoms and the ocean carbon cycle. *Protist* **150**, 25–32.
- Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (1994).** Phenotypic characterization. In *Methods Gen Mol Bacteriol*, American S., pp. 607–654. Edited by P. Gerhardt, R. G. EMurray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC.
- Smith, D. C., Simon, M., Alldredge, A. L. & Azam, F. (1992).** Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* **359**, 139–142.
- Smol, J. P. & Stoermer, E. F. (2010).** *The Diatoms: applications for the environmental and Earth sciences*, 2nd edn. Cambridge University Press.
- Song, J., Oh, H. M. & Cho, J. C. (2009).** Improved culturability of SAR11 strains in dilution-to-extinction culturing from the East Sea, West Pacific Ocean. *FEMS Microbiol Lett* **295**, 141–147.
- Spormann, A. M. (1999).** Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 621–641.
- Spring, S., Scheuner, C., Göker, M. & Klenk, H. P. (2015).** A taxonomic framework for emerging groups of ecologically important marine gammaproteobacteria based on the reconstruction of evolutionary relationships using genome-scale data. *Front Microbiol* **6**, 281.
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006).** Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* **33**, 152–155.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kampfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J. & other authors. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043–1047.
- Staley, J. T. & Konopka, A. (1985).** Microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**, 321–346.
- De Stefano, L., Rea, I., Rendina, I., De Stefano, M. & Moretti, L. (2007).** Lensless light focusing with the centric marine diatom *Coscinodiscus walesii*. *Opt Express* **15**, 18082–18088.
- Stewart, E. J. (2012).** Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol* **194**, 4151–4160.
- Stewart, F. J., Ottesen, E. A. & DeLong, E. F. (2010).** Development and quantitative analyses of a universal rRNA-subtraction protocol for microbial metatranscriptomics. *ISME J* **4**, 896–907.
- Stewart, J. R. & Brown, R. M. (1969).** Cytophaga that kills or lyses algae. *Science* **164**, 1523–1524.
- Stewart, J. E. (2008).** Bacterial involvement in determining domoic acid levels in *Pseudo-nitzschia multiseries* cultures. *Aquat Microb Ecol* **50**, 135–144.
- Stingl, U., Tripp, H. J. & Giovannoni, S. J. (2007).** 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.
- Stonik, V. & Stonik, I. (2015).** Low-molecular-weight metabolites from Diatoms: structures, biological roles and biosynthesis. *Mar Drugs* **13**, 3672–3709.
- Su, J. Q., Yang, X. R., Zheng, T. L., Tian, Y., Jiao, N. Z., Cai, L. Z. & Hong, H. S. (2007a).** Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* **6**, 799–810.

- Su, J. Q., Yang, X. R., Zheng, T. L. & Hong, H. S. (2007b).** An efficient method to obtain axenic cultures of *Alexandrium tamarens* - a PSP-producing dinoflagellate. *J Microbiol Methods* **69**, 425–430.
- Su, J. feng, Shao, S. cheng, Huang, T. lin, Ma, F., Lu, J. suo & Zhang, K. (2016).** Algicidal effects and denitrification activities of *Acinetobacter* sp. J25 against *Microcystis aeruginosa*. *J Environ Chem Eng* **4**, 1002–1007. Elsevier B.V.
- Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K. & Naidu, R. (2011).** Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnol Adv* **29**, 896–907. Elsevier Inc.
- Sun, H.-Y., Zhang, Y., Chen, H.-R., Hu, C.-X., Li, H. & Hu, Z.-L. (2016).** Isolation and characterization of the marine algicidal bacterium *Pseudoalteromonas* S1 against the harmful alga *Akashiwo sanguinea*. *Mar Biol* **163**, 66. Springer Berlin Heidelberg.
- Sussman, M., Mieog, J. C., Doyle, J., Victor, S., Willis, B. L. & Bourne, D. G. (2009).** Vibrio zinc-metalloprotease causes photoinactivation of coral endosymbionts and coral tissue lesions. *PLoS One* **4**, e4511.
- Suttle, C. A. (2000).** Ecological, evolutionary, and geochemical consequences of viral infection of cyanobacteria and eukaryotic algae. In *Viral Ecol*, pp. 247–296. Edited by C. J. Hurst. San Diego, CA: Academic Press.
- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S. & Yamamoto, S. (2001).** Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen . nov . with *Tenacibaculum maritimum* comb . nov . and *Tenacibaculum ovolyticum* comb . nov ., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp . nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1639–1652.
- Swan, B. K., Tupper, B., Sczyrba, A., Lauro, F. M., Martinez-Garcia, M., González, J. M., Luo, H., Wright, J. J., Landry, Z. C. & other authors. (2013).** Prevalent genome streamlining and latitudinal divergence of planktonic bacteria in the surface ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Swingley, W. D., Sadekar, S., Mastrian, S. D., Matthies, H. J., Hao, J., Ramos, H., Acharya, C. R., Conrad, A. L., Taylor, H. L. & other authors. (2007).** The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *J Bacteriol* **189**, 683–690.
- Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984).** Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **25**, 125–128.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729.
- Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennis, C. M., Kassabgy, M., Huang, S., Mann, A. J. & other authors. (2012).** Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Sci (New York, NY)* **336**, 608–611.
- Teeling, H., Fuchs, B. M., Bennis, C. M., Krüger, K., Chafee, M., Kappelmann, L., Reintjes, G., Waldmann, J., Quast, C. & other authors. (2016).** Recurring patterns in bacterioplankton dynamics during coastal spring algae blooms. *Elife* **5**, e11888.
- Tendencia, E. A. & Dela Peña, M. (2003).** Investigation of some components of the greenwater system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. *Aquaculture* **218**, 115–119.

- Thingstad, T. F., Skjoldal, E. F. & Bohne, R. A. (1993).** Phosphorus cycling and algal-bacterial competition in Sandsfjord, western Norway. *Mar Ecol Prog Ser* **99**, 239–259.
- Tindall, B. J. (1990).** Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Lett* **66**, 199–202.
- Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (2007).** Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In *Methods Gen Mol Microbiol 3rd edn*, pp. 330–393. Edited by C. A. Reddy, T. J. Beveridge, J. A. Breznak, G. Marzluf, T. M. Schmidt & L. R. Snyder. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W. & Kämpfer, P. (2010).** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 249–266.
- Toft, C. & Andersson, S. G. E. (2010).** Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nat Rev Genet* **11**, 465–475.
- Tomaru, Y., Toyoda, K. & Kimura, K. (2015).** Marine diatom viruses and their hosts: resistance mechanisms and population dynamics. *Perspect Phycol* **2**, 69–81.
- Tomas, C. R. (1997).** *Identifying marine phytoplankton*, Academic p. San Diego, CA: Elsevier Science.
- Toncheva-Panova, T. & Ivanova, J. (1997).** A bacterial pathogen of *Rhodella reticulata*. *J Appl Microbiol* **83**, 707–711.
- Tréguer, P., Nelson, D. M., Van Bennekom, A. J., Demaster, D. J., Leynaert, A. & Quéguiner, B. (1995).** The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science* **268**, 375–379.
- Trottet, A., Fouilland, E., Leboulanger, C., Lanouguère, E. & Bouvy, M. (2011).** Use of inhibitors for coastal bacteria and phytoplankton: Application to nitrogen uptake measurement. *Estuar Coast Shelf Sci* **93**, 151–159. Elsevier Ltd.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. & Palmer, J. D. (1999).** Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* **46**, 327–338.
- Usher, K. M., Bergman, B. & Raven, J. A. (2007).** Exploring cyanobacterial mutualisms. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **38**, 255–273.
- Valliappan, K., Sun, W. & Li, Z. (2014).** Marine actinobacteria associated with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 7365–7377.
- Vaqué, D., Duarte, C. M. & Marrasé, C. (1989).** Phytoplankton colonization by bacteria: encounter probability as a limiting factor. *Mar Ecol Prog Ser* **54**, 137–140.
- Vartoukian, S. R., Palmer, R. M. & Wade, W. G. (2010).** Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **309**, 1–7.
- Vercruyse, M., Fauvart, M., Cloots, L., Engelen, K., Thijs, I. M., Marchal, K. & Michiels, J. (2010).** Genome-wide detection of predicted non-coding RNAs in *Rhizobium etli* expressed during free-living and host-associated growth using a high-resolution tiling array. *BMC Genomics* **11**, 53.
- Vessey, J. K. (2003).** Plant growth promoting *Rhizobacteria* as biofertilizers. *Plant Soil* **255**, 571–586.
- Viso, A. C., Pesando, D. & Baby, C. (1987).** Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture. *Bot Mar* **30**, 41–46.

- Voget, S., Wemheuer, B., Brinkhoff, T., Vollmers, J., Dietrich, S., Giebel, H.-A., Beardsley, C., Sardemann, C., Bakenhus, I. & other authors. (2015). Adaptation of an abundant *Roseobacter* RCA organism to pelagic systems revealed by genomic and transcriptomic analyses. *ISME J* **9**, 371–384.
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I. & Garland, C. D. (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J Exp Mar Bio Ecol* **128**, 219–240.
- Wadhams, G. H. & Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 1024–37.
- Wagner-Döbler, I., Ballhausen, B., Berger, M., Brinkhoff, T., Buchholz, I., Bunk, B., Cypionka, H., Daniel, R., Drepper, T. & other authors. (2010). The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *ISME J* **4**, 61–77.
- Wang, H., Tomasch, J., Jarek, M. & Wagner-Döbler, I. (2014). A dual-species co-cultivation system to study the interactions between *Roseobacters* and dinoflagellates. *Front Microbiol* **5**.
- Wang, L., Liu, Y., Shi, X., Wang, Y., Zheng, Y., Dai, X. & Zhang, X.-H. (2016). *Xuhuaishuia manganoxidans* gen. nov. sp. nov., a manganese-oxidizing bacterium isolated from deep-sea sediment of Pacific polymetallic nodule province. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**, 1521–1526.
- Ward, A. C. & Bora, N. (2006). Diversity and biogeography of marine *Actinobacteria*. *Curr Opin Microbiol* **9**, 279–286.
- Waterbury, J. B., Watson, S. W., Valois, F. W. & Franks, D. G. (1986). Biological and ecological characterisation of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. In *Photosynth Picoplankt*, pp. 71–120. Edited by T. Platt & W. K. W. Li. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E. & other authors. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463–464.
- Werner, D. (1977). *The Biology of Diatoms*. Berkeley and Los Angeles: University of California Press.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6578–6583.
- Van Wichelen, J., Vanormelingen, P., Codd, G. A. & Vyverman, W. (2016). The common bloom-forming cyanobacterium *Microcystis* is prone to a wide array of microbial antagonists. *Harmful Algae* **55**, 97–111. Elsevier B.V.
- Wilkie, A. C., Edmundson, S. J. & Duncan, J. G. (2011). Indigenous algae for local bioresource production: Phycoprospecting. *Energy Sustain Dev* **15**, 365–371. International Energy Initiative.
- Wommack, K. E. & Colwell, R. R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 69–114.
- Worden, A. Z., Follows, M. J., Giovannoni, S. J., Wilken, S., Zimmerman, A. E. & Keeling, P. J. (2015). Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science* **347**, 1257594.
- Wu, D., Hugenholtz, P., Mavromatis, K., Pukall, R., Dalin, E., Ivanova, N. N., Kunin, V., Goodwin, L., Wu, M. & other authors. (2009). A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature* **462**, 1056–1060.
- Xia, A. & Murphy, J. D. (2016). Microalgal cultivation in treating liquid digestate from biogas systems. *Trends Biotechnol* **34**, 264–275. Elsevier Ltd.

- Xie, B., Bishop, S., Stessman, D., Wright, D., Spalding, M. H. & Halverson, L. J. (2013). *Chlamydomonas reinhardtii* thermal tolerance enhancement mediated by a mutualistic interaction with vitamin B12-producing bacteria. *ISME J* **7**, 1544–55.
- Yang, C., Li, Y., Zhou, B., Zhou, Y., Zheng, W., Tian, Y., Van Nostrand, J. D., Wu, L., He, Z. & other authors. (2015a). Illumina sequencing-based analysis of free-living bacterial community dynamics during an *Akashiwo sanguine* bloom in Xiamen sea, China. *Sci Rep* **5**, 8476.
- Yang, C., Song, G., Zhu, Q., Liu, S. & Xia, C. (2016). The influence of bacterial quorum-sensing inhibitors against the formation of the diatom-biofilm. *Chem Ecol* **1–13**. Taylor & Francis.
- Yang, Q., Chen, L., Hu, X., Zhao, L., Yin, P. & Li, Q. (2015b). Toxic effect of a marine bacterium on aquatic organisms and its algicidal substances against *Phaeocystis globosa*. *PLoS One* **10**, e0114933.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R. & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* **12**, 635–645.
- Yasser, E.-N. & Adli, A. (2014). Toxicity of single and mixtures of antibiotics to cyanobacteria. *J Environ Anal Toxicol* **5**.
- Yilmaz, P., Yarza, P., Rapp, J. Z. & Glöckner, F. O. (2016). Expanding the world of marine bacterial and archaeal clades. *Front Microbiol* **6**, 15124.
- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G. & Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* **21**, 809–818.
- Yoshinaga, I., Kawai, T. & Ishida, Y. (1995). Lysis of *Gymnodinium nagasakiense* by marine bacteria. In *Harmful Mar algal Bloom*, pp. 687–692. Edited by P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien & C. Marcaillou. Paris: Lavoisier Science Publications.
- Yoshinaga, I., Kim, M. C., Katanozaka, N., Imai, I., Uchida, A. & Ishida, Y. (1998). Population structure of algicidal marine bacteria targeting the red tide forming alga *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*), determined by restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial 16S ribosomal RNA genes. *Mar Ecol Prog Ser* **170**, 33–44.
- Yoshinaga, I., Kawai, T. & Ishida, Y. (1997). Analysis of algicidal ranges of the bacteria killing the marine dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* isolated from Tanabe Bay, Wakayama Pref, Japan. *Fish Sci* **63**, 94–98.
- Youn, J. & Hur, S. B. (2007). Antibiotics and their optimum concentration for axenic culture of marine microalgae. *Algae* **22**, 229–234.
- Youssef, N. H., Couger, M. B., McCully, A. L., Criado, A. E. G. & Elshahed, M. S. (2015). Assessing the global phylum level diversity within the bacterial domain: a review. *J Adv Res* **6**, 269–282.
- Yutin, N., Suzuki, M. T. & Be, O. (2005). Novel primers reveal wider diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8958–8962.
- Zaborin, A., Romanowski, K., Gerdes, S., Holbrook, C., Lepine, F., Long, J., Poroyko, V., Diggle, S. P., Wilke, A. & other authors. (2009). Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6327–6332.
- Zahn, K., Inui, M. & Yukawa, H. (1999). Characterization of a separate small domain derived from the 5' end of 23S rRNA of an alpha-proteobacterium. *Nucleic Acids Res* **27**, 4241–4250.

- Zahn, K., Inui, M. & Yukawa, H. (2000). Divergent mechanisms of 5' 23S rRNA IVS processing in the *alpha*-proteobacteria. *Nucleic Acids Res* **28**, 4623–4633.
- Zehr, J. P. & Kudela, R. M. (2011). Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. *Ann Rev Mar Sci* **3**, 197–225.
- Zhang, B., Cai, G., Wang, H., Li, D., Yang, X., An, X., Zheng, X., Tian, Y., Zheng, W. & Zheng, T. (2014). *Streptomyces alboflavus* RPS and its novel and high algicidal activity against harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa*. *PLoS One* **9**.
- Zhang, X., Tian, X., Ma, L., Feng, B., Liu, Q., Yuan, L., Fan, C., Huang, H. & Yang, Q. (2015). Biodiversity of the symbiotic bacteria associated with toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *J Biosci Med* **3**, 23–28.
- Zheng, L., Cui, Z., Xu, L., Sun, C., Powell, R. J. & Hill, R. T. (2015). Draft genome sequence of *Rhodobacteraceae* Strain PD-2, an algicidal bacterium with a quorum-Sensing System, Isolated from the marine microalga *Prorocentrum donghaiense*. *Genome Announc* **3**, e01549–14.
- Zhou, J., Lao, Y.-M., Ma, Z.-P. & Cai, Z.-H. (2016). Genome sequence of *Enterobacter* sp. ST3, a quorum sensing bacterium associated with marine dinoflagellate. *Genomics Data* **7**, 195–199. Elsevier B.V.
- Zhu, X., Rong, J., Chen, H., He, C., Hu, W. & Wang, Q. (2016). An informatics-based analysis of developments to date and prospects for the application of microalgae in the biological sequestration of industrial flue gas. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 2073–2082.
- Zinger, L., Amaral-Zettler, L. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., Huse, S. M., Welch, D. B. M., Martiny, J. B. H., Sogin, M., Boetius, A. & Ramette, A. (2011). Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS One* **6**, e24570.
- Zubkov, M. V., Fuchs, B. M., Archer, S. D., Kiene, R. P., Amann, R. & Burkill, P. H. (2001). Linking the composition of bacterioplankton to rapid turnover of dissolved dimethylsulphoniopropionate in an algal bloom in the North Sea. *Environ Microbiol* **3**, 304–311.
- Zusman, D. R., Scott, A. E., Yang, Z. & Kirby, J. R. (2007). Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat Rev Microbiol* **5**, 862–872.

ANNEXE

Chapter #11 Photosymbiosis in marine pelagic environments

Fabrice Not¹, Ian Probert¹, Catherine Gerikas-Ribeiro², Klervi Crenn¹, Laure Guillou¹, Christian Jeanthon¹, Daniel Vaultot¹.

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, UMR 7144, Station Biologique, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France

² Departamento de Oceanografia Biológica, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Abstract

Photosymbiosis is a symbiotic relationship between two or more organisms, one of which is capable of photosynthesis. Like other forms of symbiosis, photosymbioses can involve the full spectrum of trophic interactions from mutualism through commensalism to parasitism. As in marine benthic environments (e.g. coral reef ecosystems), photosymbiotic associations are frequently encountered in marine pelagic environments and can involve various combinations of microalgae with prokaryotes, protists or metazoans. Here we aim to provide a brief overview of current knowledge on the diversity of the organisms involved in pelagic photosymbioses, their ecological role and their significance in the ecosystem. This chapter focuses on mutualistic interactions occurring between photosynthetic protists and prokaryotes, between two protists and between microalgae and metazoans, as well as on photosymbiotic interactions involving parasitic protists. A section reviewing the most common and recent approaches used to study pelagic photosymbioses and presenting general perspectives in the field concludes the chapter.

1. Introduction

While studying the formation of lichens in the 19th century, H. A. de Bary first coined the term "symbiosis" as "the living together of unlike organisms" (de Bary 1879). This definition is broad and technically includes any distinct taxa, from any kingdom of life, that are physically in contact and that have an enduring relationship over multiple generations. Symbiosis therefore includes the full spectrum of trophic interactions, from mutualism through commensalism to parasitism.

Photosymbiosis is a symbiotic relationship between two (or more) organisms, one of which is capable of photosynthesis. Photosynthesis originated in cyanobacteria and has since spread across the eukaryotic tree of life by multiple serial endosymbiotic events, leading to the evolution of multiple lineages of algae, one of which (the Chlorobionta) was at the origin of the 'higher' terrestrial plants. Photosymbiosis has thus been, and still is, a highly significant evolutionary process, but is also a key ecological interaction for ecosystem functioning both on land and in the oceans (Thompson 1999). Terrestrial plants are involved in many well-known photosymbiotic relationships, both mutualistic (e.g. with nitrogen-fixing bacteria in root nodules) and parasitic (e.g. with the oomycete *Phytophthora*

infestans causing the disease known as potato blight). Unicellular algae are also involved in some prominent symbiotic relationships in terrestrial environments, notably in partnership with filamentous fungi in lichens.

The best-known photosymbiotic relationship in the marine environment is the association of cnidarian corals with unicellular algae from the dinoflagellate genus *Symbiodinium*. This photosymbiotic relationship structures and sustains benthic reef ecosystems and has been extensively studied, notably in relation to the negative impact of stresses linked to environmental change ('coral bleaching', e.g. Sampayo et al. 2008). Unicellular algae are involved in mutualistic symbiotic relationships with a number of other benthic hosts in the marine environment, including other cnidarians such as sea anemones, molluscs such as the giant clam *Tridacna*, and acoel flatworms (Bailey et al. 2014). Benthic seaweeds are known to have a number of prokaryotic, unicellular eukaryotic (= 'protistan') and macroalgal parasites and some unicellular algae have been reported to parasitize benthic invertebrates (Trench 1993).

Photosymbiotic associations are also frequently encountered in the marine pelagic environment and can involve various combinations of microalgae with prokaryotes, protists or metazoans (Taylor 1982, Stoecker et al. 2009, Nowack and Melkonian 2010, Anderson 2012, Decelle et al. 2015, Jephcott et al. 2015). Despite the independently recognized key roles of oceanic plankton on the one hand and symbiosis on the other hand, the nature, diversity, and significance of pelagic photosymbioses are still relatively poorly understood. In this chapter we aim to provide a brief overview of the current knowledge of the diversity of the organisms involved in pelagic photosymbioses and their ecological role and significance in the ecosystem. The review will focus on mutualistic interactions occurring between photosynthetic protists and prokaryotes, between two protists and between microalgae and metazoans, as well as on photosymbiotic interactions involving parasitic protists. An overview of the most common approaches used to study pelagic photosymbioses and general perspectives in the field will conclude the chapter.

2 Symbioses between phytoplankton and cyanobacteria

2.1 Symbiotic nitrogen fixation

Nitrogen is a major limiting factor in oceanic ecosystems (Moore et al. 2013). Eukaryotes can only obtain nitrogen through the uptake of dissolved forms (mainly nitrates and ammonia), whereas some bacteria have the ability to fix dinitrogen (N_2) and convert it into particulate organic nitrogen. Land plants have developed symbioses with N_2 -fixing bacteria such as *Rhizobium* (Franche et al. 2009, Santi et al. 2013) and similar symbioses exist in eukaryotic phytoplankton. The earliest reports were from diatom-diazotroph associations (DDAs), with the cyanobacterial symbionts ('cyanobionts') *Richelia* (Ostenfeld and Schmidt 1901) and *Calothrix* (Lemmerman 1905). More recently, the unicellular N_2 -fixing cyanobacteria UCYN-A has been shown to form an unusual symbiosis with a unicellular haptophyte alga (Thompson et al. 2012). Diazotrophic cyanobacteria have also been documented to form symbiotic partnerships with a wide variety of eukaryotic marine organisms, like sponges, ascidians (although N_2 fixation in ascidians can be linked to *Rhizobiales*, see Erwin et al. 2014), flagellated protists, dinoflagellates, radiolarians, macroalgae and tintinnids (Carpenter & Foster 2002, Foster et al. 2006, and references therein).

2.2 Symbioses between cyanobacteria and diatoms

DDAs involve either filamentous heterocystous (e.g. *Calothrix rhizosolenia* and *Richelia intracellularis*) or unicellular (e.g. *Cyanothece* sp.) nitrogen-fixing cyanobacteria (Rai et al. 2002). DDAs are non-obligate endosymbioses between diatoms from several different genera (notably including *Hemiaulus*, *Rhizosolenia*, and *Chaetoceros*) and diazotrophic cyanobacteria. The diatom hosts and the cyanobacterial symbionts can be found free-living in the ocean, and horizontal transfer between cells and vertical transmission from host to daughter cell are both common. In diatom-*Richelia* associations, cyanobiont *hetR* sequences from the same host species vary by less than 1% which suggests a high degree of specificity, probably linked to vertical transmission of the cyanobiont during

the host division process (Janson et al. 1999). When in association, the diazotrophs appear to be localized in different regions of the diatom depending on the host species (Foster and O'Mullan 2008). After a long period in isolation, *Calothrix* trichomes start to change their morphological features, indicating host control of cyanobiont characteristics (Foster and O'Mullan 2008).

The metabolic influence of DDA symbioses on the cyanobiont has been observed in recent studies. Foster et al. (2011) estimated that symbiotic *Richelia* fixes up to 651% more N₂ than required for its own growth. Symbiont genome reduction can be an evolutionary consequence of long term nutrient exchanges pointing to an increasing dependency between symbiont and host. Genome streamlining of cyanobionts has been reported for *Richelia* in intracellular association with *Hemiaulus* (Hilton et al. 2013), with genome reduction mainly affecting genes related to nitrogen metabolism: symbionts have a reduced capability to assimilate urea or nitrate (lack of ammonium transporters, nitrate and nitrite reductases and glutamine:2-oxoglutarate aminotransferase), thus favouring N₂ fixation (Hilton et al. 2013). Diazotrophic cyanobacteria have evolved several mechanisms (both spatial and temporal) to overcome the deleterious effect of oxygen, a photosynthetic by-product, for the nitrogenase enzyme (Fay 1992, Berman-Frank et al. 2001, Thompson and Zehr 2013). In *Richelia intracellaris* in symbiosis with *Rhizosolenia clevei*, nitrogenase is protected by spatial separation, being confined to the heterocysts, the thick-walled, specialized N₂-fixation cells (Janson et al. 1995). In addition to spatial separation, a pronounced diel periodicity of N₂ fixation was observed for *Richelia-Rhizosolenia* associations at the ALOHA station (Church et al. 2005, Foster and Zehr 2006). Unicellular *Cyanothece* sp. separate temporally the processes of carbon and nitrogen fixation (Reddy et al. 1993), and were found in association with the diatom *Climacodium frauenfeldianum* (Carpenter and Janson 2000).

2.3 Symbioses between cyanobacteria and haptophytes.

Using HISH-SIMS (halogenated in situ hybridization nanometer-scale secondary ion mass spectrometry) imaging, Thompson et al. (2012) observed a loose cell-surface association between the diazotrophic cyanobacterium UCYN-A and an apparently non-calcifying microalgal host. The host partial 18S rRNA gene sequences were > 99% identical to sequences obtained from sorted picoeukaryotic cells from South Pacific Ocean samples (BIOSOPE T60.34) (Shi et al. 2009) related to sequences of *Braarudosphaera bigelowii* (an atypical coccolithophore that produces pentalith-shaped coccoliths) and the non-calcifying haptophyte *Chrysochromulina parkeae* (Thompson et al. 2012). Using transmission electron microscopy Hagino et al. (2013) observed spheroidal bodies within *B. bigelowii* which were determined to be intracellular cyanobacterial symbionts belonging to the UCYN-A clade. Hagino et al. (2013) suggested that *C. parkeae* might be an alternate life cycle stage of *B. bigelowii*, the former being an elongate, motile, unicellular organism with non-calcified organic scales (Green and Leadbeater 1972). *B. bigelowii* seems to comprise a set of pseudo-cryptic species, consisting of at least five 18S rDNA genotypes that correspond to morphotypes that differ slightly in size (Hagino et al. 2009). As *B. bigelowii* has a coastal distribution and the haptophyte related to BIOSOPE T60.34 was recovered from an open ocean site (Shi et al. 2009, Thompson et al. 2012), it has been hypothesized that the intracellular UCYN-A symbiosis in *B. bigelowii* was acquired after separation of those coastal/open ocean haptophyte ancestors (Hagino et al. 2013). Adding further complexity, three clades of UCYN-A, with distinct but overlapping distributions, can be distinguished based on *nifH* sequences (Thompson et al. 2014), forming a monophyletic group with the marine cyanobacteria *Crocospaera* sp. and *Cyanothece* sp. (Bombar et al. 2014). UCYN-A1 is mostly found in the open ocean (Thompson et al. 2012) and its host is smaller than that of UCYN-A2, which has coastal distribution and whose host is *B. bigelowii* (Hagino et al. 2013). Little is known about the host and spatial distribution of UCYN-A3. A global study by Cabello et al. (2015) has provided evidence that these cyanobacterium-haptophyte symbioses are mandatory for the hosts. There is also growing evidence of significant impacts for the cyanobiont. UCYN-A cells were reported to transfer up to 95% of newly fixed nitrogen to their hosts (Thompson et al. 2012). UCYN-A has a very reduced genome that lacks genes involved in carbon fixation, such as those for RuBisCo (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase) (Zehr et al. 2008) and the tricarboxylic acid (TCA) cycle responsible for the biosynthesis of amino acids (Tripp et al. 2010, Bombar et al. 2014). Such modifications in the genome

of symbionts are analogous to the situation for cellular organelles with specific metabolic functions such as the chloroplast or the mitochondrion, although there are still no reports on the existence of a “diazoplast” (Thompson and Zehr 2013). Tripp et al. (2010) observed that the reduced genome of UCYN-A (1.44 Mb) structurally resembles those found in most chloroplasts (as well as in some bacteria), which may indicate a similar evolutionary path. In addition, the lack of the oxygen-evolving pathway (Zehr et al. 2008, Tripp et al. 2010) de facto prevents nitrogenase damage.

2.4 Symbioses between cyanobacteria and dinoflagellates

Little is known about symbioses between cyanobacteria and dinoflagellates despite the fact that they were first observed more than 100 years ago (Schütt 1895). In most known cases, such as for the dinoflagellates *Ornithocercus* and *Histoneis* (Farnelid et al. 2010), the cyanobacteria are ectosymbionts (i.e. associated to the cell surface) located in the cingulum of the dinoflagellate cell. These cyanobacteria appear to be nitrogen-fixers (Foster et al. 2006), but more than one type can occur in association with a single dinoflagellate cell (Foster et al. 2006, Farnelid et al. 2010). Surprisingly, sequences recovered from dinoflagellate symbionts corresponded to cyanobacteria that are not known to fix nitrogen such as *Prochlorococcus* or to other types of bacteria, suggesting that the associations between dinoflagellates and prokaryotes are very complex.

2.5 Ecological significance of symbioses involving diazotrophs

New production in oligotrophic areas is largely dependent on N₂ fixation, since upward nutrient fluxes are limited in these regions. Several studies have highlighted the importance of symbiosis between diazotrophic prokaryotes and photosynthetic eukaryotes in the marine environment, both in terms of the abundance of the organisms involved and of the impact on overall N₂ fixation (Montoya et al. 2004, Foster et al. 2009, Goebel et al. 2010, Turk et al. 2011). Goebel et al. (2010) and Foster et al. (2007) found high abundances of *Richelia-Hemiaulus* symbiosis in the western equatorial Atlantic under the influence of the Amazon River plume, while during the circumnavigation Malaspina expedition, *Richelia*-diatom associations were mostly found in the South Atlantic Gyre and Indian South Subtropical Gyre (Fernández-Castro et al. 2015). The nitrogen fixed by DDAs may be an important source of nutrients to other, non-diazotrophic planktonic groups. Villareal (1990) reported evidence of release of newly fixed N to the environment in *Rhizosolenia-Richelia* symbiosis under culture conditions. Due to their size and aggregation capability, diatoms sink rapidly. Therefore, DDAs might account for an important part of the downward flux of carbon linked to new production (Scharek et al. 1999), representing an important link between nitrogen and carbon cycles in the oceans (Foster and O’Mullan 2008). Goebel et al. (2010) observed that UCYN-A was the second most abundant diazotrophic organism in tropical Atlantic waters. UCYN-A N₂ fixation was the highest among diazotrophic groups in both coastal and oligotrophic waters of the eastern North Atlantic (Turk et al. 2011). The widespread distribution of UCYN-A cells throughout the tropical and subtropical oceans observed by Cabello et al. (2015) indicates that the symbioses involving these unicellular cyanobacteria may have an important and thus far underestimated impact on nitrogen cycles in these environments. This unicellular cyanobacteria-Prymnesiophyceae association may also be responsible for significant contributions to vertical carbon fluxes.

3. Symbioses between phytoplankton and heterotrophic bacteria

3.1 Diversity and dynamics of microalgal-bacterial interactions

Interactions between phytoplankton and bacteria in marine environments are numerous, varied and often complex (Bell and Mitchell 1972, Amin et al. 2012, Ramanan et al. 2015). Some bacteria are loosely associated with algae, while others are associated more closely and colonize algal surfaces (Kaczmarek et al. 2005). Interactions range from obligate to facultative, as well as from mutualistic to parasitic, and can be mediated by cell-to-cell attachment or through the release of allelopathic compounds (Doucette 1995, Geng and Belas 2010, Seyedsayamdost et al. 2011).

The development of molecular biology tools has facilitated the study of links between phytoplankton and bacteria in natural communities (Grossart et al. 2005, Rooney-Varga et al. 2005) and from culture collections (Green et al. 2004, Jasti et al. 2005, Sapp et al. 2007, Abby et al. 2014). A molecular survey of bacterial diversity from cultures of six diatom genera (*Ditylum*, *Thalassiosira*, *Asterionella*, *Chaetoceros*, *Leptocylindrus*, and *Coscinodiscus*) revealed distinct bacterial phylotypes associated with each genus. Alphaproteobacteria related to the genera *Sulfitobacter*, *Roseobacter*, *Ruegeria*, and *Erythrobacter*, members of the Bacteroidetes and to a lesser extent Betaproteobacteria were the most prominent bacteria in the diatom cultures examined (Schäfer et al. 2002). Of these, members of the *Roseobacter* clade are commonly found in natural assemblages with marine algae, and have been shown to increase in abundance during phytoplankton blooms (Allgaier et al. 2003, Mayali et al. 2008, Buchan et al. 2014). Several molecular microbial surveys using the 16S rRNA marker have shown that key prokaryotic phylogenetic groups such as Bacteroidetes and Alpha- and Gammaproteobacteria actively respond to the decay of algal blooms (Pinhassi and Hagstrom 2000, Riemann et al. 2000, Pinhassi et al. 2004). Succession of bacterial taxa was observed during a bloom of centric diatoms in the North Sea and their occurrence patterns were linked to their capacity to degrade algal-derived organic matter (Teeling et al. 2012). The final phase of the bloom favored the dominance of Bacteroidetes with *Ulvibacter* and *Formosa* during early and mid-stages of the decline, and *Polaribacter* in the final stages. The latter metagenomic analysis demonstrated that the bacterial response to coastal phytoplankton blooms was more dynamic than previously thought and consisted of a succession of different bacterial populations with distinct functional and transporter profiles.

3.2 Parasitic interactions.

Bacteria can control microalgal populations by inhibiting growth or by active lysis of algal cells. Reports of algicidal bacteria have mainly focused on bacteria acting against bloom forming algae known to produce toxins that can affect human health (Mayali and Azam 2004, Paul and Pohnert 2011). The most common algicidal bacteria belong to the Gammaproteobacteria (mainly the genera *Alteromonas* and *Pseudoalteromonas*) and the Bacteroidetes (mainly the genera *Cytophaga* and *Saprospira*) (Mayali and Azam 2004). The algicidal activity can be caused either by the release of dissolved algicidal compounds or by the lysis of microalgal cells after attachment. Only few compounds or enzymes responsible for the algicidal effect have been identified. Different levels of specificity have been reported from algicidal bacteria. Selective activity against one algal species and universal activity against all tested species in a given taxon have been reported as well as all intermediate forms of specificity (Mayali and Azam 2004). Several studies indicate that some algicidal bacteria can kill their algal prey by releasing proteases (Lee et al. 2000, Paul and Pohnert 2011). Other algicidal bacteria directly attach to the microalgal cells in order to lyse them (Furusawa et al. 2003).

3.3 Mutualistic interactions.

Mutualistic partnerships between bacteria and marine microalgae based on the exchange of metabolites and nutrients are common (see Cooper and Smith 2015 for a recent review). Identifying chemical compounds involved in these trophic interactions between bacteria and phytoplankton is essential for our understanding of marine elemental cycles. Amin et al. (2009) found that several clades of the gammaproteobacterial genus *Marinobacter* provide an enhanced supply of Fe(III) to the dinoflagellate *Scripsiella trochoidea*, and, in return, the bacterium depends on organic matter produced by the alga. Durham et al. (2015) established a model microbial system in which the marine alphaproteobacterium *Ruegeria pomeroyi* had an obligate trophic dependency on the diatom *Thalassiosira pseudonana* for carbon while the diatom obtained vitamin B12 from the bacterium. A transcriptional analysis of co-cultures of *T. pseudonana* and *R. pomeroyi* using RNA-seq revealed that many transcripts up-regulated in *R. pomeroyi* were involved in the transport and metabolism of 2,3-dihydroxypropane-1-sulfonate (DHPS), a sulphur compound produced by the diatom with no currently recognized role in marine microbial food webs, but which, like dimethylsulfoniopropionate (DMSP), is produced in large amounts by many marine algae. Amin et al. (2015) combined transcriptomic analysis with microbiological and biochemical experiments to study the mutualistic interactions between the

coastal diatom *Pseudonitzschia multiseries* and its associated bacteria. Among 49 bacterial strains isolated from *P. multiseries* cultures, members of the genus *Sulfitobacter* (Rhodobacterales) had the largest positive effect on the growth of the alga. A *Sulfitobacter* species promoted diatom cell division via secretion of the auxin indole-3-acetic acid (IAA), while this bacterium used both diatom-secreted and endogenous tryptophan. This study also detected levels of IAA in five coastal North Pacific sites equivalent to that found in laboratory co-cultures and presented transcriptomic evidence from natural samples for multiple IAA biosynthesis pathways. Amin et al. (2015) proposed that tryptophan and IAA are signaling molecules to recognize and sustain beneficial partners. Another recent study of *Phaeobacter inhibens* BS107, a member of the Roseobacter clade, and *Emiliana huxleyi*, a dominant marine phytoplankton found in large algal blooms, revealed that interaction between algae and Roseobacter could be mutualistic, antagonistic, or shift between both (Seyedsayamdost et al. 2011). The bacterium initially provided a growth enhancing effect by producing an auxin and an antibiotic that protected the alga from other bacteria. This mutualistic relationship shifted to a pathogenic relationship when the algal senescence signal *p*-coumaric acid released by aging *E. huxleyi* cells elicited the production by the bacterium of algicidal compounds termed roseobactinoids that increase cell death of *E. huxleyi*. A similar effect was also observed in co-cultures of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* and *Dinoroseobacter shibae*, suggesting that a shift from mutualism to parasitism is a common feature in Rhodobacterales-based symbiosis (Wang et al. 2014).

4. Mutualistic photosymbioses between eukaryotes

In pelagic environments, photosymbiotic interactions between eukaryotes include relationships that involve microalgae with other protists or with metazoans. Often assumed to be mutually beneficial or commensal because of the presumed trophic exchanges and recycling of nutrients between the host and symbionts, the exact nature of the partnership is often difficult to formally demonstrate. Eukaryotic epibionts (i.e. cells living on the surface of other organisms) are common in benthic environments and are also encountered in pelagic ecosystems, such as the association between the centric diatom *Thalassiosira* sp. and the coccolithophore *Reticulofenestra sessilis* (Taylor 1982, Decelle et al. 2015). However, planktonic photosymbioses between eukaryotes most often involve a photosynthetic symbiont that lives intracellularly within a heterotrophic host (Anderson 2012, Decelle et al. 2015). The most common host taxa in marine plankton are Radiolaria, Foraminifera, ciliates and dinoflagellates (Stoecker et al. 2009). Microalgal symbionts, often collectively referred to as “zooxanthellae”, have long been thought to all be rather similar, but recent studies have revealed increasing diversity.

4.1 Radiolarian hosts.

Based on current knowledge, Radiolaria is the most diverse group of planktonic hosts harbouring eukaryotic microalgal symbionts. All main radiolarian lineages (Spumellaria, Collodaria, Nassellaria, Acantharia) include numerous species harbouring obligate eukaryotic microalgal symbionts (Suzuki and Not 2015). It is assumed that these symbiotic species have to specifically acquire their symbionts from the environment at each host generation (i.e. horizontal transmission). In the Spumellaria, Collodaria and Nassellaria, the most commonly occurring symbiont appears to be the dinoflagellate *Brandtodium nutricula* that was first described (as *Zooxanthella nutricula*) over a century ago (Brandt 1881), but which was only recently cultured and morphologically characterized, leading to placement in the new genus *Brandtodium* (Probert et al. 2014). The exact identity of the microalgal symbionts of the main monophyletic clade of symbiotic Acantharia was recently revealed to be members of the well-known haptophyte genus *Phaeocystis* (Decelle et al. 2012). In apparent contrast to the symbionts of other radiolarians, based on phylogenies performed on the 18S rDNA and D1-D2 region of the 28S rDNA genes, acantharian symbionts have the exact same genetic identity as species that are abundant in the plankton in their free-living stage, and display a lack of species-level host specificity (e.g. symbiont geography rather than host taxonomy is the main determinant of the association). *Acanthochiasma*, an early-branching clade of Acantharia, has been found to simultaneously harbour multiple symbiotic microalgae, including distantly related dinoflagellates (*Heterocapsa* sp.,

Pelagodinium sp., Azadinium sp. and Scrippsiella sp.) as well as a haptophyte (Chrysochromulina sp.) (Decelle et al. 2013).

Acantharia are widely distributed throughout the world's oceans and typically outnumber planktonic Foraminifera and other Radiolaria in oligotrophic open ocean waters. Environmental molecular diversity surveys of protistan communities in pelagic ecosystems have demonstrated the ubiquitous occurrence of radiolarian sequences and notably those of Collodaria (Not et al. 2009, de Vargas et al. 2015). The Collodaria are large, fragile, colony-forming Radiolaria that have been estimated, using in situ imaging tools, to contribute significantly to total oceanic carbon standing stock in the upper 200 m of the water column (Biard et al. submitted). Along with other heterotrophic protists harbouring microalgal endosymbionts, their predominance in surface waters of inter-tropical oceans is very likely linked to their photosymbiotic character, illustrating the significance of acquired phototrophy for global marine ecology (Stoecker et al. 2009).

4.2 Foraminiferal hosts.

Only 5 of the nearly 50 species of planktonic Foraminifera described to date harbour microalgal symbionts, yet these comprise 50 to 90% of Foraminifera found in surface waters of tropical and subtropical oceans (Caron et al. 1995, Stoecker et al. 1996). Each host cell can contain up to 20,000 symbionts. These 5 species, belonging to the genera Globigerinoides, Globigerinella, and Orbulina, form a monophyletic clade within the Foraminifera based on 18S rDNA gene phylogenies and they all possess spines along which symbionts are positioned during the day (Spero 1987). In contrast to benthic Foraminifera that have a wide diversity of microalgal symbionts, all planktonic symbiotic species form associations with the recently described dinoflagellate genus Pelagodinium (Siano et al. 2010), which is related to Symbiodinium in the order Suessiales. Other microalgal symbionts belonging to the haptophyte genus Chrysochromulina have been reported (Gast et al. 2000), but this relationship is less well characterized.

4.3 Ciliate hosts.

Symbiotic association between ciliates and eukaryotic microalgae (e.g. Paramecium bursaria and Chlorella sp.) are well known and abundant in freshwater ecosystems (Kodama et al. 2014). In marine environments ciliates preferentially associate with cyanobionts (e.g. Codonella sp.) or perform kleptoplastidy (retention of plastids only rather than the whole cell) such as the well-known Mesodinium rubrum which sequesters plastids from a cryptophyte algae and can form massive blooms (Johnson and Stoecker 2005), or Oligotrichida ciliates which harbour klepto-chloroplasts from green algae in estuarine environments (Stoecker et al. 1989a). An original pelagic photosymbiosis between a calcifying ciliate host and the dinoflagellate Symbiodinium was recently described from surface ocean waters (Mordret et al. 2015). The host is a new ciliate species closely related to Tiarina fusus (Colepidae) and phylogenetic analysis of the symbionts revealed that they are novel genotypes of Symbiodinium, closely related to clade A, that do not seem to associate with any benthic hosts. Based on molecular diversity surveys, this symbiotic partnership was shown to occur globally, in particular in nutrient-poor surface waters.

4.4 Dinoflagellate hosts.

Photosynthetic dinoflagellates can be symbionts of other large protists (e.g. Foraminifera or Radiolaria), but heterotrophic dinoflagellates can also harbour photosynthetic symbionts. These symbionts are mainly cyanobionts (see above), but in some cases can be eukaryotic microalgae. For instance, the genus Amphisolonia has been described to simultaneously harbour both cyanobionts and pelagophyte microalgae (Daugbjerg et al. 2013). The bioluminescent dinoflagellate species Noctiluca scintillans lives in symbiosis with a green prasinophyte alga, described from its morphology as Pedinomonas noctilucae (Sweeney 1976), and can harbour up to 10,000 symbionts that swim freely within large vacuoles in the host cell. The Noctiluca–Pedinomonas association is common in tropical and subtropical areas of south-east Asia, in the Indian Ocean, the Pacific Ocean, and the Red Sea where it regularly forms extensive blooms (called “green tides”) reaching densities of up to 5×10^6

cells L-1 (Harrison et al. 2011). Diatoms (“dinotoms”) and other symbionts of uncertain affiliation can be found in symbiosis with dinoflagellate hosts, but these are less well described (Imanian et al. 2010).

4.5 Metazoan hosts

Endosymbiotic microalgae are also found in association with large multicellular metazoan plankton such as jellyfish and acoel flatworms. Among the most studied jellyfish, the scyphozoan *Cassiopea* has been described in symbiosis with the dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*, but the specificity of the relationships between host and symbiont are currently unclear as morphological, biochemical and physiological differences between strains cultured from different hosts have been observed (Arai 1997). Other dinoflagellates, namely *Gymnodinium linuchae* and *Scrippsiella vellelae*, have been isolated and described from the scyphozoan *Linuche unguiculata* and the hydrozoan *Vellela vellela*, respectively (Trench and Thinh 2007). *Scrippsiella vellelae* was recently redefined as *Brandtodinium nutricula* and is the same symbiont found in the majority of radiolarians (Probert et al. 2014). All species of pelagic acoel flatworms collected over a 13 year sampling effort in surface waters of the open oceans harbour microalgal endosymbionts (Stoecker et al. 1989b). From this latter study, 3 types of oceanic flatworms were discriminated: a “bright green” and a “dark brown” acoel presumably belonging to the host genus *Convoluta* and both harbouring a green prasinophyte-like symbiont identified based on ultrastructure. The “dark brown” flatworm was mostly observed on the surface of colonial radiolarians and other gelatinous plankton. The third type of acoel was referred to as “golden” and harbours a dinoflagellate symbiont of uncertain taxonomic affiliation. Dinoflagellate endosymbionts of the pelagic acoel *Amphiscolops* sp. were identified as belonging to the genus *Amphidinium* (Lopes and Silveira 1994). Acoel flatworms with algal endosymbionts depend on both autotrophic and heterotrophic nutrition and are a widespread, though sporadic component of the plankton in the upper water column in warm, oceanic waters. Jellyfish harbouring photosymbionts are frequently observed in the environment and besides a trophic relationship that is presumably advantageous in oligotrophic environments (i.e. recycling of nutrients between the host and symbionts), the exact role of the photosymbiosis is not well understood. It has been suggested that symbiosis enhances the rate of strobilation, being potentially involved in the host cell cycle (Arai 1997).

5. Parasitic photosymbioses between eukaryotes

Parasitism is a non-mutual symbiotic relationship that can be neutral to lethal (i.e. never beneficial) for the host. The parasite has an obligate physical association with its host, at least during a part of its life cycle. Parasitic photosymbioses include heterotrophic protists infecting microalgae and microalgae infecting larger animals. All marine protists involved in parasitic photosymbioses have a similar life cycle that typically includes three stages which allow the parasite to fulfil three essential functions: infection of the host via an actively swimming zoospore, acquisition of energy via a feeding stage (the trophont), and sporulation by a sporocyst which produce zoospores used for propagation (i.e. they are all zoosporic parasites). These parasites are thus horizontally transmitted, meaning that the host is newly infected from the surrounding environment at each generation.

All of these parasites can be classified based on their impact on their host, their localization on their host and their mode of transmission (Lafferty and Kuris 2002, Poulin 2011). Parasites infecting microalgae generally kill their host and these highly virulent parasites are called parasitoids. The impact of microalgal parasites infecting larger animals is generally lower. Beside their negative impact on host populations, zoospores of parasites are actively grazed by predators and should also be considered as an important trophic resource in marine pelagic systems.

5.1 Heterotrophic parasites infecting microalgae.

All known protistan parasites of marine microalgae infect either diatoms or dinoflagellates. Protistan parasites infecting other important marine microalgal lineages exist in freshwater, e.g. the perkinsoan *Rastrimonas subtilis* infecting the cryptophyte *Chilomonas paramecium* (Brugerolle 2002), but have never been reported in marine habitats. Parasites of marine diatoms include chytrids, aphelids, stramenopiles (including the genus *Pirsonia*, oomycetes, labyrinthuloids, and hyphochytrids), dinoflagellates, cercozoans and phytomyxids (for a review see Scholz et al. 2016). Parasites of

dinoflagellates include chytrids (different from those infecting diatoms), Syndiniales (Amoebophryidae) and Perkinsozoa (for a review see Jephcott et al. 2015).

The trophont of these parasites develops either outside (ectoparasites) or inside (endoparasites) their host. Ectoparasites may partially penetrate inside the host (part of the cytoplasm, and even the mitochondrion, Lepelletier et al. 2014a), but the nucleus always remains outside the host. Ectoparasites of microalgae use different strategies to penetrate their host. Fungi produce a germ tube that penetrates into the dinoflagellate host through gaps between thecal plates (Lepelletier et al. 2014). Most ectoparasites of microalgae, however, are active phagotrophs and feed either by endocytosis, pinocytosis or phagocytosis. The heterokont *Pirsonia* spp. and the cercozoans *Pseudopirsonia mucosa* and *Cryothecomonas longipes* infect diatoms using a pseudopodium-like cytoplasmic strand that either pierces the diatom frustule, generally in the girdle region, or passes through natural orifices of centric diatoms (Schweikert and Schnepf 1997, Schnepf and Kuhn 2000). *Paulsenella* is a dinoflagellate ectoparasite of diatoms that pierces the host plasmalemma by a feeding tube (called the peduncle) and gradually sucked out the host cytoplasm, resembling drinking through a straw. The prey's cytoplasm is deposited in a food vacuole where it is digested. This mode of endocytosis (called myzocytosis, Schnepf and Deichgräber 1984) is a feeding mode exclusively observed in alveolate parasitoids.

When the nucleus of the parasite enters inside the host, the parasite is considered as an endoparasite. There are several advantages to being an endoparasite. Firstly, the endoparasite remains protected by the external envelope of its host during its whole maturation. Secondly, an endoparasite more efficiently exploits its host than an ectoparasite. While in the case of ectoparasites, the host nucleus and enough of the cytoplasm can be left to allow the host to survive the infection (Schnepf and Melkonian 1990, Kühn et al. 1996, Schweikert and Schnepf 1997), endoparasites always kill their host and can digest them entirely, including the nucleus. Endoparasites need, however, to overcome two major difficulties: bypassing the natural defences of the host to enter the cell, and finding a way to leave the cell after maturation. Different strategies are used by endoparasite to enter and develop safely inside their host. Like ectoparasites, the aphelid *Pseudaphelidium drebesi* (Karpov et al. 2014) and the cercozoan *Cryothecomonas aestivalis* (Drebes et al. 1996) produce a pseudopodium-like structure and squeeze into the interior of the diatom frustule. Inside the diatom frustule, these parasites are in intimate contact with the host plasma membrane, but never pierce it (Schweikert and Schnepf 1997). Apicomplexans and relatives (Syndiniales and Perkinsozoa) use an apical complex derived structure to penetrate their host (Leander and Keeling 2003). The host of *Parvilucifera* spp. is rapidly immobilized at the penetration of the parasite that then feeds by osmotrophy by producing external enzymes that totally digest its host. In contrast, *Amoebophrya ceratii* is an endoparasitic phagotroph that preserves its host alive (swimming in the water column) until the very end of the maturation process.

The intracellular trophont often distorts the host cell. Dinoflagellates infected by *Amoebophrya ceratii* become much larger than healthy cells (Kim et al. 2004, Hanic et al. 2009). For sporulation, *Cryothecomonas aestivalis* forms slightly amoeboid flagellate spores that are discharged by slipping with their posterior pole foremost through the diatom frustule (Drebes et al. 1996). Oomycetes and chytrids infecting the diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Hanic et al. 2009) produce similarly shaped discharge tubes through the host cell wall. In *Amoebophrya ceratii* the sporocyst makes a complex evagination to leave its host (Cachon 1964) and once outside the cell becomes an elongated multicellular flagellated structure (the vermiform stage). Within hours, each cell forming this vermiform is released from this multicellular structure and is available to infect a novel host.

Several parasites are known to produce resting stages, e. g. *Pirsonia* spp. (Drebes and Schnepf 1988, Kühn et al. 1996), aphelids (Karpov et al. 2014) or *Cryothecomonas aestivalis* (Drebes et al. 1996). Whether these resting stages are the result of a sexual reproduction is unknown. Mature zoospores will be released via several opercules that will be opened possibly after activation by water-borne signals (Garcés et al. 2013). *Amoebophrya ceratii* may enter into dormancy in its host resting cyst and new infections are initiated after germination of the host cyst (Chambouvet et al. 2011a). This strategy allows a perfect physical coupling in time and space of the parasite with its host.

5.2 Microalgal parasites infecting larger organisms.

Microalgae may be obligatory and/or facultative parasites of marine metazoans in benthic and pelagic ecosystems (Rodríguez et al. 2008). Members of the dinoflagellate genus *Blastodinium* are endocommensal of copepods (Skovgaard et al. 2012). They are directly ingested by their hosts as food particles and once inside the copepod gut, they develop and produce one to several large (several hundreds of microns) trophont or sporocyst individuals surrounded by the same outer mother membrane. Infected copepods are generally smaller, less fit and less fecund than healthy ones as a consequence of a physical blocking of the alimentary tract in the gut of the animal and competition for food uptake.

5.3 Detection of parasites in environmental genetic surveys.

In molecular survey of plankton diversity, Amoebophryidae, also known as Marine ALveolate group II or MALV II (López-García et al. 2001), always represent a large fraction of the sequences retrieved from marine habitats, from surface waters to deep hydrothermal vents, but have never been found in freshwater. This family includes a single genus, *Amoebophrya*, with seven species, all described by Cachon (1964). Environmental surveys based on sequencing the SSU rRNA gene have revealed an impressive diversity within this lineage, including more than 40 genetic clusters identified, most composed of several distinct sub-clusters that potentially correspond to separate species (Guillou et al. 2008). All *Amoebophrya* are parasites, infecting either radiolarians (*A. acanthometrae* and *A. sticholonchae*), ciliates (*A. tintinni*), dinoflagellates (*A. ceratii* and *A. leptodisci*) or other parasites (i.e. the hyperparasites *A. grassei* and *A. rosei*). *A. ceratii* infects most, if not all, phototrophic dinoflagellates (Cachon 1964, Siano et al. 2011). This wide host range may explain the ecological success of this parasitic group. MALV II are predominantly detected in the smallest picoplanktonic size fractions by metabarcoding (Massana et al. 2015) and from environmental DNA rather than RNA (Not et al. 2009, Massana et al. 2015). Environmental genetic surveys are likely to detect preferentially zoospores, which are actively swimming propagules that do not reproduce mitotically. Their viability in marine water is at most a few days, even in culture (Cachon 1964, Coats and Park 2002). One infection potentially releases hundreds of zoospores that, like spermatozooids, have a high nucleus/cytoplasm ratio. The genetic trace of these zoospores is likely detectable long after they die as a part of free environmental genetic material. Not all marine parasites are preferentially detected in the smallest size fractions. *Blastodinium* spp. environmental sequences are more prevalent within the mesoplanktonic fraction (180-2000 μm , de Vargas et al. 2015), leading to the conclusion that these parasites are mainly detected within their hosts. Less destructive methods, such as Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) techniques, have been used to confirm that infections of dinoflagellates by *Amoebophrya ceratii* and of copepods by *Blastodinium* spp. occur from coastal to the most oligotrophic areas of the planet (Alves-de-Souza et al. 2011, Siano et al. 2011).

6. Methods for studying pelagic symbioses

6.1 Microscopy and related approaches

Marine pelagic photosymbiotic associations were first discovered soon after light microscopes started to become widely available in the latter half of the 19th century. Only two years after de Bary coined the term symbiosis, K. Brandt used light microscopy to recognize that the “yellow cells” inside radiolarians, actinian corals and hydrozoans were in fact symbiotic microalgae (Brandt 1881). Symbiotic associations between diatoms and cyanobacteria were first described from light microscope observations by Karsten (1907). In the second half of the 20th century increasingly sophisticated microscopy-related methods were employed to discover and describe pelagic symbiotic relationships. The development of transmission electron microscopy in the 1960s allowed more precise localization and sometimes taxonomic identification of symbionts inside host cells (e.g. Taylor 1971, Hollande & Carré 1974). Characterization by electron microscopy of the morphology and/or ultrastructure of

symbionts either within the host cell 'in hospite' (Miller et al. 2012, Yuasa et al. 2012, Hagino et al. 2013) or outside, 'ex hospite' or 'free living' (Probert et al. 2014), remains central to the study of these associations. When coupled with immuno-labelling, electron microscopy allows precise intracellular localisation within host and/or symbiont cells of specific proteins such as nitrogenase (Foster et al. 2006). From the 1980s onwards, epifluorescence microscopy has been widely used to assess the type of pigment present in the symbionts (and thus general taxonomic assignment). For example, fluorescence microscopy permits easy distinction of chlorophyll-containing eukaryotes from phycoerythrin-containing cyanobacteria (Stoecker et al. 1987) or Syndiniales parasites within dinoflagellates based on their specific green fluorescence (Chambouvet et al. 2011a). The subsequent development of molecular probes coupled with fluorescent labels (FISH) using amplification approaches such as Tyramide Signal Amplification (TSA), necessary in many cases because of the low ribosomal signal of the symbionts or parasites compared to their hosts, allows determination of the taxonomical affiliation of hosts and/or symbionts (e.g. Biegala et al. 2002, Chambouvet et al. 2008, Cabello et al. 2015). Nanoscale secondary ion mass spectrometry (Nano-SIMS, Musat et al. 2012) is a powerful emerging technique which allows assessment of the cellular localization and metabolic fluxes of compounds such as nitrogen or carbon (Foster et al. 2011, Thompson et al. 2012). Flow cytometry allows characterization and physical separation of cells based on their size and fluorescence and has been used, for example, to sort small eukaryotes associated to nitrogen-fixing cyanobacteria in order to determine their taxonomic affiliation (Thompson et al. 2012) or more recently to study pico- and nano-phytoplankton associations with fungi (Lepère et al. 2015).

6.2 Ex situ laboratory culture

The successful maintenance of planktonic organisms in ex situ laboratory culture greatly facilitates in depth morphological, genetic and physiological studies. Culturing of organisms that are capable of living in isolation from other species is a challenge in itself (Stewart 2012). The co-culture of organisms involved in symbiotic associations tends to be even more complex. For pelagic photosymbioses, most success to date has come from separating the partners and culturing one (or more rarely both) as a free-living form. For mutualistic symbioses involving unicellular photosynthetic organisms as symbionts, separation of the partners by manual micropipetting has been increasingly successful in recent years (e.g. Siano et al. 2010, Decelle et al. 2012, Probert et al. 2014). This method involves disintegration (crushing) of the host cell with a micropipette under an inverted microscope to release the symbionts, which are subsequently individually isolated into an appropriate culture medium in which they develop as a culture of the free-living form. Disintegration methods are often used to release microalgal symbionts from corals and anemones, but induction of the release of symbionts by physical (e.g. heat, light or salinity shock) and/or chemical (e.g. 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) or menthol) treatment has also been reported for these benthic metazoan hosts (Wang et al. 2012). The viability of the symbionts released using these physical or chemical treatments, that have not, to our knowledge, been tested for planktonic symbioses, is not assured and may vary for a given method between host species (Wang et al. 2012). The fact that microalgal symbionts are typically maintained within host cells in a simplified ('protoplasmic') state with considerably altered phenotype (for example lack of flagella and/or theca, abnormally large cell size) facilitates single cell isolation once the cells are released, but can mean that cells are more prone to deleterious physico-chemical shock when released from the host. There is undoubtedly considerable scope for better mimicking the physico-chemical environment within the host in order to increase the success of isolation of symbionts, particularly for symbionts with specific physiological capacities such as N₂-fixing bacteria. It has been possible to maintain the N₂-fixing cyanobacterial symbiont *Calothrix* in culture outside its host diatom *Chaetoceros* (Foster et al. 2010), but *Richelia* can only be maintained within its host. The diatom *Rhizosolenia* (Villareal 1990) and the UCYN-A N₂-fixing cyanobacterial symbiont of prymnesiophyte microalgae has never been cultivated to date.

Co-culturing of host and symbiont (the 'holobiont') is required to conduct experiments to develop a mechanistic understanding of the functioning of symbiotic relationships. Many symbiotic coral species can be maintained in culture for relatively long periods of time with colonies growing by asexual

reproduction. However, mastering the sexual reproduction of corals in ex situ culture has proven much more difficult, particularly for species that have separate mating types and that expel (rather than brood) their gametes. Some pelagic organisms harbouring microalgal symbionts can be maintained for short periods (up to a few weeks) in laboratory conditions, particularly if kept in circulating seawater aquarium systems that maintain them in suspension. However, the almost total lack of knowledge about asexual and sexual reproduction processes of host organisms from the pelagic environment has prevented successful long-term culture of these organisms. Most heterotrophic hosts are known to undergo sexual reproduction and release aposymbiotic (i.e. without symbiont) gametes at some point in their life-cycle, but nothing is known about the processes of gamete recognition, fusion, and subsequent establishment of a daughter generation that would need to reacquire symbionts from the environment (horizontal transmission). The culture of pelagic photosymbiotic holobionts will require significant advances not only in the technology of culture systems, but also in knowledge of the undoubtedly complex life-cycles of these organisms.

The majority of parasites cannot be maintained in culture without their host. Generalist parasites (infecting a large range of hosts) are typically much easier to isolate than specialist parasites (having a narrow host range). For specialists, it is recommended to first establish the host strain in culture from the locality where the parasite will be isolated. The main bottleneck for their cultivation remains the labour intensiveness of their maintenance, as parasites of phytoplankton typically have rapid life cycles and have to be regularly transferred into a fresh host culture (as frequently as twice per week). Some parasites of microalgae, such as *Parvilucifera* spp., can be stored for longer periods at 4°C and/or cryopreserved (Lepelletier et al. 2014).

6.3 Molecular approaches.

The introduction of molecular techniques into plankton research has allowed much better characterization of the nature and diversity of hosts as well as symbionts using marker 'barcode' genes such as 18S or 16S rRNA (e.g. Chambouvet et al. 2011b, Decelle et al. 2012, Thompson et al. 2014) or functional genes linked to the key role of the symbiont such as *nifH* or *hetR* involved in N₂-fixation (Foster and Zehr 2006). In light of the difficulty of culturing pelagic photosymbiotic associations, one big advantage of molecular techniques is that they can usually be employed in culture-independent studies. In recent years, new "omics" approaches (genomics, transcriptomics and their meta-declinations when dealing with uncultured organisms) have increasingly been employed to study the nature of symbiotic relationships. For example, determination from flow cytometry sorted cells of the genome sequence of the symbiotic cyanobacterium UCYN-A highlighted the absence of photosystem II in this organism and therefore its inability to fix carbon (Zehr et al. 2008) for which it has to rely on its host (Thompson et al. 2012). Genome sequencing also revealed that *Richelia*, a cyanobacterial symbiont of diatoms, lacks key N metabolism genes (Hilton et al. 2013). Transcriptomic approaches are currently more accessible than full genome sequencing for eukaryotes and these have been used, for example, to identify genes potentially involved in symbiosis or parasitic attack such as those coding for lectins (Lu et al. 2014, Balzano et al. 2015).

Interactions between marine protists and bacteria have been recently demonstrated using single-cell sorting by flow cytometry and further sequencing SSU rRNA genes of the individual protist and the prokaryote(s) physically associated with it (Martinez-Garcia et al. 2012). In particular, the latter pilot study suggested the discovery of novel symbionts, distantly related to Rickettsiales and the candidate divisions ZB3 and TG2, associated with cercozoan and chrysophyte hosts. Although further studies are required to unequivocally determine whether these newly discovered associations represent parasitic or mutualistic relationships, single-cell sequencing is a promising approach for the analysis of ecological interactions between uncultured protists and prokaryotes.

7. Concluding remarks

Only in recent years have scientists started to realize the full extent of the critical roles and services provided by symbioses across ecosystems and scales, from molecular to ecological (McFall-Ngai 2008). It has long been recognized that symbiotic interactions exist in the marine pelagic environment, but

the pace of discovery has increased in recent years through the application of both classical techniques and novel methodologies such as high-throughput sequencing associated to bioinformatic analysis of interaction networks (Thompson et al. 2012, Lima-Mendez et al. 2015, Worden et al. 2015, Guidi et al. 2016). Several new, ecologically significant pelagic photosymbiotic associations have been discovered and at least partially characterized in recent years and it would not be surprising to see this trend continue and even intensify in the near future. It is clear that future studies aiming to model nutrient and energy budgets in the oceans must take into account the importance of pelagic symbiotic associations for the input of new nitrogen, as well as for the downward flux of carbon in the water column.

In order to progress towards a holistic understanding of the marine microbiome (Dubilier et al. 2015), it is important to further complement descriptive studies of the nature of photosymbiotic interactions with understanding of the physiological and molecular mechanisms involved. Despite promising developments in culture-independent methods (e.g. single cell approaches), ex situ culturing and experimentation remains a critical step to comprehensively understand any biological system. The establishment of new, ecologically relevant, culturable biological model systems to study pelagic photosymbioses is one of the main challenges facing researchers in this field in coming years.

Acknowledgments

This work was supported by the Macumba project funded by the European Union's Seventh Framework Program (grant agreement no 311975), the ANR HAPAR (ANR-14-CE02-0007), the ANR IMPEKAB (ANR-15-CE02-0011), the CNRS GDRI "Diversity, Evolution and Biotechnology of Marine Algae", the CAPES-COFECUB "PicoBras" (Te 871-15), and the MICROMAR project funded by a CNRS grant (INSU-EC2CO program). Klervi Crenn received a doctoral grant half funded by Région Bretagne.

References cited

- Abby, S.S., Touchon, M., De Jode, A., Grimsley, N. & Piganeau, G. 2014. Bacteria in *Ostreococcus tauri* cultures – friends, foes or hitchhikers? *Front. Microbiol.* 5.
- Allgaier, M., Felske, A. & Wagner-do, I. 2003. Aerobic anoxygenic photosynthesis in *Roseobacter* clade bacteria from diverse marine habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5051–9.
- Alves-de-Souza, C., Cornet, C., Nowaczyk, A., Gasparini, S., Skovgaard, A. & Guillou, L. 2011. *Blastodinium* spp. infect copepods in the ultra-oligotrophic marine waters of the Mediterranean Sea. *Biogeosciences.* 8:2125–36.
- Amin, S.A., Green, D.H., Hart, M.C., Küpper, F.C., Sunda, W.G. & Carrano, C.J. 2009. Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:17071.
- Amin, S.A., Hmelo, L.R., Tol, H.M. van, Durham, B.P., Carlson, L.T., Heal, K.R., Morales, R.L. et al. 2015. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature.* 522:98–101.
- Amin, S.A., Parker, M.S. & Armbrust, E.V. 2012. Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76:667–84.
- Anderson, O.R. 2012. Living together in the plankton: a survey of marine protist symbioses. *Acta Protozool.* 52:1–10.
- Arai, M.N. 1997. *A Functional Biology of Scyphozoa*. Springer Netherlands. XVI, 316 pp.
- Bailly, X., Laguerre, L., Correc, G., Dupont, S., Kurth, T., Pfannkuchen, A., Entzeroth, R. et al. 2014. The chimerical and multifaceted marine acoel *Symsagittifera roscoffensis*: from photosymbiosis to brain regeneration. *Front. Microbiol.* 5:498.
- Balzano, S., Corre, E., Decelle, J., Sierra, R., Wincker, P., Silva, C. Da, Poulain, J. et al. 2015. Transcriptome analyses to investigate symbiotic relationships between marine protists. *Front. Microbiol.* 6.
- Bell, W. & Mitchell, R. 1972. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol. Bull.* 143.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., Chen, Y.B., Küpper, H., Kolber, Z., Bergman, B. & Falkowski, P. 2001. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Science.* 294:1534–7.
- Biegala, I.C., Kennaway, G., Alverca, E., Lennon, J.F., Vaultot, D. & Simon, N. 2002. Identification of bacteria associated with dinoflagellates (Dinophyceae) *Alexandrium* spp. using tyramide signal amplification-fluorescent in situ hybridization and confocal microscopy. *J. Phycol.* 38:404–11.
- Bombar, D., Heller, P., Sanchez-Baracaldo, P., Carter, B.J. & Zehr, J.P. 2014. Comparative genomics reveals surprising divergence of two closely related strains of uncultivated UCYN-A cyanobacteria. *ISME J.* 8:2530–42.
- Brandt, K. 1881. Über das Zusammenleben von Thieren und Algen. *Verh. Physiol. Ges.* 524–7.
- Brugerolle, G. 2002. *Colpodella vorax*: ultrastructure, predation, life-cycle mitosis, and phylogenetic relationships. *Eur. J. Protistol.* 38:113–25.
- Buchan, A., Leclair, G.R., Gulvik, C.A. & González, J.M. 2014. Master recyclers : features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat. Publ. Gr.* 12:686–98.

- Cabello, A.M., Cornejo-Castillo, F.M., Raho, N., Blasco, D., Vidal, M., Audic, S., de Vargas, C. et al. 2015. Global distribution and vertical patterns of a prymnesiophyte-cyanobacteria obligate symbiosis. *ISME J.* in press.
- Cachon, J. 1964. Contribution à l'étude des péridiniens parasites. *Cytologie, cycles évolutifs. Ann. des Sci. Nat. Zool. Paris.* VI:1–158.
- Caron, D.A., Michaels, A.F., Swanberg, N.R. & Howse, F.A. 1995. Primary productivity by symbiont-bearing planktonic sarcodines (*Acantharia*, *Radiolaria*, *Foraminifera*) in surface waters near Bermuda. *J. Plankton Res.* 17:103–29.
- Carpenter, E.J. 2002. Marine cyanobacterial symbioses. *Biol. Environ.* 102:15–8.
- Carpenter, E.J. & Janson, S. 2000. Intracellular cyanobacterial symbionts in the marine diatom *Climacodium frauenfeldianum* (*Bacillariophyceae*). *J. Phycol.* 36:540–4.
- Chambouvet, A., Alves-de-Souza, C., Cuffe, V., Marie, D., Karpov, S. & Guillou, L. 2011a. Interplay between the parasite *Amoebophrya* sp. (*Alveolata*) and the cyst formation of the red tide dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea*. *Protist.* 162:637–49.
- Chambouvet, A., Laabir, M., Sengco, M., Vaquer, A. & Guillou, L. 2011b. Genetic diversity of *Amoebophryidae* (*Syndiniales*) during the *Alexandrium catenella/tamarense* (*Dinophyceae*) blooms in Thau lagoon (Mediterranean Sea, France). *Res. Microbiol.* 162:959–68.
- Chambouvet, A., Morin, P., Marie, D. & Guillou, L. 2008. Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers. *Science.* 322:1254–7.
- Church, M.J., Short, C.M., Jenkins, B.D., Karl, D.M. & Zehr, J.P. 2005. Temporal patterns of nitrogenase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5362–70.
- Coats, D.W. & Park, M.G. 2002. Parasitism of photosynthetic dinoflagellates by three strains of *Amoebophrya* (*Dinophyta*): Parasite survival, infectivity, generation time, and host specificity. *J. Phycol.* 38:520–8.
- Cooper, M.B. & Smith, A.G. 2015. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26:147–53.
- Daugbjerg, N., Jensen, M.H. & Hansen, P.J. 2013. Using nuclear-encoded LSU and SSU rDNA sequences to identify the eukaryotic endosymbiont in *Amphisolenia bidentata* (*Dinophyceae*). *Protist.* 164:411–22.
- de Bary, A. 1879. Die Erscheinung der Symbiose. Verlag von Karl J. Trubner, Strassburg.
- de Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahé, F., Logares, R., Lara, E. et al. 2015. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science.* 348:1261605.
- Decelle, J., Colin, S. & Foster, R.A. 2015. Photosymbiosis in Marine Planktonic Protists. In Ohtsuka, S., Suzaki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N. & Not, F. [Eds.] *Marine Protists: Diversity and Dynamics.* Springer Japan, pp. 465–500.
- Decelle, J., Martin, P., Paborstava, K., Pond, D.W., Tarling, G., Mahé, F., de Vargas, C. et al. 2013. Diversity, ecology and biogeochemistry of byst-forming *Acantharia* (*Radiolaria*) in the oceans. *PLoS One.* 8:e53598.
- Decelle, J., Probert, I., Bittner, L., Desdevises, Y., Colin, S., de Vargas, C., Gali, M. et al. 2012. An original mode of symbiosis in open ocean plankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:18000–5.
- Doucette, G.J. 1995. Interactions Between Bacteria and Harmful Algae: A Review. *Nat. Toxins.* 3:65–74.
- Drebes, G., Kühn, S.F., Gmelch, A. & Schnepf, E. 1996. *Cryothecomonas aestivalis* sp. nov., a colourless nanoflagellate feeding on the marine centric diatom *Guinardia delicatula* (Cleve) Hasle. *Helgolander Meeresunters.* 50:497–515.
- Drebes, G. & Schnepf, E. 1988. *Paulsenella Chatton* (*Dinophyta*), ectoparasites of marine diatoms: development and taxonomy. *Helgoländer Meeresuntersuchungen.* 42:563–81.
- Dubilier, N., McFall-Ngai, M. & Zhao, L. 2015. Create a global microbiome effort. *Nature.* 526.
- Durham, B.P., Sharma, S., Luo, H., Smith, C.B., Amin, S.A., Bender, S.J., Dearth, S.P. et al. 2015. Cryptic carbon and sulfur cycling between surface ocean plankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112:453–7.
- Erwin, P.M., Pineda, M.C., Webster, N., Turon, X. & López-Legentil, S. 2014. Down under the tunic: bacterial biodiversity hotspots and widespread ammonia-oxidizing archaea in coral reef ascidians. *ISME J.* 8:575–88.
- Farnelid, H., Tarangkoon, W., Hansen, G., Hansen, P.J. & Riemann, L. 2010. Putative N₂-fixing heterotrophic bacteria associated with dinoflagellate-cyanobacteria consortia in the low-nitrogen Indian Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* 61:105–17.
- Fay, P. 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56:340–73.
- Fernández-Castro, B., Mouriño-Carballido, B., Marañón, E., Chouciño, P., Gago, J., Ramírez, T., Vidal, M. et al. 2015. Importance of salt fingering for new nitrogen supply in the oligotrophic ocean. *Nat. Commun.* In press.
- Foster, R.A., Carpenter, E.J. & Bergman, B. 2006. Unicellular cyanobionts in open ocean dinoflagellates, radiolarians, and tintinnids: Ultrastructural characterization and immuno-localization of phycoerythrin and nitrogenase. *J. Phycol.* 42:453–63.
- Foster, R.A., Goebel, N.L. & Zehr, J.P. 2010. Isolation of *Calothrix rhizosoleniae* (*Cyanobacteria*) strain SC01 from *Chaetoceros* (*Bacillariophyta*) spp. diatoms of the subtropical North Pacific Ocean. *J. Phycol.* 46:1028–37.
- Foster, R.A., Kuypers, M.M.M., Vagner, T., Paerl, R.W., Musat, N. & Zehr, J.P. 2011. Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom-cyanobacterial symbioses. *ISME J.* 5:1484–93.
- Foster, R.A. & O'Mullan, G.D. 2008. Nitrogen-Fixing and Nitrifying Symbioses in the Marine Environment. In Capone, D. G., Bronk, D. A., Mulholland, M. R. & Carpenter, E. J. [Eds.] *Nitrogen in the Marine Environment.* Academic Press, pp. 1197–218.
- Foster, R.A., Subramaniam, A., Mahaffey, C., Carpenter, E.J., Capone, D.G. & Zehr, J.P. 2007. Influence of the Amazon River plume on distributions of free-living and symbiotic cyanobacteria in the western tropical north Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 52:517–32.
- Foster, R.A., Subramaniam, A. & Zehr, J.P. 2009. Distribution and activity of diazotrophs in the Eastern Equatorial Atlantic. *Environ. Microbiol.* 11:741–50.
- Foster, R.A. & Zehr, J.P. 2006. Characterization of diatom-cyanobacteria symbioses on the basis of *nifH*, *hetR* and 16S rRNA sequences. *Environ. Microbiol.* 8:1913–25.

- Franche, C., Lindström, K. & Elmerich, C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*. 321:35–59.
- Furusawa, G., Yoshikawa, T., Yasuda, A. & Sakata, T. 2003. Algicidal activity and gliding motility of *Saprospira* sp. SS98-5. *Can. J. Microbiol.* 49:92–100.
- Garcés, E., Alacid, E., Reñé, A., Petrou, K. & Simó, R. 2013. Host-released dimethylsulphide activates the dinoflagellate parasitoid *Parvilucifera sinerae*. *ISME J.* 7:1065–8.
- Gast, R.J., McDonnell, T.A. & Caron, D.A. 2000. srDna-based taxonomic affinities of algal symbionts from a planktonic foraminifer and a solitary radiolarian. *J. Phycol.* 36:172–7.
- Geng, H. & Belas, R. 2010. Molecular mechanisms underlying Roseobacter–phytoplankton symbioses. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21:332–8.
- Goebel, N.L., Turk, K. a., Achilles, K.M., Paerl, R., Hewson, I., Morrison, A.E., Montoya, J.P. et al. 2010. Abundance and distribution of major groups of diazotrophic cyanobacteria and their potential contribution to N₂ fixation in the tropical Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* 12:3272–89.
- Green, D.H., Llewellyn, L.E., Negri, A.P., Blackburn, S.I. & Bolch, C.J.S. 2004. Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *FEMS Microb. Ecol.* 47.
- Green, J.C. & Leadbeater, B.S.C. 1972. *Chrysochromulina parkeae* sp. nov. (*Haptophyceae*) a new species recorded from S. W. England and Norway. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom*. 52:469–74.
- Grossart, H.-P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M. & Brinkhoff, T. 2005. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ. Microbiol.* 7:860–73.
- Guidi, L., Chaffron, S., Bittner, L. & Eveillard, D. 2016. Plankton networks driving carbon export in the oligotrophic ocean. *Nature*. in press.
- Guillou, L., Viprey, M., Chambouvet, A., Welsh, R.M., Kirkham, A.R., Massana, R., Scanlan, D.J. et al. 2008. Widespread occurrence and genetic diversity of marine parasitoids belonging to Syndiniales (Alveolata). *Environ. Microbiol.* 10:3349–65.
- Hagino, K., Onuma, R., Kawachi, M. & Horiguchi, T. 2013. Discovery of an endosymbiotic nitrogen-fixing cyanobacterium UCYN-A in *Braarudosphaera bigelowii* (Prymnesiophyceae). *PLoS One*. 8:e81749.
- Hagino, K., Takano, Y. & Horiguchi, T. 2009. Pseudo-cryptic speciation in *Braarudosphaera bigelowii* (Gran and Braarud) Deflandre. *Mar. Micropaleontol.* 72:210–21.
- Hanic, L.A., Sekimoto, S. & Bates, S.S. 2009. Oomycete and chytrid infections of the marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (*Bacillariophyceae*) from Prince Edward Island, Canada. *Botany*. 87:1096–105.
- Harrison, P.J., Furuya, K., Glibert, P.M., Xu, J., Liu, H.B., Yin, K., Lee, J.H.W. et al. 2011. Geographical distribution of red and green *Noctiluca scintillans*. *Chin. J. Ocean. Limnol.* 29:807–31.
- Hilton, J.A., Foster, R.A., Tripp, H.J., Carter, B.J., Zehr, J.P. & Villareal, T. a 2013. Genomic deletions disrupt nitrogen metabolism pathways of a cyanobacterial diatom symbiont. *Nat. Commun.* 4:1767.
- Imanian, B., Pombert, J.-F. & Keeling, P.J. 2010. The complete plastid genomes of the two “Dinotoms” *Durinskia baltica* and *Kryptoperidinium foliaceum*. *PLoS One*. 5:e10711.
- Janson, S., Rai, a. N. & Bergman, B. 1995. Intracellular cyanobiont *Richelia intracellularis*: ultrastructure and immunolocalisation of phycoerythrin, nitrogenase, Rubisco and glutamine synthetase. *Mar. Biol.* 124:1–8.
- Janson, S., Wouters, J., Bergman, B. & Carpenter, E.J. 1999. Host specificity in the *Richelia* - diatom symbiosis revealed by hetR gene sequence analysis. *Environ. Microbiol.* 1:431–8.
- Jasti, S., Sieracki, M.E., Poulton, N.J., Giewat, M.W. & Rooney-Varga, J.N. 2005. Phylogenetic Diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* spp. and other phytoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3483.
- Jephcott, T.G., Alves-de-Souza, C., Gleason, F.H., van Ogtrop, F., Sime-Ngando, T., Karpov, S. & Guillou, L. 2015. Ecological impacts of parasitic chytrids, Syndiniales and perkinsids on populations of marine photosynthetic dinoflagellates. *Fungal Ecol.* 19:47–58.
- Johnson, M.D. & Stoecker, D.K. 2005. Role of feeding in growth and photophysiology of *Myrionecta rubra*. *Aquat. Microb. Ecol.* 39:303–12.
- Kaczmarek, I., Ehrman, J.M., Bates, S.S., Green, D.H., Léger, C. & Harris, J. 2005. Diversity and distribution of epibiotic bacteria on *Pseudo-nitzschia multiseriata* (*Bacillariophyceae*) in culture, and comparison with those on diatoms in native seawater. *Harmful Algae*. 4:725–41.
- Karpov, S.A., Mamkaeva, M.A., Benzerara, K., Moreira, D. & López-García, P. 2014. Molecular phylogeny and ultrastructure of *Aphelidium* aff. *melosirae* (*Aphelida*, *Opisthosporidia*). *Protist*. 165:512.
- Karsten, G. 1907. Das indische Phytoplankton. G. Fischer, Jena.
- Kim, S., Park, M.G., Yih, W. & Coats, D.W. 2004. Infection of the bloom-forming thecate dinoflagellates *Alexandrium affine* and *Gonyaulax spinifera* by two strains of *Amoebophrya* (*Dinophyta*). *J. Phycol.* 40:815–22.
- Kodama, Y., Suzuki, H., Dohra, H., Sugii, M., Kitazume, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S. et al. 2014. Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts. *BMC Genomics*. 15:1–8.
- Kühn, S., Drebes, G. & Schnepf, E. 1996. Five new species of the nanoflagellate *Pirsonia* in the German Bight, North Sea, feeding on planktic diatoms. *Helgol. Mar. Res.* 50:205–22.
- Lafferty, K.D. & Kuris, A.M. 2002. Trophic strategies, animal diversity and body size. *Trends Ecol. Evol.* 17:507–13.
- Leander, B.S. & Keeling, P.J. 2003. Morphostasis in alveolate evolution. *Trends Ecol. Evol.* 18:395–402.

- Lee, S., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A. & Ikeda, T. 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4334–9.
- Lemma, E. 1905. Sandwich-Islen. Ergebnisse einer Reise nach dem Pacific. H. Schauinsland 1896 / 97. *Bot. Jahrb. Syst. Pflanzengesch. Pflanzengeogr.* 34.
- Lepelletier, F., Karpov, S.A., Alacid, E., Le Panse, S., Bigeard, E., Garcés, E., Jeanthon, C. et al. 2014a. *Dinomyces arenysensis* gen. et sp. nov. (*Rhizophydiales, Dinomycetaceae* fam. nov.), a chytrid infecting marine dinoflagellates. *Protist.* 165:230–44.
- Lepelletier, F., Karpov, S.A., Le Panse, S., Bigeard, E., Skovgaard, A., Jeanthon, C. & Guillou, L. 2014b. *Parvilucifera rostrata* sp. nov., a novel parasite in the phylum *Perkinsozoa* that infects the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (*Dinophyceae*). *Protist.* 165:31–49.
- Lepère, C., Ostrowski, M., Hartmann, M., Zubkov, M. V. & Scanlan, D.J. 2015. In situ associations between marine photosynthetic picoeukaryotes and potential parasites - a role for fungi? *Environ. Microbiol. Rep.* in press.
- Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., Chaffron, S. et al. 2015. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science.* 348:1262073_1–1262073_9.
- Lopes, R.M. & Silveira, M. 1994. Symbiosis between a pelagic flatworm and a dinoflagellate from a tropical area - structural observations. *Hydrobiologia.* 287:277–84.
- López-García, P., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C. & Moreira, D. 2001. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature.* 409:603–7.
- Lu, Y., Wohlrab, S., Glockner, G., Guillou, L. & John, U. 2014. Genomic insights into processes driving the infection of *Alexandrium tamarense* by the parasitoid *Amoebophrya* sp. *Eukaryot. Cell.* 13:1439–49.
- Martinez-Garcia, M., Brazel, D., Poulton, N.J., Swan, B.K., Gomez, M.L., Masland, D., Sieracki, M.E. et al. 2012. Unveiling in situ interactions between marine protists and bacteria through single cell sequencing. *ISME J.* 6:703.
- Massana, R., Gobet, A., Audic, S., Bass, D., Bittner, L., Boutte, C., Chambouvet, A. et al. 2015. Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing. *Environ. Microbiol.* 17:4035–49.
- Mayali, X. & Azam, F. 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51:139–44.
- Mayali, X., Franks, P.J.S. & Azam, F. 2008. Cultivation and ecosystem role of a marine *Roseobacter* clade-affiliated cluster bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2595–603.
- McFall-Ngai, M. 2008. Are biologists in 'future shock'? Symbiosis integrates biology across domains. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:789–92.
- Miller, J.J., Delwiche, C.F. & Coats, D.W. 2012. Ultrastructure of *Amoebophrya* sp. and its changes during the course of infection. *Protist.* 163:720–45.
- Montoya, J.P., Holl, C.M., Zehr, J.P., Hansen, A., Villareal, T.A. & Capone, D.G. 2004. High rates of N-2 fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature.* 430:1027–31.
- Moore, C.M., Mills, M.M., Arrigo, K.R., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P.W., Galbraith, E.D. et al. 2013. Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nat. Geosci.* 6:701–10.
- Mordret, S., Romac, S., Henry, N., Colin, S., Carmichael, M., Berney, C., Audic, S. et al. 2015. The symbiotic life of *Symbiodinium* in the open ocean within a new species of calcifying ciliate (*Tiarina* sp.). *ISME J.* in press.
- Musat, N., Foster, R., Vagner, T., Adam, B. & Kuypers, M.M.M. 2012. Detecting metabolic activities in single cells, with emphasis on nanoSIMS. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:486–511.
- Norris, R.E. 1961. Observations on phytoplankton organisms collected on the NZOI Pacific cruise, September 1958. *New Zeal. J. Sci.* 4:162–8.
- Not, F., del Campo, J., Balagué, V., de Vargas, C. & Massana, R. 2009. New insights into the diversity of marine picoeukaryotes. *PLoS One.* 4:e7143.
- Nowack, E.C.M. & Melkonian, M. 2010. Endosymbiotic associations within protists. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365:699–712.
- Paul, C. & Pohnert, G. 2011. Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis. *PLoS One.* 6:e21032.
- Pinhassi, J. & Hagstrom, A. 2000. Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 21:245–56.
- Pinhassi, J., Sala, M.M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, Ò., Malits, A. & Marrasé, C. 2004. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6753–66.
- Poulin, R. 2011. *Evolutionary Ecology of Parasites.* Princeton University press. 360 pp.
- Probert, I., Siano, R., Poirier, C., Decelle, J., Biard, T., Tuji, A., Suzuki, N. et al. 2014. *Brandtodinium* gen. nov. and *B. nutricula* comb. Nov. (*Dinophyceae*), a dinoflagellate commonly found in symbiosis with polycystine radiolarians. *J. Phycol.* 50:388–99.
- Rai, A.N., Bergman, B. & Rasmussen, U. 2002. *Cyanobacteria in Symbiosis.* Kluwer Academic Publishers. 319 pp.
- Ramanan, R., Kim, B.-H., Cho, D.-H., Oh, H.-M. & Kim, H.-S. 2015. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnol. Adv.* in press.
- Reddy, K.J., Haskell, J.B., Sherman, D.M. & Sherman, L. a 1993. Unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria of the genus *Cyanothece*. *J. Bacteriol.* 175:1284–92.
- Riemann, L., Steward, G.F. & Azam, F. 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:578–87.
- Rodríguez, F., Feist, S.W., Guillou, L., Harkestad, L.S., Bateman, K., Renault, T. & Mortensen, S. 2008. Phylogenetic and morphological characterization of the green algae infesting blue mussel *Mytilus edulis* in the North and South Atlantic. *Dis. Aquat. Organ.* 81:231–40.

- Rooney-Varga, J.N., Giewat, M.W., Savin, M.C., Sood, S., Legresley, M. & Martin, J.L. 2005. Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microb. Ecol.* 49:163–75.
- Sampayo, E.M., Ridgway, T., Bongaerts, P. & Hoegh-Guldberg, O. 2008. Bleaching susceptibility and mortality of corals are determined by fine-scale differences in symbiont type. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:10444–9.
- Santi, C., Bogusz, D. & Franche, C. 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann. Bot.* 111:743–67.
- Sapp, M., Wichels, A. & Gerdt, G. 2007. Impacts of cultivation of marine diatoms on the associated bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3117–20.
- Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H. & Muyzer, G. 2002. Genetic diversity of “satellite” bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42:25–35.
- Scharek, R., Tupas, L.M. & Karl, D.M. 1999. Diatom fluxes to the deep sea in the oligotrophic North Pacific gyre at Station ALOHA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 182:55–67.
- Schnepf, E. & Deichgräber, G. 1984. “Myzocytosis”, a kind of endocytosis with implications to compartmentation in endosymbiosis. *Naturwissenschaften.* 71:218–9.
- Schnepf, E. & Kuhn, S.F. 2000. Food uptake and fine structure of *Cryptothecomonas longipes* sp. nov., a marine nanoflagellate incertae sedis feeding phagotrophically on large diatoms. *Helgol. Mar. Res.* 54:18–32.
- Schnepf, E. & Melkonian, M. 1990. Bacteriophage-like particles in endocytic bacteria of *Cryptomonas* (*Cryptophyceae*). *Phycol.* vol. 29. 338–43.
- Scholz, B., Guillou, L., Marano, A. V., Neuhauser, S., Sullivan, B.K., Karsten, U., Küpper, F.C. et al. 2016. Zoospore parasites infecting marine diatoms – A black box that needs to be opened. *Fungal Ecol.* 19:59–76.
- Schütt, F. 1895. Die Peridineen der Plankton-Expedition. Lipsius & Tischer, Kiel.
- Schweikert, M. & Schnepf, E. 1997. Electron microscopical observations on *Pseudaphelidium drebesii* Schweikert and Schnepf, a parasite of the centric diatom *Thalassiosira punctigera*. *Protoplasma.* 199:113–23.
- Seyedsayamdost, M.R., Case, R.J., Kolter, R. & Clardy, J. 2011. The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nat. Chem.* 3:331–5.
- Shi, X.L., Marie, D., Jardillier, L., Scanlan, D.J. & Vaulot, D. 2009. Groups without cultured representatives dominate eukaryotic picophytoplankton in the oligotrophic South East Pacific Ocean. *PLoS One.* 4:e7657.
- Siano, R., Alves-de-Souza, C., Foulon, E., Bendif, E.M., Simon, N., Guillou, L. & Not, F. 2011. Distribution and host diversity of *Amoebophryidae* parasites across oligotrophic waters of the Mediterranean Sea. *Biogeosciences.* 8:267–78.
- Siano, R., Montresor, M., Probert, I., Not, F. & de Vargas, C. 2010. *Pelagodinium* gen. nov. and *P. beii* comb. nov., a dinoflagellate symbiont of planktonic foraminifera. *Protist.* 161:385–99.
- Skovgaard, A., Karpov, S.A. & Guillou, L. 2012. The parasitic dinoflagellates *Blastodinium* spp. inhabiting the gut of marine, planktonic copepods: morphology, ecology, and unrecognized species diversity. *Front. Microbiol.* 3.
- Spero, H.J. 1987. Symbiosis in the planktonic foraminifer, *Orbulina universa*, and the isolation of its symbiotic dinoflagellate, *Gymnodinium beii* sp. nov. *J. Phycol.* 23:307–17.
- Stewart, E.J. 2012. Growing unculturable bacteria. *J. Bacteriol.* 194:4151–60.
- Stoecker, D.K., Gustafson, D.E. & Verity, P.G. 1996. Micro- and mesoprotozooplankton at 140°W in the equatorial Pacific: heterotrophs and mixotrophs. *Aquat. Microb. Ecol.* 10:273–82.
- Stoecker, D.K., Johnson, M.D., de Vargas, C. & Not, F. 2009. Acquired phototrophy in aquatic protists. *Aquat. Microb. Ecol.* 57:279–310.
- Stoecker, D.K., Michaels, A.E. & Davis, L.H. 1987. Large proportion of marine planktonic ciliates found to contain functional chloroplasts. *Nature.* 326:790–2.
- Stoecker, D.K., Sliver, M.W., Michaels, A.E. & Davis, L.H. 1989a. Enslavement of algal chloroplasts by four *Strombidium* spp. (*Ciliophora, Oligotrichida*). *Mar. Microb. Food Webs.* 3:79–100.
- Stoecker, D.K., Swanberg, N. & Tyler, S. 1989b. Oceanic mixotrophic flatworms. *Mar. Ecol. Ser.* 58:41–51.
- Suzuki, N. & Not, F. 2015. Biology and Ecology of *Radiolaria*. In Ohtsuka, S., Suzuki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N. & Not, F. [Eds.] *Marine Protists. Spinge Japan*, pp. 179–222.
- Sweeney, B.M. 1976. *Pedinomonas noctilucae* (*Prasinophyceae*), the flagellate symbiotic in *Noctiluca* (*Dinophyceae*) in Southeast Asia. *J. Phycol.* 12:460–4.
- Taylor, F.J.R. 1982. Symbioses in marine microplankton. *Ann. L Inst. Oceanogr.* 58:61–90.
- Teeling, H., Fuchs, B.M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennis, C.M., Kassabgy, M. et al. 2012. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science.* 336:608–11.
- Thompson, A.W., Carter, B.J., Turk-Kubo, K., Malfatti, F., Azam, F. & Zehr, J.P. 2014. Genetic diversity of the unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria UCYN-A and its prymnesiophyte host. *Environ. Microbiol.* 16:3238–49.
- Thompson, A.W., Foster, R.A., Krupke, A., Carter, B.J., Musat, N., Vaulot, D., Kuypers, M.M.M. et al. 2012. Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science.* 337:1546–50.
- Thompson, A.W. & Zehr, J.P. 2013. Cellular interactions: lessons from the nitrogen-fixing cyanobacteria. *J. Phycol.* 49:1024–35.
- Thompson, J.N. 1999. The evolution of species interactions. *Science.* 284:2116–8.
- Trench, R.K. 1993. Microalgal-Invertebrate Symbioses - A Review. *Endocytobiosis Cell Res.* 9:135–75.
- Trench, R.K. & Thinh, L. 2007. *Gymnodinium linucheae* sp. nov.: The dinoflagellate symbiont of the jellyfish *Linuche unguiculata*. *Eur. J. Phycol.* 30:149–54.
- Tripp, H.J., Bench, S.R., Turk, K.A., Foster, R. a, Desany, B. a, Niazi, F., Affourtit, J.P. et al. 2010. Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature.* 464:90–4.

Turk, K.A., Rees, A.P., Zehr, J.P., Pereira, N., Swift, P., Shelley, R., Lohan, M. et al. 2011. Nitrogen fixation and nitrogenase (nifH) expression in tropical waters of the eastern North Atlantic. *ISME J.* 5:1201–12.

Villareal, T.A. 1990. Laboratory culture and preliminary characterization of the nitrogen-fixing *Rhizosolenia-Richelina* symbiosis. *Mar. Ecol.* 11:117–32.

Villareal, T.A. 1991. Nitrogen-fixation by the cyanobacterial symbiont of the diatom genus *Hemiaulus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 76:201–4.

Wang, H., Tomasch, J., Jarek, M. & Wagner-Döbler, I. 2014. A dual-species co-cultivation system to study the interactions between *Roseobacters* and dinoflagellates. *Front. Microbiol.* 5:1–11.

Wang, J.-T., Chen, Y.-Y., Tew, K.S., Meng, P.-J. & Chen, C.A. 2012. Physiological and biochemical performances of menthol-induced aposymbiotic corals. *PLoS One.* 7:e46406.

Worden, A.Z., Follows, M.J., Giovannoni, S.J., Wilken, S., Zimmerman, A.E. & Keeling, P.J. 2015. Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science.* 347:1257594.

Yuasa, T., Horiguchi, T., Mayama, S., Matsuoka, A. & Takahashi, O. 2012. Ultrastructural and molecular characterization of cyanobacterial symbionts in *Dictyocoryne profunda* (Polycystine *Radiolaria*). *Symbiosis.* 57:51–5.

Zehr, J.P., Bench, S.R., Carter, B.J., Hewson, I., Niazi, F., Shi, T., Tripp, H.J. et al. 2008. Globally distributed uncultivated oceanic N₂-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II. *Science.* 322:1110–2.

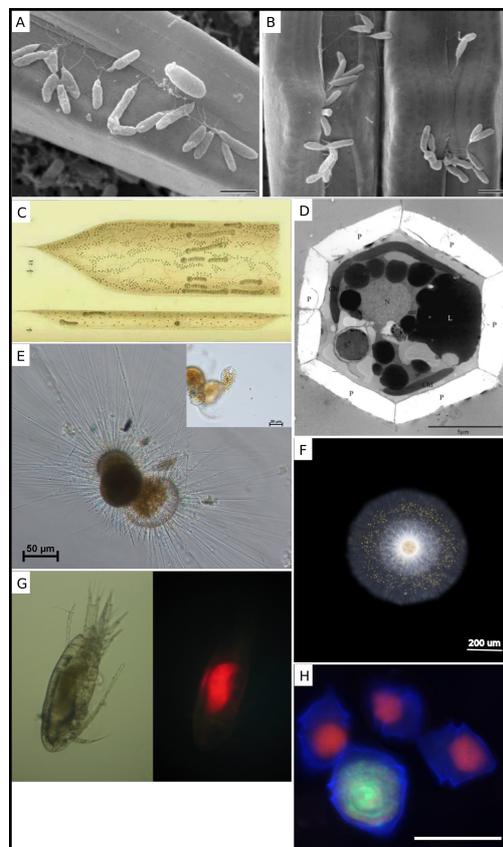


Fig 1 Illustrations of pelagic photosymbioses. A and B, Scanning electron microscopy images of heterotrophic bacteria associated to the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata* (from Kaczmarek et al 2005). C, Symbiosis between the cyanobacterium *Richelia* and the diatom *Rhizosolenia* drawn from microscopic observations (Karsten 1907). D, TEM images of the prymnesiophyte algae *Braarudosphaera bigelowii* showing nucleus (N), chloroplasts (Chl), lipid globules (L), pentoliths (P), mitochondria (mt) and cyanobacterial symbiont (S) (from Hagino et al. (2013)). E, Planktonic Foraminifera in association with its dinoflagellate symbiont *Pelagodinium beii*, insert shows the Foraminifera test broken and symbiotic algae released (small golden dots). F, One large *Radiolaria* cell (*Collodaria*), displaying its dinoflagellate symbionts (*Brandtodinium nutricula*) on the outer part (numerous small golden dots). G, left, optical microscopy image of a copepod (*Clausocalanus* type) infected by the microalgae *Blastodinium contortum*, and right, same specimen observed under epifluorescence showing the chlorophyll autofluorescence (red) of its algal parasitic endosymbiont. H, The dinoflagellate species *Heterocapsa triquetra* infected and non-infected cells from a natural sample collected in the Penzé estuary, France. The parasites are detected by a FISH using the ALV01 probe (green), the host parasite is stained in red by propidium iodine and the host theca stained in blue by calcofluor (photo credit. C. Alves de souza, scale bar: 20 μ m).

Interactions entre microalgues et bactéries dans l'environnement marin

Les bactéries et microalgues marines sont acteurs clés du fonctionnement des écosystèmes océaniques et leur contribution dans les cycles biogéochimiques majeurs est largement reconnue. Dans ce contexte, il apparaît essentiel de mieux comprendre les interactions existant entre bactéries et microalgues. Dans l'environnement marin, les interactions spécifiques entre microorganismes nécessitent une forte proximité qui n'est souvent rendue possible que par un attachement cellulaire. La première partie de ce travail de thèse a consisté à sélectionner les microalgues qui présentaient des bactéries physiquement attachées. Deux diatomées appartenant aux genres *Thalassiosira* et *Chaetoceros* ont été retenues afin d'étudier leur microflore épibionte issue d'associations à long terme (culture de microalgues établies depuis plusieurs années) et à court terme (microalgues prélevées directement dans l'environnement). Ces travaux ont permis de mettre en évidence une forte ressemblance des communautés épibiontes dans les associations à long terme, qui s'opposait à la forte différence des épibiontes issus des associations à court terme. Les communautés d'épibiontes bactériens étaient majoritairement composées d'alpha- et gammaprotéobactéries, mais aussi de *Bacteroidetes* et d'actinobactéries. Cette étude a également permis de mettre en évidence que la surface des microalgues représentait un écosystème particulier puisque près de la moitié des épibiontes isolés correspondaient à de nouveaux taxons (genres et espèces). Une de ces souches qui constitue un nouveau genre a été complètement caractérisée, contribuant à l'enrichissement de la diversité bactérienne décrite. Enfin, la nature des interactions entre les deux diatomées et leurs bactéries épibiontes a été analysée par l'intermédiaire de co-cultures, afin d'identifier une interaction forte, qui pourra être examinée par transcriptomique. De très nombreuses interactions commensalismes ont été mises en évidence, reflet de la reminéralisation de la matière organique par les bactéries. Cependant, un faible impact des bactéries sur la croissance des microalgues a été observé. Les conditions expérimentales qui excluent au maximum les stress abiotiques et biotiques, masquent peut-être les interactions qui pourraient se produire dans un environnement naturel plus fluctuant. Ces résultats témoignent de la complexité des interactions biotiques, fournissent des méthodes et des organismes modèles permettant de les étudier et soulèvent de nombreuses hypothèses exaltantes pour les travaux futurs.

Interactions between microalgae and bacteria in the marine environment

Marine microalgal and bacterial contribution to the global biogeochemical cycles is largely recognized and lead to define them as key actors of oceanic ecosystems. In this context, it is essential to better understand the interactions occurring between bacteria and microalgae. In the marine environment, specific interactions between microorganisms require tight physical association that is made possible by cellular attachment. In this work, we first selected microalgae with physically attached bacteria. Two diatoms belonging to the genus *Thalassiosira* and *Chaetoceros* were selected to study the epibiotic microflora from long-term (microalgae in culture) and short-term (microalgae directly collected from natural communities) associations. This work highlighted strong similarities between epibiotic assemblages from long-term associations and a higher difference for epibiotic communities from short-term associations. The bacterial epibiotic assemblages were mainly composed of *Alpha*- and *Gammaproteobacteria* but also *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*. This study also highlighted that the surface of microalgae represented a peculiar ecosystem where nearly half isolates constituted new taxa (genera and species). One of them representing a new genus has been completely characterized, contributing to the enrichment of the described bacterial diversity. Finally, the nature of interactions between diatoms and their epibiotic bacteria was analyzed by co-culturing to identify strong interactions, to be further examined by transcriptomics. Numerous commensal interactions have been identified, corresponding to the bacterial remineralization of organic matter. However, only small effects of bacteria on microalgal growth were observed. The experimental conditions that exclude a maximum of abiotic and biotic stresses may mask potential interactions that could occur in an unstable natural environment. These results reflect the complexity of biotic interactions, provide methods and model organisms to study them, and raise many exciting hypotheses for future work.