

Isolement et caractérisation de bactéries marines oligotrophes

par Sabine Matallana-Surget^{***}, Fabien Joux^{*}, Philippe Lebaron^{*} & Ricardo Cavicchioli^{**}

^{*} Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Laboratoire d'Océanographie Biologique, UMR 7621,

F-66650 Banyuls-sur-mer, France; CNRS, UMR 7621, F-66650 Banyuls-sur-mer, France;

^{**} School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, The University of New South Wales, Sydney, 2052, NSW, Australia.

Correspondance : Fabien Joux. Laboratoire d'Océanographie Biologique de Banyuls, UMR 7621, BP44, F-66650 Banyuls-sur-Mer, France. Tél. : 04 68 88 73 42. Fax : 04 68 88 73 98. E-mail : joux@obs-banyuls.fr

Reçu le 9 mars 2007

RÉSUMÉ

Une part importante des océans est caractérisée par une pauvreté en nutriments et une faible concentration en chlorophylle. Dans ces environnements oligotrophes, les bactéries sont malgré tout abondantes et jouent un rôle fondamental dans la reminéralisation de la matière organique dissoute. Les bactéries adaptées à l'oligotrophie se distinguent de celles adaptées à des milieux plus riches en nutriments par certaines caractéristiques génétiques et métaboliques. De ce fait, les milieux de culture riches en matière organique cou-

ramment utilisés en bactériologie sont peu adaptés à la croissance et à l'isolement de nombreuses bactéries marines. De nouvelles techniques de culture ont été proposées pour les bactéries oligotrophes et ont permis d'isoler de nouvelles espèces ou de nouveaux genres bactériens. *Pelagibacter ubique* et *Sphingopyxis alaskensis* font partie de ces bactéries récemment isolées du milieu marin dont l'étude a permis de mieux comprendre les adaptations des bactéries marines aux conditions oligotrophes.

SUMMARY Isolation and characterization of marine oligotrophic bacteria

A significant part of the world ocean is characterized by low absolute nutrients and chlorophyll concentrations. In these oligotrophic environments, bacteria are very abundant and play a vital role in the remineralization of the dissolved organic matter. Bacteria adapted to oligotrophic waters differ from those adapted to richer environments by some genetic and metabolic characteristics. Culture techniques in bacterio-

logy are based on rich media and do not allow the growth of most marine bacteria. New techniques have been developed for the culture of oligotrophic bacteria, which allow to isolate unknown bacteria. *Pelagibacter ubique* and *Sphingopyxis alaskensis* belong to these bacteria recently isolated from the marine environment and their study yielded better understanding of how marine bacteria adapt to oligotrophic conditions.

INTRODUCTION

L'océan mondial couvre 71 % de la surface de la planète et joue un rôle essentiel dans la régulation du climat et le cycle des éléments. La production primaire des océans est assurée pour l'essentiel par le phytoplancton, organismes unicellulaires procaryotes ou eucaryotes vivants dans la colonne d'eau. La biomasse phytoplantonique, mesurée au travers de la concentration en chlorophylle *a*, présente une large gamme de variation de 0,1 à 100 µg/l (Fig. 1). Les zones présentant des concentrations élevées en chlorophylle *a* sont dites eutrophes et se situent au niveau des estuaires ou des remontées côtières d'eaux profondes riches en éléments nutritifs (phénomènes d'*upwelling*). À l'inverse, une part importante des océans (entre 50 et 60 %) présente de très faibles concen-

trations en chlorophylle *a* (< 0,5 µg/l), une faible production primaire (< 1 mg carbone par litre et par jour) (Schut *et al.*, 1997) et des concentrations en éléments nutritifs (*e.g.* nitrate, phosphate) souvent en limite de détection (Cole *et al.*, 1998). La production primaire de ces zones océaniques dites oligotrophes est principalement le fait de cellules phytoplantoniques procaryotes et eucaryotes inférieures à 2 µm (Veldhuis *et al.*, 2005). L'autre caractéristique de ces zones est leur forte productivité primaire (production rapportée à la biomasse), suggérant un couplage important entre l'activité de production primaire et l'activité de reminéralisation de la matière organique des bactéries marines hétérotrophes, en absence de tout apport extérieur d'éléments minéraux.

Il a été récemment suggéré que le réchauffement climatique pourrait renforcer le caractère oligotrophe de

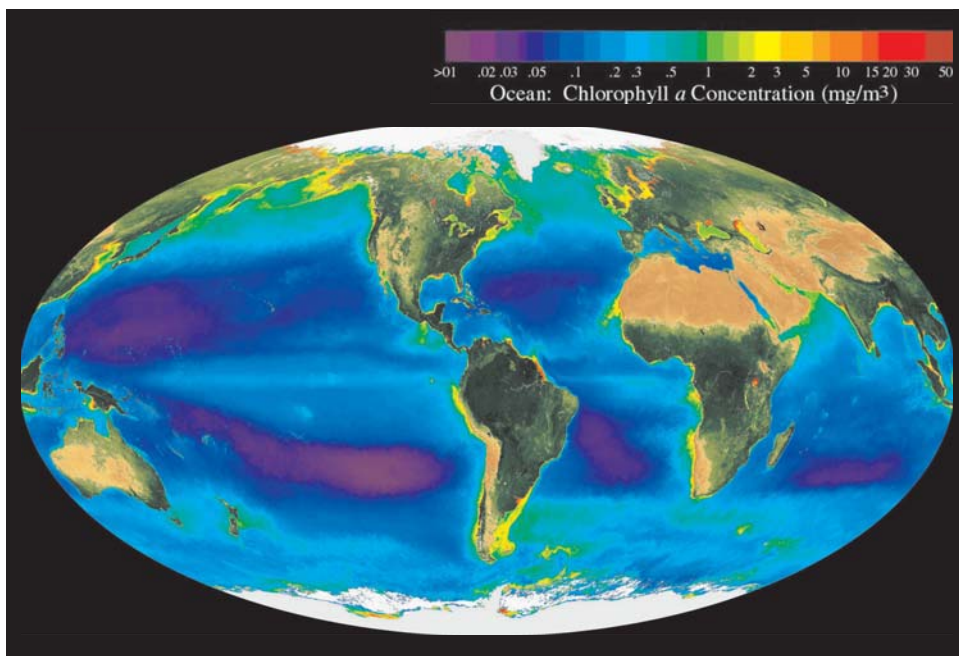


FIG. 1. – Image SeaWiFS de la couleur de la surface des océans représentant les concentrations moyennes en chlorophylle *a* mesurées entre le 21 septembre 1997 et le 20 décembre 2001 (source : <http://oceancolor.gsfc.nasa.gov>).

certaines zones océaniques en freinant les apports d'éléments nutritifs des eaux profondes en raison d'une augmentation de la stratification de densité des eaux de surface des océans (Cox *et al.*, 2000 ; Bopp *et al.*, 2001). En dépit de l'importance écologique des zones oligotrophes marines nous ne savons encore que très peu de choses sur la diversité et les adaptations des organismes qui peuplent ces milieux. C'est particulièrement vrai pour les bactéries hétérotrophes, dont l'étude a été confrontée à des problèmes d'observation, de caractérisation et d'isolement.

Après avoir rappelé les principales caractéristiques des bactéries rencontrées dans les zones océaniques oligotrophes, nous présenterons les techniques alternatives proposées pour leur isolement et les principales caractéristiques physiologiques et génétiques de deux nouvelles espèces isolées par ces techniques.

ABONDANCE, ACTIVITÉ ET DIVERSITÉ DES BACTÉRIES DANS LES OCÉANS OLIGOTROPHES

Il est possible de dénombrer directement les bactéries d'un échantillon d'eau de mer par les techniques de microscopie à épifluorescence (MEF) et de cytométrie en flux (CMF) (Fig. 2). Le comptage des bactéries par ces techniques repose sur un marquage fluorescent de l'ADN au moyen d'un fluorochrome (*e.g.*, DAPI, SYBR-Green) choisi en fonction de la source d'excitation lumineuse utilisée (Porter & Feig, 1980 ; Gasol *et al.*, 1999). Malgré les faibles concentrations en nutriments, les bactéries

persistent à des concentrations de l'ordre de 10^5 - 10^6 cellules ml^{-1} dans les premiers 200 m des océans (*i.e.*, la zone photique), là où l'essentiel de l'activité biologique a lieu. Le nombre total des procaryotes dans les océans est estimé à 10^{29} (Whitman *et al.*, 1998). Les bactéries marines observées par MEF ou CMF sont de très petite taille et leur volume cellulaire varie dans une gamme de 0,02 à 0,12 μm^3 (Bjørnsen, 1986 ; Lee *et al.*, 1987 ; Børshheim *et al.*, 1990 ; Nagata & Watanabe, 1990), soit environ un ordre de magnitude plus petit que les bactéries communément étudiées comme *Escherichia coli* et un faible contenu apparent en ADN compris entre 1 et 2,5 fg/cellule (Button *et al.*, 2001 ; Schut *et al.*, 1993). En dépit de leur faible biovolume, les bactéries représentent une part importante (et parfois dominante) de la biomasse carbonée et jusqu'à 90 % de l'ADN cellulaire dans beaucoup des systèmes océaniques (Paul *et al.*, 1984 ; Fuhrman *et al.*, 1989).

Les bactéries métabolisent une quantité de carbone organique équivalente à environ 50 % de la production primaire dans la zone euphotique à l'échelle d'une journée (Ducklow, 2000). Dans les milieux fortement oligotrophes, l'activité respiratoire des bactéries peut être supérieure à certains moments à la production primaire, faisant basculer la balance trophique vers une hétérotrophie nette (ces systèmes produisent plus de CO_2 qu'ils n'en consomment) (del Giorgio *et al.*, 1997). Les bactéries marines n'ont pas pour seul rôle que de dégrader la matière organique dissoute. Elles peuvent également participer au transfert de la biomasse dans les chaînes trophiques car elles sont la proie des protozoaires hétérotrophes de types flagellés ou ciliés (Azam *et al.*, 1983).

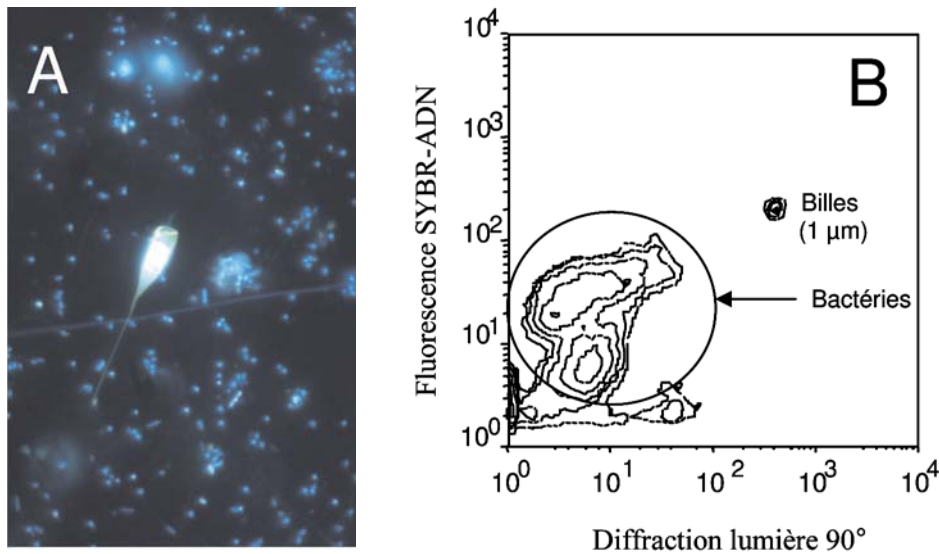


FIG. 2. – Bactéries marines observées au microscope à épifluorescence après marquage de l'ADN au DAPI (grossissement $\times 1000$) (A) et détectées par cytométrie en flux après marquage de l'ADN au SYBR-Green II (B).

L'étude de la diversité bactérienne a été révolutionnée dans les années 90 par l'introduction des techniques de biologie moléculaire (Giovannoni *et al.*, 1990). La petite sous-unité 16S du gène de l'ARN est devenue un marqueur phylogénétique universel et représente le principal critère par lequel les différents groupes sont identifiés et nommés (Giovannoni *et al.*, 2000). Les méthodes moléculaires ont permis de révéler l'incroyable diversité des bactéries dans les océans. Elles sont maintenant couramment utilisées dans les études d'écologie microbienne pour analyser la structure des communautés et identifier les espèces présentes (Muyzer, 1998). Nous ignorons encore précisément le nombre total d'espèces bactériennes, en raison notamment de la difficulté de choisir un critère objectif pour différencier les espèces entre elles. L'hybridation ADN/ADN $>$ à 70 % (Wayne *et al.*, 1987) et la similitude des gènes de l'ARN 16S $>$ à 97 % (Hagström *et al.*, 2000) ont été proposés pour définir l'appartenance de deux bactéries à une même espèce. Toutes les séquences de l'ADN ribosomal 16S déposées dans les bases de données depuis 1990 (Genbank) ont été analysées pour évaluer le nombre d'espèces de bactéries marines potentielles à la surface des océans (Hagström *et al.*, 2002). Sur la base d'une similarité inférieure à 97 % du gène de l'ARNr 16S pour distinguer deux espèces entre elles, les auteurs ont trouvé 1 117 ribotypes uniques dont 609 provenant de clones environnementaux non cultivables et 508 provenant de bactéries isolées.

Afin de renforcer notre connaissance des bactéries marines adaptées aux milieux oligotrophes *via* l'observation directe des populations microbiennes, les mesures des activités *in situ* et l'analyse de l'ADN communautaire, il est essentiel de pouvoir isoler des espèces représentatives de ces zones afin d'en étudier précisément la physiologie et les fonctionnalités.

ISOLEMENT DES BACTÉRIES MARINES OLIGOTROPHES

Concept de bactéries oligotrophes et copiotrophes

Les milieux oligotrophes se caractérisent par un faible flux en nutriments et de faibles concentrations en carbone organique biodégradable. La survie des bactéries dans ces milieux est donc conditionnée à certaines adaptations (Van Guemerdin & Kuenen, 1984). La définition des termes de bactéries oligotrophes et copiotrophes a été proposée par Poindexter *et al.* (1981). Elle s'appuie sur la description de deux stratégies (r et K) à fort et faible taux de croissance (Fig. 3) (Andrews & Harris, 1986). Le tableau I résume les principales caractéristiques théoriques des bactéries oligotrophes et copiotrophes. Il existe cependant des difficultés opérationnelles à caractériser les types oligotrophes et copiotrophes : 1) le placement dans une catégorie peut dépendre de la nature du substrat considéré ; 2) une évolution du type oligotrophe à copiotrophe au cours du temps (adaptation au milieu) est possible. En raison de la présence dans l'océan de micro-zones riches en matière organique (*e.g.*, autour et sur les particules détritiques), les bactéries copiotrophes peuvent coexister avec les bactéries oligotrophes (Simu *et al.*, 2005).

Limites des techniques classiques de culture

La capacité d'une cellule à se reproduire ou à effectuer une croissance peut être considérée comme la preuve la plus rigoureuse de sa viabilité. Sa capacité à former une colonie sur un milieu de culture solide ou un trouble dans un milieu de culture liquide constitue dans ce sens une preuve indéniable de sa viabilité. L'application de ces techniques culturales à des échantillons du milieu

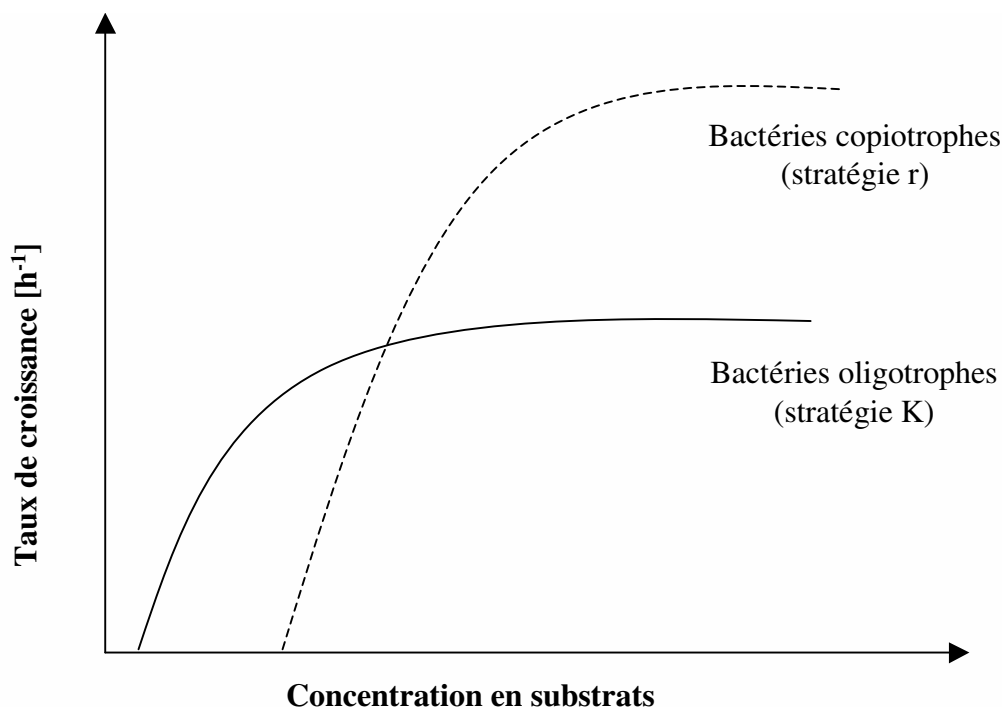


FIG. 3. – Schéma théorique reliant le taux de croissance à la concentration en substrats pour des bactéries oligotrophes (stratégie K) et copiotrophes (stratégie r) (d'après Langer *et al.*, 2004).

TABLEAU I. – Principales caractéristiques des bactéries oligotrophes et copiotrophes (d'après Schut *et al.*, 1997 ; Koch, 2001 ; Button & Robertson., 2001).

Critères de sélection	Oligotrophe	Copiotrophe
Environnement	Faiblement concentré en nutriments et stable	Plus fortement concentré en nutriments et variable
Stratégie	Stratégie K	Stratégie r
Taux de croissance maximale	Faible ($0,1 \text{ h}^{-1}$)	Élevée ($> 1 \text{ h}^{-1}$)
Volume cellulaire	$0,02 \text{ à } 0,12 \mu\text{m}^3$	$0,34 \text{ à } 6,0 \mu\text{m}^3$
Transporteurs d'influx	Forte affinité Faible spécificité Influx de multiples substrats simultanément	Faible affinité Forte spécificité
Opéron ribosomique	Simple copie	Multicopies (<i>Vibrio</i> spp. : 8 à 10)
Génome	Faible taille (<i>P. ubiquus</i> : 1,32 Mpb <i>C. oligotrophus</i> : 2,9 Mpb)	Plus grande taille (<i>V. angustum</i> : 5,1 Mpb)

naturel est très critiquable, car elle suppose que le milieu de culture soit adapté aux différentes exigences nutritionnelles de l'ensemble des espèces et que celles-ci soient capables d'une croissance suffisante pour générer une colonie ou un trouble visible à l'œil nu. Les premiers essais d'isolement de bactéries sur des milieux gélosés riches ont mis en évidence une différence jusqu'à trois ordres de grandeur entre les comptages sur milieu de culture gélosé et le nombre total de bactéries pour des échantillons d'eau de mer ("the great plate count anomaly") (Jannasch & Jones, 1959 ; Ferguson *et al.*, 1984 ; Staley *et al.*, 1985). Les efforts importants d'optimisation

de la composition des milieux de culture n'ont pas apporté de résultats décisifs (Buck, 1974 ; Goltekar *et al.*, 2006). D'autres hypothèses ont été proposées pour expliquer "the great plate count anomaly" comme des phénomènes d'antibiose développés à la surface du milieu gélosé (Long & Azam, 2001), et l'induction d'un cycle lytique lors de la mise en culture de bactéries infectées par des phages tempérés (Middelboe *et al.*, 2001).

La plupart des isolats obtenus par ces milieux de culture ont une taille très supérieure ($0,34\text{-}6,7 \mu\text{m}^3$) à celle des bactéries indigènes, et présentent une miniaturisation durant les périodes de carence nutritionnelle accompa-

gnée par la perte de la capacité à se multiplier sur un milieu de culture (Marden *et al.*, 1985; Nyström *et al.*, 1986; Moyer & Morita, 1989). Ces différentes observations ont longtemps été interprétées comme le fait que les bactéries marines indigènes de petite taille représentaient une forme de dormance d'espèces cultivables ayant perdu leur capacité à former une colonie sur des milieux gélosés à la suite d'un stress nutritif. Il était donc admis que dans l'environnement marin, les bactéries subissaient une carence importante en nutriments et étaient pour l'essentiel sous une forme inactive et en phase de survie.

Cette assertion est cependant remise en cause par deux autres observations :

- l'identification des espèces bactériennes présentes dans le milieu marin par les techniques de biologie moléculaire à partir de l'ADN extrait, montre une faible représentativité des bactéries marines cultivables et décrites à ce jour (Eilers *et al.*, 2000; Giovannoni & Rappé, 2000). Ce résultat ne remet pas en cause l'intérêt de rechercher de nouvelles espèces bactériennes en utilisant les milieux gélosés classiques, mais la question de leur représentativité écologique est posée ;

- la détection d'activités au niveau cellulaire, notamment par microautoradiographie, laisse entrevoir qu'une fraction importante des bactéries marines est active malgré leur faible taille (Joux & Lebaron, 2000).

Les techniques de culture classiques semblent sélectionner les bactéries de type copiotrophe, introduisant un biais dans la représentativité des espèces isolées. L'étude de la physiologie et des fonctionnalités des bactéries marines est donc conditionnée par le développement de techniques alternatives d'isolement.

Techniques alternatives de culture et d'isolement

Une cellule doit générer par division un minimum de 10^7 cellules pour former une colonie visible à l'œil nu. Lorsque des milieux de culture liquides sont utilisés, une cellule doit générer par division un minimum de 10^8 cellules par millilitre pour former un trouble visible à l'œil nu, ou 10^7 cellules par millilitre si la détection s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre (Martin & MacLeod, 1984). En observant la croissance cellulaire au moyen d'un microscope par une technique microculturelle, Torella & Morita (1981) montrent que certaines bactéries marines déposées à la surface d'un milieu gélosé riche, présentent une croissance rapide, tandis que d'autres présentent une très faible efficacité de croissance (*e.g.*, cellules capables de se diviser seulement une fois en 25 h d'incubation). Bianchi et Giuliano (1996) montrent quant à eux que le nombre de microcolonies obtenues à partir d'un échantillon d'eau de mer est supérieur jusqu'à trois ordres de grandeur aux comptages des colonies sur le même milieu de culture. Ces résultats prouvent que la sensibilité de la technique utilisée pour détecter la croissance peut fortement modifier l'appréciation de la viabilité des cellules. Si les techniques microculturelles ont montré des résultats intéressants, elles restent laborieuses et non adaptées à l'isolement de souches bactériennes.

En reprenant le principe des cultures en dilution/extinction, Button *et al.* (1993) l'adaptent aux bactéries marines en utilisant de l'eau de mer stérile comme seul support à la croissance et la cytométrie en flux pour détecter la croissance (seuil de détection: 10^3 cellules/ml). La croissance est suivie au long de plusieurs semaines à la température *in situ*. Dans ces conditions, le temps de génération des bactéries dominantes (*i.e.*, les cellules non cultivables), s'échelonne entre 1 jour et 1 semaine et la phase stationnaire est atteinte à une concentration de 10^5 - 10^6 cellules/ml (Button *et al.*, 1993; Schut *et al.*, 1993). Les pourcentages de cellules viables obtenues par cette approche varient de 2 à 60 % et ils diminuent considérablement lorsque l'eau de mer est enrichie par plus de 5 mg d'acides aminés/l (Button *et al.*, 1993). Par conséquent, la concentration minimale de carbone nécessaire pour qu'une cellule puisse former une colonie ou un trouble visible, telle que l'estiment Martin & MacLeod (1984) à 2,5 mg de carbone/l, peut se révéler inhibitrice pour une grande partie des bactéries marines. Cette approche de culture en dilution en eau de mer a été récemment optimisée en réduisant les volumes de culture par l'utilisation d'une microplaque et en facilitant l'observation de la croissance par microscopie à épifluorescence (Connon & Giovannoni, 2002; Simu & Hagström, 2004) (Fig. 4).

L'utilisation de ces cultures en dilution a permis d'isoler un grand nombre d'espèces jusqu'alors jamais cultivées. De plus, ces nouvelles espèces caractérisées sur le plan phylogénétique appartiennent à des clades majoritaires dans le milieu marin (Connon & Giovannoni, 2002). La dernière étape consiste à essayer de cultiver ces nouvelles espèces sur des milieux de croissance plus riches, afin de faciliter l'étude de leur physiologie en laboratoire (Schut *et al.*, 1993). Deux bactéries marines oligotrophes servent aujourd'hui de modèles d'étude dans différents laboratoires. Elles ont été isolées par la technique de dilution/extinction et présentent une différence dans l'adaptation à des milieux plus riches. *Pelagibacter ubique* est une bactérie oligotrophe stricte, dont l'adaptation à des milieux plus riches n'a pas été possible (Rappé *et al.*, 2002), alors que *Sphingopyxis alaskensis* est une bactérie oligotrophe facultative dont l'adaptation à des milieux plus riches a été possible (Schut *et al.*, 1993, 1995).

DESCRIPTION DE BACTÉRIES OLIGOTROPHES ISOLÉES PAR CULTURE EN DILUTION

Pelagibacter ubique, modèle de bactérie oligotrophe stricte

Pelagibacter ubique a été isolée par la technique de dilution/extinction à partir d'échantillons d'eau de mer provenant de la côte de l'Oregon (Rappé *et al.*, 2002). C'est une bactérie oligotrophe stricte, gram négative, appartenant au phylum des Protéobactéries, à la classe des α Protéobactéries et à l'ordre des Rickettsiales (Rappé *et al.*, 2002). D'après le séquençage du gène de l'ARNr 16S, *P. ubique* est membre du clade SAR11 et pourrait

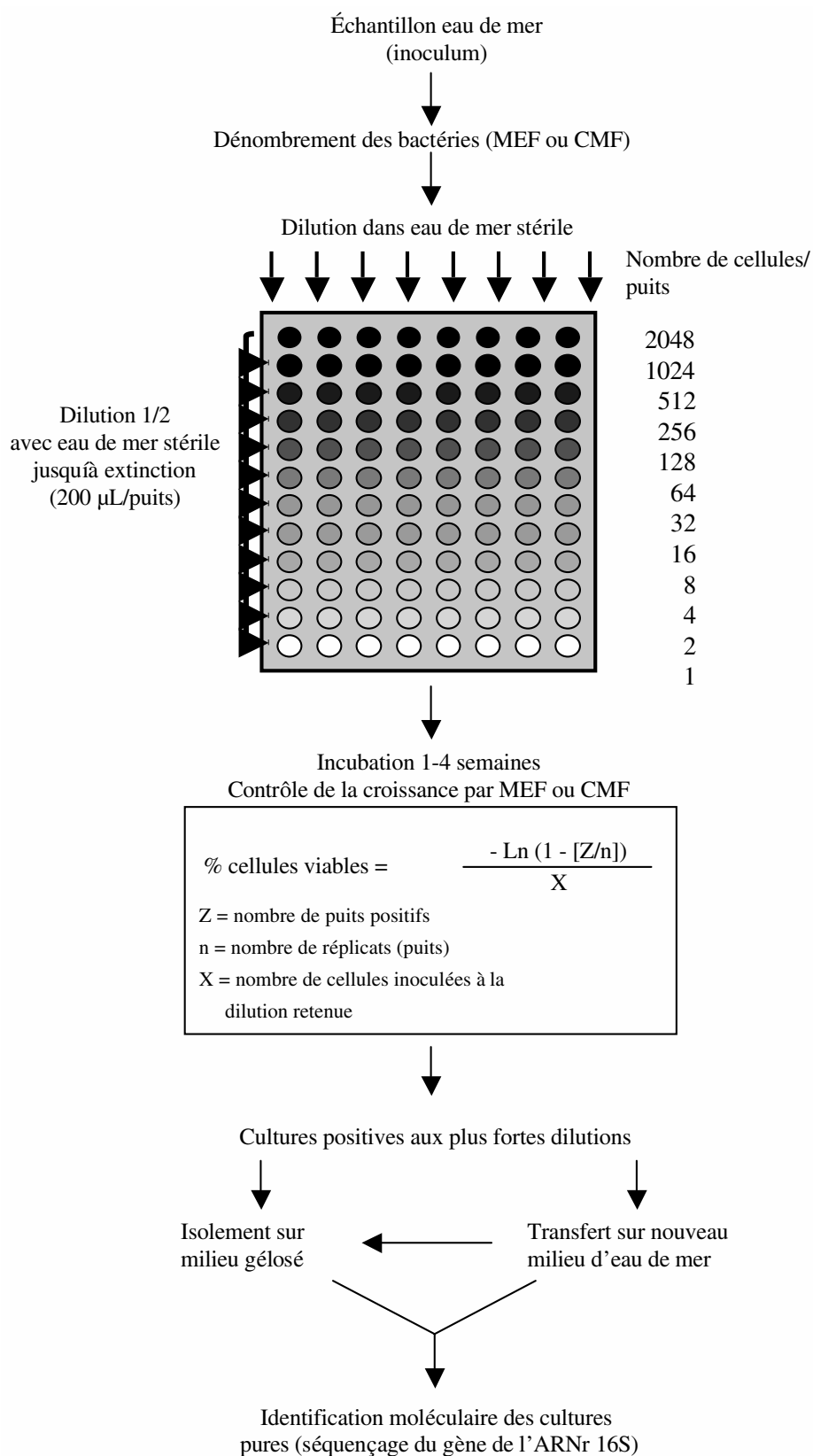


FIG. 4. – Schéma du principe de la technique de culture par dilution/extinction (d'après Simu & Hagström, 2004).

ainsi faire partie des bactéries les plus abondantes à la surface des océans (Rappé *et al.*, 2002). En effet, l'importance numérique du clade SAR11, mesurée par la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) par Morris *et al.* (2002), montre que dans certaines régions, les bactéries de ce clade peuvent représenter jusqu'à 50 % de la communauté bactérienne totale des eaux de surface et 25 % plus en profondeur. Par extrapolation, on compterait ainsi $2,4 \cdot 10^{28}$ cellules SAR11 dans les océans, dont la moitié serait localisée dans la zone euphotique. Même si l'importance du rôle biogéochimique du clade SAR11 n'est pas encore établie, il est certain que l'étude de ce groupe microbien présente un intérêt du fait de sa prédominance dans la communauté des bactéries marines hétérotrophes.

P. ubiqua est une ultramicrobactérie dont la taille varie entre 0,12 et 0,2 μm , avec un volume cellulaire de 0,01 μm^3 . Il s'agit de la plus petite bactérie isolée à ce jour. Le génome de *P. ubiqua* a été entièrement séquencé. Il est de très petite taille (1,32 Mpb) et code pour 1 393 protéines (<https://research.venterlinstitute.org/moore/>). L'ADN occupe jusqu'à 30 % du volume cellulaire (Rappé *et al.*, 2002). Contrairement aux autres organismes possédant un très petit génome (bactéries parasites et Archaea), *P. ubiqua* possède des voies de biosynthèse complètes pour chacun des 20 acides aminés et cofacteurs (Giovannoni *et al.*, 2005a). Son génome ne présente ni pseudogènes, introns, transposons, éléments extrachromosomiques ou intéines (Giovannoni *et al.*, 2005a). Il possède quelques paralogues et les plus petites régions intergéniques observées jusqu'à présent (Giovannoni *et al.*, 2005 a). *P. ubiqua* est cultivable dans un milieu liquide constitué d'eau de mer supplémentée en azote et en phosphore inorganique. L'ajout d'une source de carbone organique même en très faible concentration (peptone à 0,001 %) conduit à un échec dans la culture, faisant d'elle une bactérie oligotrophe stricte (Rappé *et al.*, 2002). En condition de culture avec milieu minimum, on parvient à obtenir après 15 jours de croissance une concentration cellulaire maximale de 10^6 cellules/ml. Cette biomasse, bien que faible, peut être suffisante pour certains types d'étude. La protéorhodopsine (pompe à proton, lumière dépendante) a ainsi été caractérisée chez cette souche par spectrométrie de masse, et la vérification fonctionnelle de cette protéine a été réalisée après clonage dans un vecteur d'expression de *E. coli* par mesure du spectre d'absorption caractéristique à 530 nm (Giovannoni *et al.*, 2005 b). Cette protéine occupe 20 % de la surface de la membrane plasmique interne. L'expression de la protéorhodopsine pourrait constituer un avantage écologique pour les cellules de *P. ubiqua* placées dans un milieu limité en nutriments, en offrant une voie alternative de production d'énergie à celle issue de la dégradation de la matière organique. Cependant le rôle exact de la protéorhodopsine chez *P. ubiqua* n'est pas encore clairement établi, puisque que cette souche présente, en condition de culture au laboratoire, le même taux de croissance à la lumière qu'à l'obscurité (Giovannoni *et al.*, 2005 b). Il est possible cependant que la protéorhodopsine s'exprime de manière plus subtile dans le milieu naturel.

Sphingopyxis alaskensis RB2256, modèle de bactérie oligotrophe facultative

Sphingopyxis alaskensis RB2256 est une bactérie oligotrophe facultative, gram négative, appartenant au phylum des Protéobactéries, à la classe des α Protéobactéries et à l'ordre des Rhodospirillales. *S. alaskensis* RB2256 a été isolée pour la première fois par la technique de culture en dilution/extinction, dans un fjord en Alaska (Schut *et al.*, 1993). *S. alaskensis* (souche AFO1) a ensuite été isolée en Mer du Nord et dans le Pacifique Nord (Eguchi *et al.*, 2001). Après l'isolement de *S. alaskensis* par culture en dilution, il a été possible, après le maintien de la culture en eau de mer pendant un an à 5° C et à l'obscurité, de cultiver la souche sur un milieu de culture gélosé riche en matière organique (Schut *et al.* 1993). Ce cas de réversion métabolique n'a pas trouvé d'explication et pourrait être dû à une mutation (Schut *et al.* 1993).

Il s'agit d'une ultramicrobactérie, avec un volume cellulaire de 0,05 μm^3 présentant de très faibles changements de taille en fonction du stade de croissance (0,05 à 0,09 μm^3) (Schut *et al.*, 1997). Le génome de cette bactérie, entièrement séquencé aujourd'hui, a une taille de 3,2 Mpb avec 3 196 gènes (Cavicchioli *et al.*, 2003) (<http://www.jgi.doe.gov>). Le génome de *S. alaskensis* possède un seul opéron ARNr contre 8 à 11 chez *Vibrio* spp. Le faible nombre d'opérons ARNr peut être considéré comme une adaptation à la vie en milieu oligotrophe, où les concentrations en éléments nutritifs varient peu et où il est inutile de répondre par une croissance rapide à un apport massif d'éléments nutritifs comme dans le cas des milieux côtiers (Fegatella *et al.*, 1998; Klappenbach *et al.*, 2000).

S. alaskensis présente de nombreuses particularités physiologiques par rapport aux souches bactériennes classiquement étudiées (*E. coli*, *Vibrio* spp.). Tout d'abord, les cellules de *S. alaskensis* conserve une petite taille et un faible taux de croissance (0,13 à 0,16 h⁻¹) pour des milieux de croissance dont la richesse en carbone organique varie de 0,8 à 800 mg de carbone/l (Schut *et al.*, 1993; Eguchi *et al.*, 1996). *S. alaskensis* possède également une capacité de recroissance sans phase de latence même après 7 jours en phase stationnaire (Fegatella *et al.*, 1998). Pendant la phase stationnaire, le nombre de ribosomes se trouve en large excès comparativement à la synthèse protéique requise, fournissant ainsi un avantage pour les cellules limitées lorsque celles-ci rencontreront une nouvelle source de carbone (Fegatella *et al.*, 2000).

En présence d'un mélange de glucose et d'alanine, *S. alaskensis* est capable d'utiliser les deux substrats simultanément (Schut *et al.*, 1997). Des expériences de suivi de l'alanine radiomarquée ont montré que le métabolisme de l'alanine est régulé en fonction du second substrat qui est le glucose. La cellule peut ainsi rediriger la voie métabolique de l'alanine grâce à un système d'influx continu des deux substrats. L'expression constitutive des systèmes de transporteur d'influx est d'une importance évidente pour des cellules placées dans des

environnements à faibles concentrations en nutriment (Schut *et al.*, 1997). D'autre part, la faible spécificité des transporteurs permet à cette bactérie d'utiliser de nombreux acides aminés différents simultanément (Schut *et al.*, 1997).

Une étude du protéome en gel 2D de *S. alaskensis* et *V. angustum* a été réalisée afin de comparer les variations de l'expression protéique entre la phase exponentielle et la phase stationnaire. Chez *S. alaskensis*, le nombre de spots présentant une plus forte intensité passe de 177 en phase exponentielle à 72 en phase stationnaire. Inversement, chez *V. angustum* on observe un même nombre de spots entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (144 et 157 respectivement). Cette différence dans le protéome entre les deux souches pourrait s'expliquer par le fait que *S. alaskensis* ne subit pas de divisions cellulaires réductives s'accompagnant d'une diminution de la taille à l'entrée en phase stationnaire, contrairement aux microorganismes copiotrophes comme *V. angustum* (Fegatella *et al.*, 2000).

S. alaskensis présente une forte résistance à différents stress, comme des températures élevées (jusqu'à 56°C), le peroxyde d'hydrogène (25 mM), l'éthanol (20 %), ou le rayonnement ultraviolet B (Eguchi *et al.*, 1996; Joux *et al.*, 1999). De plus, *S. alaskensis* présente une résistance similaire à ces différents stress en phase exponentielle et en phase stationnaire, se distinguant ainsi des autres bactéries pour lesquelles le phénomène de « protection croisée » a été décrit (augmentation de la résistance aux stress chez les cellules à l'entrée en phase stationnaire) (Eguchi *et al.*, 1996). Cette bactérie pourrait ainsi posséder des mécanismes originaux de résistance, non encore décrits chez les bactéries non différenciées (Eguchi *et al.*, 1996).

CONCLUSION

La mise au point des cultures en dilution/extinction a ouvert des perspectives intéressantes dans l'isolement de nouvelles espèces de bactéries marines oligotrophes. L'utilisation plus systématique de cette technique d'isolement devrait permettre de mieux décrire la diversité, l'écologie et la physiologie des bactéries marines. Cette technique d'isolement peut vraisemblablement être encore optimisée en modifiant de manière subtile la composition du milieu de culture (Bruns *et al.*, 2002). L'isolement de ces nouvelles espèces de bactéries marines pourrait également servir de base à la recherche de molécules présentant des applications dans les domaines de la médecine et de la biotechnologie. Ainsi, on a découvert chez la bactérie marine oligotrophe *Cycloclasticus oligotrophus* des potentialités intéressantes dans la dégradation des hydrocarbures (Wang *et al.*, 1996).

Remerciements. – Ce travail s'inscrit dans le programme franco-australien, "The molecular basis of oligotrophy: an integrated genomic and functional proteomic study of the model marine oligotroph, *Sphingopyxis alaskensis*" et reçoit l'aide d'une allocation de Thèse Fléchée Internationale attribuée par le Ministère de la Recherche à S. Matallana-Surget.

BIBLIOGRAPHIE

- Andrews J. H. & Harris R. F., r- and K-selection and microbial ecology. *Adv. Microb. Ecol.*, 1986, 9, 99-147.
- Azam F., Fencel T., Field J. G., Gray J. S., Meyer-Reil T. A. & Thingstad F., The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1983, 10, 257-263.
- Bianchi A. & Giuliano L., Enumeration of viable bacteria in the marine pelagic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 62, 174-177.
- Bjørnsen P. I., Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, 51, 1199-1204.
- Bopp L., Monfray P., Aumont O., Dufresne J. L., Le Treut H., Madec G., Terray L. & Orr J. C., Potential impact of climate change on marine export productions. *Global Biogeochem. Cycles*, 2001, 15, 81-99.
- Børsheim K. Y., Bratbak G. & Heldal M., Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56, 352-356.
- Bruns A., Cypionka H. & Overmann J., Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68 (8), 3978-3987.
- Buck J., Effects of medium composition on the recovery of bacteria from seawater. *J. Exp. Mar. Biol.*, 1974, 15, 25-34.
- Button D. K. & Robertson B., Determination of DNA content of aquatic bacteria by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 1636-1645.
- Button D. K., Schut F., Quang P., Martin R. F. & Robertson B., Viability and isolation of typical marine oligobacteria by dilution culture: theory, procedures and initial results. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59, 881-891.
- Cavicchioli R., Ostrowski M., Fegatella F., Goodschild A. & Guixa-Boixereau N., Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an eco/physiological perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (Formerly *Sphingomonas alaskensis*). *Microb. Ecol.*, 2003, 45, 203-217.
- Cole J. J., Findlay S. & Pace M. L., Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1998, 43, 1-10.
- Connon S. A. & Giovannoni S. J., High-throughput methods for culturing microorganisms in very low nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 3878-3885.
- Cox P. M., Betts R. A., Jones C. D., Spall S. A. & Totterdell I. J., Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature*, 2000, 408, 184-187.
- Del Giorgio P. A., Cole J. J. & Cimleris A., Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature*, 1997, 385, 148-151.
- Ducklow H. W., Bacterioplankton production and biomass in the oceans. In : Kirchman D., Ed., *Microbial Ecology of the Oceans*. New York : Wiley, 2000, 4, 85-120.
- Eguchi M., Nishikawa T., MacDonald K., Cavicchioli R., Gottschal J. C. & Kjelleberg S., Responses to stress and nutrient availability by the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62, 1287-1294.
- Eguchi M., Ostrowski M., Fegatella F., Bowman J., Nichols D., Nishino T. & Cavicchioli R., *Sphingomonas alaskensis* strain AFO1, an abundant oligotrophic ultramicrobacterium from the North Pacific., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 4945-4954.
- Eilers H., Pernthaler J., Glockner F. O. & Amann R., Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66, 3044-3051.

- Fegatella F., Lim J., Kjelleberg S. & Cavicchioli R., Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, *64*, 4433-4438.
- Ferguson R. L., Buckley E. N. & Palumbo A. V., Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, *47*, 49-55.
- Fuhrman J. A. & Azam F., Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.*, 1982, *66*, 109-120.
- Fuhrman J. A., Sleeter T. D., Carlson C. A. & Proctor L. M., Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1989, *57*, 207-217.
- Gasol J. M., Zweifel U. L., Peters F., Fuhrman J. A. & Hagström A., Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, *65* (10), 4475-4483.
- Giovannoni S. J., Bibbs L., Cho J. C., Stapels M. D., Desiderio R., Vergin K. L., Rappé M. S., Laney S., Lawrence J. W., Tripp H. J., Mathur E. J. & Barofsky D. F., Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. *Nature*, 2005b, *483*, 82-85.
- Giovannoni S. J., Britschgi T. B., Moyer C. L. & Field K. G., Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 1990, *3*, 345 (6270), 60-63.
- Giovannoni S. & Rappé M., Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In : Kirchman D. L. (ed.), *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss, New York, NY, 2000, 47-84.
- Giovannoni S. J., Tripp H. J., Givan S., Podar M., Vergin K. L., Baptista D., Bibbs L., Eads J., Richardson T. H., Noorderwier M., Rappé M. S., Short J. M., Carrington J. C. & Mathur E. J., Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science*, 2005a, *19*, 309 (5738), 1242-1245.
- Gottekar R. C., Krishnan K. P., De Souza M. J. B. D., Paropkari A. L. & Loka Bharathi P. A., Effect of carbon source concentration and culture duration on retrievability of bacteria from certain estuarine, coastal and offshore areas around peninsular India. *Curr. Sci.*, 2006, *90* (1), 103-106.
- Hagström A., Pinhassi J. & Zweifel U. L., Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.*, 2000, *21*, 231-244.
- Hagström A., Pommier T., Rohwer F., Simu K., Stolte W., Svensson D. & Zweifel U. L., Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, *68* (7), 3628-3633.
- Jannasch H. W. & Jones G. E., Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.*, 1959, *4*, 128-139.
- Joux F., Jeffrey W. H., Lebaron P. & Mitchell D. L., Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, *65*, 3820-3827.
- Joux F. & Lebaron P., Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at the single cell level. *Microb. Infect.*, 2000, *2*, 1523-1535.
- Klappenbach J. A., Dunbar J. M. & Schmidt T. M., rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, *66*, 1328-1333.
- Koch A. L., Oligotrophs versus copiotrophs. *BioEssays*, 2001, *23*, 657-661.
- Langer U., Böhme L. & Böhme F., Classification of soil microorganisms based on growth properties: a critical view of some commonly used terms. *J. Plant. Nutr. Soil. Sci.*, 2004, *167*, 267-269.
- Lee S. & Fuhrman J. A., Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, *53*, 1298-1303.
- Long R. A. & Azam F., Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, *67* (11), 4975-4983.
- Marden P., Tunlid A., Malmcrona-Friberg K., Odham G. & Kjelleberg S., Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Arch. Microbiol.*, 1985, *142*, 326-332.
- Martin P. & MacLeod R. A., Observation on the distinction between oligotrophic and eutrophic marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, *47*, 1017-1022.
- Middelboe M., Hagström A., Blackburn N., Sinn B., Fischer U., Borch N. H., Pinhassi J., Simu K. & Lorenz M. G., Effects of bacteriophages on the population dynamics of four strains of pelagic marine bacteria. *Microb. Ecol.*, 2001, *42* (3), 395-406.
- Morris R. M., Rappé M. S., Connon S. A., Vergin K. L., Siebold W. A., Carlson C. A. & Giovannoni S. J., SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*, 2002, *420*, 806-810.
- Moyer C. L. & Morita R. Y., Effect of the growth rate and starvation-survival on the viability and stability of psychrophilic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, *55*, 1122-1127.
- Muyzer G., Structure, function and dynamics of microbial communities: the microbial communities: the molecular biological approach. In : Carvalho G. R. (ed) *Advances in molecular ecology*. NATO Science Series: Series A: Life Sciences. IOS Press, Amsterdam, 1998, 87-117.
- Nagata T. & Watanabe Y., Carbon- and nitrogen-to-volume ratios of bacterioplankton grown under different nutritional conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, *56*, 1303-1309.
- Nyström T., Marden P. & Kjelleberg S., Relative changes in incorporation rates of leucine and methionine during starvation survival of two bacteria isolates from marine waters. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1986, *38*, 285-292.
- Paul J. H. & Carlson D., Genetic material in the marine environment: implication for bacterial DNA. *Limnol. Oceanogr.*, 1984, *29*, 1091-1097.
- Poindexter J. S., Oligotrophy. Fast and famine existence. *Adv. Microb. Ecol.*, 1981, *5*, 63-89.
- Porter K. G. & Feig Y. S., The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 1980, *25*, 943-948.
- Rappé M. S., Connon S. A., Vergin K. L. & Giovannoni S. J., Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, 2002, *418*, 630-633.
- Schut F., de Vries E. J., Gottschal J. C., Robertson B. R., Harder W., Prins R. A. & Button D. K., Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, *59*, 2150-2160.
- Schut F., Jansen M., Pedro Gomes T. M., Gottschal J. C., Harder W. & Prins R. A., Substrate uptake and utilization by a marine ultramicrobacterium. *Microbiology*, 1995, *141*, 351-361.
- Schut F., Prins R. A. & Gottschal J. C., Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquat. Microb. Ecol.*, 1997, *12*, 177-202.
- Simu K. & Hagström A., Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, *70*, 2445-2451.
- Simu K., Holmfeldt K., Zweifel U. L. & Hagström A., Culturability and coexistence of colony-forming and single-cell marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, *71* (8), 4793-4800.
- Staley J. T. & Konopka A., Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1985, *39*, 321-346

- Van Guemerdén H. & Kuenen G. J., Strategies for growth and evolution of microorganisms in oligotrophic habitats. *In* : Hobbie J. E. Ieb, Williams P. J. (eds) *Heterotrophic activity in the sea*. Nato Conference series, series IV. Plenum. Press, New York, 1984, 25-44.
- Veldhuis M. J. W., Timmermans K., Croot P. & Vand der Wagt B., Picophytoplankton: a comparative study of their biochemical composition and photosynthetic properties. *J. Sea Res.*, 2005, 53, 7-24.
- Wang Y., Lau P. C. K. & Button D. K., A marine oligobacterium harbouring genes known to be part of aromatic hydrocarbon degradation pathways of soil Pseudomonads. *App. Env. Microbiol.*, 1996, 62, 2169-2173.
- Wayne L. G., Brenner D. J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L. H., Murray G. E., Stackebrandt E., Starr M. P. & Trüper G. H., Report of the *ad hoc* Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1987, 37, 463-464.
- Whitman W. B., Coleman D. C. & Wiebe W. J., Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 6578-6583.
-