

THÈSE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITÉ DE NANTES
COMUE UNIVERSITÉ BRETAGNE LOIRE

ÉCOLE DOCTORALE N°598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : Biologie des organismes

Par

Charlotte NEF

Métabolisme et interactions bactériennes en lien avec la vitamine B₁₂ chez la microalgue haptophyte *Tisochrysis lutea*

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 13 novembre 2019

Unité de recherche : Laboratoire Physiologie et Biotechnologie des Algues, Unité BRM, Centre IFREMER
Atlantique

Laboratoire Génie des Procédés, Environnement Agroalimentaire, Université de Nantes

Rapporteurs avant soutenance

Catherine Leblanc
Antoine Sciandra

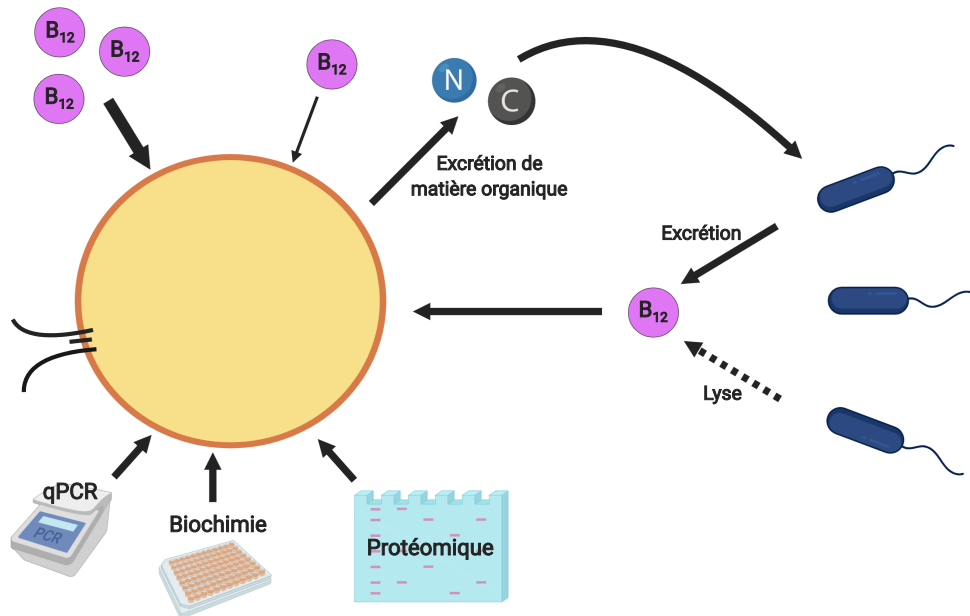
Directrice de recherche HDR, CNRS, LBIMM
Directeur de recherche HDR, CNRS, LOV

Composition du Jury

Président	Joël Fleurence	Professeur HDR, Université de Nantes, MMS
Rapporteurs	Catherine Leblanc Antoine Sciandra	Directrice de recherche HDR, CNRS, LBIMM Directeur de recherche HDR, CNRS, LOV
Examinatrices	Angélique Gobet Leila Tirichine Delacour	Cadre de recherche, IFREMER Sète, MARBEC Directrice de recherche HDR, CNRS, UFIP
Directeur de thèse	Francis Mairet	Cadre de recherche HDR, IFREMER Nantes, LPBA
Membre invité	Matthieu Garnier	Cadre de recherche, IFREMER Nantes, LPBA

Thèse de doctorat

Métabolisme et interactions bactériennes en lien avec la vitamine B₁₂
chez la microalgue haptophyte *Tisochrysis lutea*



Thèse soutenue par

Charlotte Nef

Sous la direction de

F. Mairet, M. Garnier et D. Grizeau

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements aux deux rapporteurs de cette thèse : Catherine Leblanc et Antoine Sciandra. Merci d'avoir accepté d'évaluer ces travaux.

Je remercie Leïla Tirichine Delacourt, Joël Fleurence et Angélique Gobet pour avoir accepté d'être examinateurs.

J'adresse également mes remerciements à Simon Dittami et Éric Fouilland, merci pour vos précieux conseils et nos nombreux échanges pendant mes comités de suivi de thèse et en dehors !

Merci à Delphine Passerini et à Céline Henry pour votre aide dans les manip.

Je remercie la Région des Pays de la Loire (Programme Atlantic Microalgae), l'Ifremer et le GEPEA pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse à l'aide de leurs financements.

Un immense merci à mes encadrants de thèse :

Merci à Raymond, le joyeux retraité, qui fut mon directeur de thèse pendant ma première année : merci de m'avoir recrutée ! :) Et merci de m'avoir initiée à la culture de Tiso et d'avoir toujours été disponible ! Je suis contente d'avoir profité de ton enseignement pendant ta dernière année pré retraite !

Merci à Francis, mon deuxième directeur de thèse, qui s'est un peu retrouvé avec ma thèse sur les bras dès son arrivée à PBA ! Merci (et bravo !) à toi de m'avoir supportée. J'ai toujours pu compter sur tes conseils avisés !

Merci à Matthieu, mon co-encadrant côté PBA ! Même si nous avons eu des moments difficiles, tu as toujours répondu présent et cru en mes capacités. Merci (de t'être arraché le peu de cheveux qu'il te reste) d'avoir été si disponible durant nos nombreux allers-retours de corrections en tout genre ! Merci pour tes "mal dit" et tes "mal placé" ainsi que les fautes d'orthographe qui allaient avec !

Merci à Dominique, mon co-encadrant côté GEPEA ! Même si nous n'étions pas dans le même laboratoire, tu m'as toujours soutenue durant ma thèse et je t'en remercie !

Merci à tous mes encadrants d'avoir autant donné de leur personne pour la rédaction de ce manuscrit de thèse ainsi que pour les articles !

Un grand MERCI à l'équipe de mon laboratoire d'accueil, le laboratoire Physiologie et Biotechnologie des Algues de l'Ifremer ! Durant ces trois années à vos côtés j'ai pu bénéficier de l'excellente ambiance de travail qui y règne ! Je commencerai par remercier notre chef scientifique Gaël Bougaran, merci à toi de m'avoir acceptée pour cette fabuleuse aventure humaine et professionnelle qu'est la thèse ! Mon second grand merci ira bien évidemment à Isabelle, la cheffe officieuse du labo, "maman poule", sans qui le labo ne serait pas le même. Merci pour tes conseils et le temps passé à répondre à mes (nombreuses) questions administratives et pratiques. Merci également pour nos longues discussions entre amatrices de chats et plus si affinité. Merci à Greg, mon compatriote geek, pour toutes nos discussions pop culture et geekeries et ton aide précieuse en informatique, génomique et sur la Galaxy ! À quand la switch ?? Merci à Bruno, le représentant Targaryen dans le labo, pour ton aide régulière et tes conseils pertinents sur les manips, merci de m'avoir laissé ta porte ouverte ! Merci à Jean-Baptiste pour ton acharnement lors de la préparation des cultures en chémostat et en turbi-chémostat, ainsi que pour ton humour un peu tordu que j'étais souvent la seule à comprendre ! Merci à Thomas pour ton regard qui ne se prend pas au sérieux sur la science, ainsi que pour tes conseils. Merci à Nathalie, de l'équipe des amatrices de chats, pour ton aide et ta bonne humeur. Puisse tes tendons se remettre rapidement ! Merci à Liêt pour nos discussions et tes conseils ! Attention à bien rentrer dans l'Ifremer par la bonne porte ! Merci à Aurélie, pour ta bonne humeur, ton humour et ta disponibilité. J'espère que tu ne m'oublieras pas aussi vite que tu oublies ce que tu dois faire entre deux étages ! Comment vas-tu faire pour penser à recharger ta carte sans moi ?? Un grand merci à Élodie, pour toutes nos discussions pro et perso, ton soutien, ta bonne humeur et tes conseils ! Longue vie aux mycosporine-like amino acids ! Merci à Élise, la plus jeune des permanentes, pour ton aide et ta gentillesse. Je suis toujours disponible si tu veux te débarrasser de Enouk !

Merci à Catherine, la retraitée au grand cœur, toujours prête à aider et à conseiller ! Merci à Ewa, pour tes noms sans articles et ton humour polonais ! Merci d'avoir fait des plats rien que pour moi à la place de Bigos ! Je vous souhaite une excellente retraite, bien méritée !

Merci aux p'tits (plus ou moins) jeunes de PBA : Louise, Anne-Cécile, Guillaume, Élise, Théo, Noémie et bientôt Anne ! Merci pour votre bonne humeur et d'avoir partagé les mojitos du Maestro ! Merci à toi Louise de m'avoir supportée durant les derniers huit mois de ma thèse, qui n'étaient pas les plus faciles ! Un big up pour Anne-Cécile, pour

toutes nos discussions politiques et humaines, et tes conseils de lectures et de recettes !! Bonne continuation à Théo pour la suite de ton alternance, et attention aux genoux en travaillant avec JB ! Bonne fin de stage à toi Guillaume, n'oublie pas de ramener une bonne bouteille de rhum pour fêter ton diplôme et la fin de ta cohabitation avec Bruno ! Bon retour à PBA à toi Anne, amuse-toi bien dans ta nouvelle aventure de thèse et profite bien d'un bureau sans store cassé !

Merci à ceux qui, comme moi, étaient de passage à PBA : Élodie et Nicolas ! Je vous souhaite de vous épanouir dans vos nouvelles aventures. Un autre merci à notre post-doc de passage, Camilla, je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite famille et de t'éclater dans ta vie pro ! Un merci également à Loïc, qui a migré en Nouvelle-Calédonie.

Un gros merci à mes stagiaires de Master 2 Sébastien et Célia ! Merci à vous d'avoir travaillé d'arrache-pied sur ce sujet qui est bien plus complexe qu'il n'y paraît.

Un merci tout spécial à Virginie, que j'ai connue en février 2016 à mon entrée en stage de Master 2 chez nos voisins de Phyc. J'ai été ravie que tu arrives peu de temps après moi à PBA. Merci pour nos trajets (quasi) quotidiens entre le labo et la gare, pour ton humour, tes recettes, ton amitié ainsi que celle de Léo ! Je vous souhaite une belle vie dans votre nouveau chez vous.

J'en profite pour remercier aussi nos chers voisins de Phyc, merci pour votre bonne humeur ! Merci à Fabienne pour ton aide précieuse et ton humour ! Merci à Véronique pour m'avoir donné l'opportunité d'étudier mes premières microalgues, et de m'avoir soutenue par la suite !

Merci à la super équipe de notre restaurant pour m'avoir si bien nourrie pendant ces trois ans de thèse ! Merci pour le rab, les mots gentils et les tests de plats végétariens !

Un gros merci à mes autres comparses thésards des autres labos : Katy, Norman, Arthur, Valentin, Francesco, Nour, Pauline, Solène, Sylvain, Marin et Maxime ! Merci pour nos discussions sur la galère de la thèse et pour les coups à boire aux Facultés ! Bon courage à ceux qui n'ont pas encore soutenu, je suis persuadée que vous allez cartonner.

J'adresse des remerciements particuliers à mes encadrants de stage de Master 1 : Bruno Jesus et Bruno Cognie. Merci à vous de m'avoir donné envie de faire de la recherche et de m'avoir initiée en commençant par les limaces de mer photosynthétiques ! Merci également à Cécile Brun pour ton soutien lors de la transition vers la thèse !

Que serais-je devenue sans Nintendo et Square Enix ? Merci à Shouzou Kaga, Satoshi Tajiri et Hironobu Sakaguchi de m'avoir permis de décompresser durant les moments dif-

ficiles ! Merci à Métallica, Sum 41, Yellowcard, Linkin Park, Foo Fighters, Fall Out Boy et Adèle pour l'ambiance musicale durant mes nombreuses périodes de rédaction et d'analyse de données !

Je remercie ma famille et mes amis. Merci en particulier à Mathilde, qui me supporte depuis la L3, et à Nicolas, pour votre amitié !

Un grand merci à mon comparse et ami, Mymy, qui forma avec moi le TERRIBLE duo des poussins. Merci pour les geekeries, les conventions et les concerts. Merci pour votre aide et votre amitié à toi et Lucie, on se reverra la prochaine fois à Okinawa les Berthoni !

Merci à Camille et Johan pour votre amour et votre soutien sans faille, nos vacances ensemble, la garde des chats lors des congrès, les jeux et les livres par milliers !

Un grand merci à mes chats, Ibou et Odin, pour nous avoir rappelé qu'il y a une vie en dehors de la rédaction du manuscrit de thèse, et que parfois il faut se nourrir et leur donner des croquettes par la même occasion ! Merci à mon chat Toumou, qui m'a suivie pendant 16 ans et durant la plupart de mes années d'études, j'aurais aimé que tu me voies devenir docteur.

Pour finir, merci à ma moitié, Erwann. Merci d'avoir partagé les moments heureux comme les moments difficiles durant toutes ces années. Quelle aventure que de réaliser nos thèses en même temps ! Merci pour ton soutien sans faille et ton aide précieuse sur LaTeX, en particulier durant les derniers moments tendus de rédaction de ce manuscrit !

Sommaire

Remerciements	iii
Table des figures	xi
Liste des tableaux	xix
Liste des abréviations	xxi
Glossaire	xxiii
Liste des publications et communications	xxv
1 Introduction générale	1
1.1 De l'importance écologique des microalgues	4
1.1.1 Définition et rôle écologique du phytoplancton	4
1.1.2 Origine et classification des microalgues	6
1.1.3 Contribution des microalgues aux cycles biogéochimiques	7
1.2 Méthodes de culture et valorisation des microalgues	10
1.2.1 Modes de culture et de production des microalgues	10
1.2.2 Microalgues : source de diversité pour diverses applications	15
1.3 Interactions microalgues-bactéries dans les systèmes marins	17
1.3.1 Nature des interactions	17
1.3.2 Mode d'action des interactions	21
1.3.3 Dynamique et spécificité des associations	22
1.3.4 Bilan et limites des analyses	23
1.4 Vitamine B ₁₂ et production primaire marine	25
1.4.1 Découverte	25
1.4.2 Structure et formes biologiquement actives de la vitamine B ₁₂	26
1.4.3 Biosynthèse de la vitamine B ₁₂	30
1.4.4 Répartition de l'auxotrophie pour la B ₁₂ dans le vivant	37
1.4.5 Enzymes B ₁₂ -dépendantes dans le vivant	39

1.4.6	Interventions métaboliques de la B ₁₂ chez les microalgues	43
1.4.7	Importance des métabolites issus de l'utilisation de la B ₁₂ chez les microalgues	47
1.4.8	Concentrations naturelles en vitamine B ₁₂ et limitation de la crois- sance des microalgues par la B ₁₂	50
1.4.9	Interactions microbiennes pour la vitamine B ₁₂ dans les systèmes marins	55
1.5	Présentation des haptophytes et du modèle d'étude : <i>Tisochrysis lutea</i>	58
1.5.1	Le phylum des <i>Haptophyta</i>	58
1.5.2	<i>Tisochrysis lutea</i> , espèce haptophyte modèle	60
1.6	Objectifs de la thèse	62
2	Auxotrophie pour la vitamine B₁₂ chez les Haptophytes : étude ciblée de l'effet de la disponibilité en vitamine B₁₂ sur la physiologie de <i>T. lutea</i>	65
2.1	Introduction	67
2.2	Matériel et Méthodes	69
2.2.1	Recherche de séquences homologues des gènes du métabolisme de la vitamine B ₁₂ chez <i>T. lutea</i> et les Haptophytes et étude de leur expression	69
2.2.2	Adaptation d'une méthode de dosage du quota de vitamine B ₁₂ chez <i>T. lutea</i>	70
2.2.3	Culture de <i>T. lutea</i> en batch et en chimostat limités en vitamine B ₁₂ .	74
2.2.4	Recherche de séquences homologues des gènes du métabolisme de la vitamine B ₁₂ chez <i>T. lutea</i>	77
2.3	Résultats et discussion	79
2.3.1	Répartition <i>in silico</i> de l'auxotrophie pour la vitamine B ₁₂ chez les microalgues haptophytes	79
2.3.2	Description d'une alternative à l'utilisation de la vitamine B ₁₂ chez <i>T. lutea</i>	79
2.3.3	Identification des gènes codant pour les protéines du cycle de la méthionine et les transporteurs de B ₁₂	83
2.3.4	Étude de la physiologie moléculaire de <i>T. lutea</i> à différents niveaux de limitation en vitamine B ₁₂	84

2.3.5	Mécanismes de régulation potentiels des gènes du métabolisme central d'utilisation de la vitamine B ₁₂	87
2.4	Conclusion	92
2.5	Article 1 : How haptophytes microalgae mitigate vitamin B ₁₂ limitation . . .	93
3	Effet d'une limitation en vitamine B₁₂ sur le métabolisme global de <i>T. lutea</i>	111
3.1	Introduction	113
3.2	Matériel et méthodes	114
3.2.1	Dosage des principaux métabolites	114
3.2.2	Analyses de protéomique comparative	115
3.3	Résultats et discussion	123
3.3.1	La limitation en vitamine B ₁₂ conduit a un réarrangement relativement faible du protéome de <i>T. lutea</i>	123
3.3.2	Recherche d'une protéine d'acquisition de la cobalamine	125
3.3.3	La synthèse de S-adenosyl méthionine semble importante pour la régulation physiologique en limitation en vitamine B ₁₂	128
3.3.4	Le catabolisme des protéines et acides aminés est réduit en limitation en B ₁₂	129
3.3.5	Une limitation en vitamine B ₁₂ conduit à la sous-accumulation des protéines liées à la remobilisation des squelettes carbonés	130
3.3.6	La vitamine B ₁₂ est potentiellement impliquée dans la régulation de la photosynthèse chez <i>T. lutea</i>	131
3.3.7	La limitation en vitamine B ₁₂ contraint fortement la synthèse de DMSP qui est remplacé par d'autres osmolytes azotés	132
3.4	Conclusion	138
3.5	Article 2 : B ₁₂ limitation affects global metabolism and DMSP production in the model haptophyte microalgae <i>Tisochrysis lutea</i>	141
4	Interactions microbiennes pour la vitamine B₁₂	163
4.1	Introduction	165
4.2	Matériel et méthodes	166
4.2.1	Recherche de bactéries productrices de vitamine B ₁₂ dans une communauté bactérienne associée à <i>T. lutea</i>	166

4.2.2	Criblage de souches bactériennes sur la base de leur production de vitamine	167
4.3	Résultats et discussion	171
4.3.1	Co-culture avec une communauté bactérienne	171
4.3.2	Sélection et caractérisation de souches bactériennes productrices de B ₁₂	173
4.3.3	Caractérisation des modes d'acquisition de la vitamine B ₁₂ par des co-cultures	179
4.3.4	Co-culture en chimostat avec <i>P. porticola</i>	182
4.4	Conclusion	186
4.5	Article 3 : Unravelling interactions between B ₁₂ -producing bacteria and the model haptophyte <i>Tisochrysis lutea</i> : the absence of B ₁₂ excretion prevents from mutualism in co-culture	190
5	Synthèse globale	209
5.1	Les Haptophytes seraient en majorité auxotrophes pour la vitamine B ₁₂ . . .	211
5.2	La substitution de l'apport en vitamine B ₁₂ par des bactéries n'est pas encore possible pour la culture à grande échelle de <i>T. lutea</i>	212
5.3	Un manque de vitamine B ₁₂ pourrait impacter la contribution globale des Haptophytes à la production primaire et au cycle du soufre	214
5.4	Notre étude suggère un lien entre la synthèse de DMSP par les Haptophytes et l'auxotrophie pour la vitamine B ₁₂	216
5.5	Proposition d'un modèle d'interactions microbiennes entre les Haptophytes et les procaryotes à travers la vitamine B ₁₂ et le DMSP	217
	Références bibliographiques	219
A	Méthodes de dosage de la vitamine B₁₂ et applications au phytoplancton	257
B	Recette du milieu de Conway	261

Table des figures

1.1	Représentation des réseaux microbiens, des consommateurs secondaires et tertiaires, ainsi que des phénomènes physico-chimiques régissant les interactions au sein de l'écosystème marin. MOD : matière organique dissoute ; MOP : matière organique particulaire. Modifié d'après Azam and Malfatti (2007) .	5
1.2	Arbre phylogénétique illustrant le répartition des taxons de microalgues (modifiée d'après Not et al. (2012)).	7
1.3	Illustration schématique de la théorie de l'endosymbiose chez les microalgues. Une endosymbiose primaire d'une cyanobactérie phototrophe par un hôte eucaryote hétérotrophe serait à l'origine de l'apparition des Chlorophytes, Glaucophytes et Rhodophytes. Puis, des phénomènes d'endosymbioses secondaires auraient conduit à l'apparition d'autres groupes taxonomiques. L'origine des chloroplastes des Cryptophytes et Haptophytes (en pointillés) est plus sujette à débat. Les phénomènes supposés d'endosymbiose sont représentés en encadrés pointillés et les groupes taxonomiques en encadrés pleins (modifiée et simplifiée d'après Keeling (2013)).	8
1.4	Représentation schématique d'une culture en batch. A) Évolution de la biomasse algale et de la quantité de substrat limitant en fonction du temps. <i>b</i> représente l'évolution de la biomasse microalgale, <i>s</i> l'évolution de la quantité de l'élément limitant dans la culture. 1), phase de latence ; 2), phase de croissance exponentielle ; 3), phase linéaire de croissance ; 4), phase stationnaire ; 5), phase de déclin. B) Évolution du taux de croissance (μ) de la culture en fonction du temps.	12

- 1.5 Représentation schématique d'une culture en chémostat. A) Évolution de la biomasse algale et de la quantité de substrat limitant en fonction du temps. b représente l'évolution de la biomasse microalgale, s l'évolution de la quantité de l'élément limitant dans la culture. B) Évolution du taux de croissance (μ) de la culture en fonction du temps et du taux de dilution (D) imposé au système. Les pointillés en rouge signifient que le début de culture est effectué en mode batch, la dilution du système (flèche verte) est effectuée lorsque la biomasse et le taux de croissance sont suffisants. 14
- 1.6 Représentation des diverses interactions biotiques possibles entre deux organismes. Cette figure illustre les interactions sous forme de paire avec trois résultats possibles : neutre (0), négatif (-) et positif (+) pour chacun des membres du duo d'organismes (modifié d'après Faust and Raes (2012)). . . 20
- 1.7 Maquette de la structure cristalline de la vitamine B₁₂ réalisée à partir des données de cristallographie rayons-X de Dorothy Hodgkin. Photographie libre de droits réalisée par le conseil d'administration du Museum des Sciences de Londres (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>). 27
- 1.8 Structure générale de la cobalamine et des ligands axiaux inférieurs (modifié d'après Helliwell et al. (2016)). 28
- 1.9 Schéma simplifié des voies de biosynthèse de la vitamine B₁₂ (modifié d'après Martens et al. (2002)). 31
- 1.10 Détails de la voie de biosynthèse aérobie de la vitamine B₁₂ (adénosylcobalamine). Les gènes sont représentés en italique. La séparation des gènes par une virgule indique que tous les gènes sont requis pour réaliser la réaction. La réaction où l'insertion du cobalt est effectuée est indiquée. 33
- 1.11 Détails de la voie de biosynthèse anaérobie de la vitamine B₁₂ (adénosylcobalamine). Les gènes sont représentés en italique. La séparation des gènes par une virgule indique que tous les gènes sont requis pour réaliser la réaction. La séparation des gènes par un slash indique que l'un ou l'autre des gènes peut réaliser la réaction. La réaction où l'insertion du cobalt est effectuée est indiquée. Le préfixe "Co" signifie que la molécule contient un noyau de cobalt. 34

1.12 Réactions d'interconversion des différentes formes de cobalamine dans la cellule d'après la base de données KEGG. Les codes enzymatiques sont notés entre parenthèses pour chaque réaction.	35
1.13 Réaction de la méthionine synthase cobalamine-dépendante et cycle de ré-activation de la molécule (modifié d'après Drummond et al. (1993) , Brown (2005) et Koutmos et al. (2009)).	42
1.14 Illustration schématique de l'implication de la vitamine B ₁₂ dans le métabolisme des microalgues. Hcyst : homocystéine, MAT : méthionine adénosyltransférase, Met : méthionine, MeTHF : méthyltétrahydrofolate, MMCM : méthylmalonyl-CoA mutase, RNR _{II} : ribonucléotides reductases de classe II, SAH : S-adénosylhomocystéine, SAHH : S-adénosylhomocystéine hydrolase, SAM : S-adénosylméthionine, THF : tétrahydrofolate.	46
1.15 Illustration schématique de l'implication de la B ₁₂ dans le métabolisme microalgal par le biais de la S-adenosyl méthionine (SAM).	49
1.16 Illustration de l'utilisation de l'haptonème pour la nutrition chez une microalgue haptophyte. (a-c) Les particules adhèrent à l'extrémité distale de l'haptonème, s'agrègent en région proximale puis sont de nouveau amenées en région distale. (d-f) Les particules sont amenées à l'extrémité de l'haptonème puis sont déposées à la surface cellulaire postérieure pour être internalisées par phagotrophie (modifié d'après Kawachi and Inouye (1995) ; Eikrem et al. (2016)).	58
1.17 Falaises calcaires d'Etretat (Normandie, France). Les stratifications sont le résultat de l'accumulation de couches de carbonates de calcium biogéniques. Image libre de droits.	60
1.18 Photographie en microscopie photonique d'une cellule de <i>Tisochrysis lutea</i> (grossissement x 500).	61
1.19 Illustration schématique des différentes thématiques de recherche de la thèse. Des approches moléculaires et biochimiques ont été utilisées afin de caractériser la plasticité physiologique de <i>T. lutea</i> à différents niveaux de disponibilité en vitamine B ₁₂ . D'autre part, des travaux ont été menés afin d'identifier les mécanismes d'obtention de la vitamine B ₁₂ par <i>T. lutea</i> via des interactions directes et indirectes avec des bactéries. C : carbone, N : azote.	63

2.1	Provenance géographique des échantillons de microalgues utilisés pour l'analyse de la répartition de la dépendance à la vitamine B ₁₂ chez les Haptophytes. Les points d'échantillonnage sont représentés en rouge. Certains échantillons n'ont pas de localisation géographique précise (voir Table supplémentaire 1 de l'article à la fin du chapitre).	69
2.2	Illustration de la méthode immunologique ELISA pour le dosage de la B ₁₂	71
2.3	Gamme de dosage du quota de B ₁₂ chez <i>T. lutea</i> à différentes concentrations cellulaires pour des échantillons à quota faible (A) et élevé (B). Les intervalles de confiance à 95 % des droites de régression sont représentés en gris.	73
2.4	Photographie de cultures de <i>T. lutea</i> cultivées en photobioréacteur de 5 L en mode chémostat limité à 40 ng/L de vitamine B ₁₂ . A) enceinte de culture disposant de quatre ports permettant l'évacuation du trop-plein à la surverse, B) un apport d'air filtré sur 0,22 µm, humidifié via le passage dans une bouteille d'eau distillée C). La valeur du pH est suivie par D) une sonde pH et sa régulation est assurée par l'ajout automatique de CO ₂ via l'arrivée d'oxygène B). La sonde de prélèvement de la culture est reliée à E) un système de prélèvement stérile. Un agitateur magnétique F) avec barreau aimanté permet l'homogénéisation de la culture et une rampe de 6 tubes fluorescents G) permet de contrôler l'éclairement.	75
2.5	Schéma représentant les points de prélèvement des cultures en mode chémostat. 1 : limitation ; 2 : réplétion ; 3 : déplétion ; SS1 à 3 : points de prélèvement à l'équilibre en limitation ; Sp1 et Sp24 : points de prélèvement une heure et 24 heures après spike respectivement.	76
2.6	Évolution du carbone particulaire en fonction du temps pour des cultures de <i>T. lutea</i> en mode chémostat limité en vitamine B ₁₂ (bleu) et en azote (noir). Les séries de données représentent les deux réplicats biologiques pour chaque condition. La flèche grise symbolise l'ajout de vitamine B ₁₂ ou d'azote dans les réacteurs limités en B ₁₂ et en azote respectivement.	77
2.7	Cinétique de croissance de cultures de <i>T. lutea</i> avec 40 ng/L cobalamine, ajout de 500 µg/L et 500 ng/L méthionine et sans cobalamine. Les valeurs sont des moyennes de D.O. 680 pour 6 réplicats biologiques et les barres d'erreur représentent les écarts-types.	81

2.8	Cinétique de croissance de cultures de <i>T. lutea</i> avec ajout de 500 µg/L de méthionine et différentes concentrations d'acide folique (FA) à 250, 500, 1000 et 2000 µg/L, ainsi que des témoins avec (40 ng/L) et sans cobalamine. Des cultures témoins méthionine + Tris ont également été réalisées. Les valeurs sont des moyennes de D.O. 680 pour 6 réplicats biologiques et les barres d'erreur représentent les écarts-types.	82
2.9	Représentation schématique de l'effet d'une limitation en cobalamine par rapport à une limitation azotée sur l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation, la conversion et le transport intracellulaire de la vitamine B ₁₂ chez <i>T. lutea</i> . Le gène <i>metK</i> encode la protéine MAT. Les flèches rouges représentent les gènes surexprimés, les flèches bleues les gènes sous-exprimés. Le signe égal vert signifie que le gène ne présente pas de différence de niveau d'expression aux conditions testées.	85
2.10	Représentation schématique de l'effet d'une limitation en vitamine B ₁₂ par rapport à une réplétion en vitamine B ₁₂ sur l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation, la conversion et le transport intracellulaire de la vitamine B ₁₂ chez <i>T. lutea</i>	86
2.11	Principe du fonctionnement d'un riboswitch en fin de transcription. À la fin de la transcription du gène par l'ARN polymérase, la liaison d'un ligand spécifique à l'aptamère (1 et 2) de l'ARN contrôle la formation d'une structure de terminaison en régulant la création d'une structure anti-terminateur (3 et 4). 1 : repli de l'aptamère, 2 : liaison du ligand dans l'aptamère, 3 : repli de la plateforme d'expression génique, 4 : ARN polymérase (modifié d'après Breaker (2012)).	88
2.12	Structure d'atténuation identifiée à l'aide de l'outil Riboswitch Explorer pour le gène <i>sahH</i> de <i>T. lutea</i>	90
2.13	Structures d'atténuation et riboswitch identifiés à l'aide des outils Riboswitch Explorer et Riboswitch Scanner pour le gène <i>cblA</i> de <i>T. lutea</i>	91
3.1	Méthodologie des analyses de protéomique comparative. Les encadrés verts représentent les logiciels utilisés. LC : chromatographie en phase liquide ; MS : spectrométrie de masse.	117

- 3.2 Photographie d'une migration sur gel SDS-PAGE 10 % pour les analyses de protéomique comparative. Les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie. M1 et M2 : marqueurs de taille (Bio-Rad 161-0373, les tailles de bandes en kDa sont affichées) ; S1-S8 : pistes des échantillons. 118
- 3.3 Principe du *peptide mass fingerprint* pour l'identification des protéines. Les protéines découpées sont séparées et ionisées par LC-MS. L'identification de la protéine entière sur la base du rapport m/z est impossible du fait d'autres protéines de séquences différentes pouvant partager le même m/z . Le découpage des protéines et leur passage en MS/MS permet d'obtenir des m/z précis avec empreinte d'une coupure spécifique de chaque séquence protéique. L'identification de la protéine est beaucoup plus fiable. . 119
- 3.4 Exemple de la quantification de 3 peptides de la même protéine dans six échantillons par Spectral Counting, Peak Counting et intégration des aires sous les pics (XIC) (source formation protéomique INRA) 120
- 3.5 Volcano plot représentant les protéines différentiellement accumulées pour (A) la condition limitation en vitamine B₁₂ vs limitation en azote ; (B) la condition limitation en B₁₂ vs réplétion en B₁₂. Les protéines sur-accumulées ($p < 0.05$ et fold > 2.0) sont représentées en rouge et les protéines sous-accumulées ($p < 0.05$ et fold < -2.0) sont représentées en bleu. 124
- 3.6 Taux de transport des électrons (ETR) (A) et quenching non photochimique (NPQ) (B) en fonction de l'intensité lumineuse chez *T. lutea* cultivée en condition de limitation en vitamine B₁₂ (bleu) ou de limitation en azote (noir). Les valeurs sont les moyennes de trois mesures pour les deux répliquats biologiques $\pm$ l'écart-type. 132
- 3.7 Représentation schématique de l'implication de la méthionine et de la SAM dans la synthèse du DMSP (basée sur les travaux de Gage et al. (1997) ; Stefels (2000)). 134
- 3.8 Barplot représentant l'allocation de la méthionine entre le DMSP (gris) et les protéines (bleu) chez la microalgue *Tisochrysis lutea* cultivée en condition de limitation en vitamine B₁₂ ou de limitation en azote. Les résultats en réplétion en B₁₂ sont similaires à ceux en limitation en vitamine. 136

- 3.9 Bilan du chapitre 3. La limitation en vitamine B₁₂ influence les métabolismes de la méthionine, le métabolisme central du carbone, la synthèse des protéines et la production d'osmolytes. Les flèches connectant deux composés désignent le sens de réaction et la production d'un composé. Les composés dont les concentrations varient avec la limitation en cobalamine par rapport à la limitation azotée sont encadrés. La couleur bleue désigne une diminution et la couleur rouge une augmentation. 139
- 4.1 Évolution de cultures de *T. lutea* avec une communauté bactérienne associée en fonction du temps, à différents niveaux de disponibilité de vitamine B₁₂. 172
- 4.2 Arbre phylogénétique des bactéries séquencées basé sur le gène de l'ARNr 16S avec des souches de référence. L'arbre a été réalisé par maximum de vraisemblance. Les valeurs de bootstrap sont indiquées aux nœuds et les valeurs supérieures à 50 % sont affichées. Les bactéries séquencées dans nos travaux sont présentées en bleu. 174
- 4.3 Arbre phylogénétique des bactéries séquencées basé sur le gène de l'ARNr 16S avec des souches de références des mêmes genres taxonomique. L'arbre a été réalisé par maximum de vraisemblance. Les valeurs de bootstrap sont indiquées aux nœuds et les valeurs supérieures à 50 % sont affichées. Les bactéries séquencées dans nos travaux sont présentées en bleu. 176
- 4.4 Identification des voies de biosynthèse de la vitamine B₁₂ pour A) *P. porticola* et B) *Halomonas* sp. 19-001. Les gènes identifiés par homologie dans les génomes sont représentés en vert. 177
- 4.5 Identification des voies de biosynthèse de la vitamine B₁₂ pour A) *Halomonas* sp. 09-003 et B) *Halomonas* sp. 09-027. Les gènes identifiés par homologie dans les génomes sont représentés en vert. 178
- 4.6 Arbre phylogénétique des bactéries séquencées basé sur le gène encodant une perméase BtuC permettant l'import de vitamine B₁₂ avec les séquences de référence décrites chez *E. coli*. L'arbre a été réalisé par maximum de vraisemblance (85 % des positions conservées soit 994). Les valeurs de bootstrap sont indiquées aux nœuds. Les bactéries séquencées dans nos travaux sont présentées en bleu. 179

- 4.7 Co-culture de *T. lutea* avec *P. porticola* en mode chimostat limité en vitamine B₁₂. L'évolution de la biomasse algale est représentée en orange, et celle de la biomasse bactérienne en vert. La flèche rouge symbolise l'inoculation des bactéries dans le photobioréacteur. 183
- 4.8 Photographie en microscopie photonique d'amas de la bactérie *P. porticola* en co-culture de *T. lutea* avec en mode chimostat limité en vitamine B₁₂. Les bactéries marquées en SYBR Green apparaissent en vert, la cellule de *T. lutea* apparaît en rouge du fait de l'autofluorescence de la chlorophylle. . 184
- 4.9 Bilan du chapitre 4. Nous n'avons pas observé de bactéries attachées à *T. lutea* ni de vésicules d'endocytose. Les populations de *T. lutea* et de bactéries associées n'ont pas montré de mortalité importante et soudaine, indiquant qu'il n'y avait pas de lyse cellulaire massive due à des signaux chimiques particuliers. Nous avons observé que *T. lutea* pouvait acquérir la vitamine B₁₂ par l'assimilation d'extrait bactérien riche en ce cofacteur, ce qui indique une capacité à assimiler de la vitamine dans du lysat bactérien. . . . 187
- 4.10 Bilan du chapitre 4. Nous proposons d'autres mécanismes potentiels d'acquisition de cette vitamine par certaines Haptophytes, qui sont 1) la phagotrophie de bactéries productrices de B₁₂ ; 2) une obtention opportuniste dans le cas d'interactions mutualistes de certaines microalgues avec des bactéries productrices de B₁₂ ; 3) des interactions avec des Archées productrices de cobalamine. 188

Liste des tableaux

1.1	Présentation des différentes vitamines du groupe B (Smith et al., 2007). . . .	26
1.2	Structure des différentes formes chimiques du groupe des cobalamines, en fonction des ligands axiaux supérieur et inférieur.	29
1.3	Genres bactériens communément utilisés dans l'industrie pour la production de vitamine B ₁₂ (d'après Martens et al. (2002) ; Croft et al. (2005)). . . .	35
1.4	Répartition de l'auxotrophie pour la vitamine B ₁₂ au sein du vivant.	38
1.5	Liste des enzymes dépendantes de la vitamine B ₁₂ et leur répartition dans le vivant.	40
1.6	Concentrations en vitamine B ₁₂ mesurées dans différents écosystèmes marins et méthodes de mesure associées. HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance ; LC-MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse ; UPLC : chromatographie en phase liquide à haute pression. Table modifiée et amendée d'après Sañudo-Wilhelmy et al. (2014).	53
2.1	Outils bioinformatiques utilisés pour l'identification de riboswitches chez <i>T. lutea</i>	89
3.1	Métabolites quantifiés et méthodes de dosage associées. Les détails des points méthodologiques sont développés dans le matériel et méthodes de l'article en fin de chapitre.	114
3.2	Protéines candidates de <i>T. lutea</i> présentant une faible identité avec la CBA1 de <i>P. tricornutum</i> (MI078987, seule séquence disponible dans les bases de données) et des différences d'accumulation cohérentes avec la limitation en cobalamine.	127
3.3	Protéines candidates de <i>T. lutea</i> potentiellement homologues d'un transporteur ABC de <i>E. huxleyi</i> (EOD16726.1) et présentant des différences d'accumulation cohérentes avec la limitation en cobalamine.	127

4.1 Paramètres des cultures de <i>T. lutea</i> avec un consortium bactérien avec et sans cobalamine.	171
A.1 Méthodes analytiques les plus couramment utilisées pour le dosage de la vitamine B ₁₂ dans le phytoplancton. HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance ; UPLC : chromatographie en phase liquide à haute pression ; MS : spectrométrie de masse ; ELISA : <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>	258
B.1 Solution d'éléments principaux.	261
B.2 Solution d'éléments métalliques.	261
B.3 Solution de vitamine B ₁	262
B.4 Solution de vitamine B ₁₂	262

Liste des abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AdoCbl : Adénosylcobalamine
- ADP : Adénosine diphosphate
- AMP : Adénosine monophosphate
- ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNm : Acide ribonucléique messager
- ATP : Adénosine triphosphate
- CNCbl : Cyanocobalamine
- DCM : *Deep chlorophyll maximum*
- DHA : Acide docosahexaénoïque
- DMB : Diméthylbenzimidazole
- DMS : Diméthylsulfure
- DMSP : Diméthylsulfoniopropionate
- ELISA : *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*
- Hcyst : Homocystéine
- HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
- MAT : Méthionine adénosyl transférase
- MeCbl : Méthylcobalamine
- Met : Méthionine
- MeTHF : 5-méthyl-tétrahydrofolate
- MMCM : Méthylmalonyl-CoA mutase
- NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

- NCBI : *National center for biotechnology information*
- OHCbl : Hydroxycobalamine
- PCR : *Polymerase chain reaction*
- RNR : Ribonucléotide réductase
- SAM : S-adenosyl méthionine = AdoMet
- SAH : S-adenosyl homocystéine = AdoHcyst
- SAHH : S-adenosyl homocystéine hydrolase
- SDA Acide stéridonique
- SDS-PAGE : *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*
- SM : Spectrométrie de masse
- THF : Tétrahydrofolate
- UPLC : Chromatographie en phase liquide à haute pression
- UTR : *Untranslated transcribed region*

Glossaire

- Autotrophe : Organisme qui ne nécessite pas d'apport externe d'un élément nutritif, soit parce qu'il n'en a pas besoin, soit parce qu'il peut le synthétiser lui-même
- Auxotrophe : Organisme qui nécessite un apport externe d'un élément nutritif qu'il ne peut pas synthétiser
- Hétérotrophe : Organisme qui se procure sa matière organique en la prélevant via des vésicules d'endocytose (phagotrophie) ou sous forme soluble via des transporteurs (osmotrophie)
- Mixotrophe : Organisme capable de se développer par autotrophie et par hétérotrophie
- Phototrophe : Organisme capable de produire sa source d'énergie à partir de lumière par photosynthèse ou grâce à des protéines telles que les bactériorhodopsines
- Phycosphère : zone autour de la cellule algale au sein de laquelle ont lieu les interactions biotiques

Liste des publications et communications

Publications dans des revues à comité de lecture

1. Nef, C., Jung, S., Mairet, F., Kaas, R., Grizeau, D. and Garnier, M. (2019). How haptophytes microalgae mitigate vitamin B₁₂ limitation. *Scientific Reports*. DOI : [10.1038/s41598-019-44797-w](https://doi.org/10.1038/s41598-019-44797-w)
2. Nef, C., Henry, C., Nicolau, E., Bérard, J.-B., Hervé, F., Caruana, A. M. N., Kaas, R., Mairet, F. and Garnier, M. B₁₂ limitation affects global metabolism and DMSP production in the model haptophyte microalgae *Tisochrysis lutea*. Version en cours de soumission dans *The ISME Journal*.
3. Nef, C., Dittami, S., Grizeau, D., Passerini, D., Kaas, R., Mairet, F., and Garnier, M. Unravelling interactions between B₁₂-producing bacteria and the model haptophyte *Tisochrysis lutea* : the absence of B₁₂ excretion prevents mutualism in co-culture. Manuscrit en rédaction pour soumission dans *Frontiers in Marine Science*.

Publications de jeux de données

1. Nef, C., Henry, C., Mairet, F. and Garnier, M. (2019). Proteome of *T. lutea* in B₁₂ and N limitation. *SEANOE*. DOI : [10.17882/62006](https://doi.org/10.17882/62006)

Communications lors de congrès internationaux et nationaux

1. Nef, C., Mairet, F., Kaas, R. and Garnier, M. How haptophytes microalgae manage vitamin B₁₂ limitation. European Phycological Congress. Août 2019, Zagreb, Croatie. Communication orale.
2. Nef, C., Mairet, F., Henry, C., Kaas, R. and Garnier, M.. Deciphering mechanisms of resource allocation in *Tisochrysis lutea*. Oceanext 2019. Juillet 2019, Nantes, France. Communication orale.

3. Nef, C. Interactions analysis between B₁₂-producing bacteria and *Tisochrysis lutea*. Journées Scientifiques de l'Université de Nantes. Juin 2018, Nantes, France. Communication orale.
4. Nef, C., Jung, S., Garnier, M., Nicolau, E., Bérard, J.-B., Lukomska, E., Mairet, F., Kaas, R., Grizeau, D. and Bougaran, G. Characterisation of *Tisochrysis lutea* metabolic response under B₁₂ limitation. Fourth Young Algaeneers Symposium. Mai 2018, Oban, Écosse. Communication orale.
5. Nef, C., Mairet, F., Kaas, R., Grizeau, D. and Garnier, M. Selection of B₁₂-producing bacteria for improvement of *Tisochrysis lutea* (Haptophyceae) cultures. International Society for Applied Phycology. Juin 2017, Nantes, France. Premier prix poster pour la session 2.
6. Nef, C., Garnier, M., Kaas, R., Grizeau, D. and Bougaran, G. Selection of cobalamin-producing bacteria for improvement of *Tisochrysis lutea* (Haptophyceae) cultures. Colloque annuel 2016 de la Société Phycologique de France. Mars 2017, Paris, France. Communication orale.

Autres communications

1. Nef, C., Mairet, F., Kaas, R., Grizeau, D. and Garnier, M. B₁₂ limitation in a model haptophyte microalgae. Journées Scientifiques de l'École Doctorale Sciences de la Mer et du Littoral. Février 2019, La Turballe, France. Poster.
2. Nef, C. Analyse des interactions entre une bactérie productrice de vitamine B₁₂ et la microalgue *Tisochrysis lutea*. Journées des Doctorants du Centre Atlantique IFREMER. Octobre 2017, Nantes, France. Oral.
3. Nef, C., Mairet, F., Kaas, R., Grizeau, D. and Garnier, M. Selection of B₁₂-producing bacteria for improvement of *Tisochrysis lutea* (Haptophyceae) cultures. Journées des Doctorants du Centre Atlantique IFREMER. Octobre 2017, Nantes, France. Poster.

Institutionnel et rayonnement

1. Participation à la Fête de la Science 2018. Octobre 2018, Nantes, France.
2. Co-organisatrice de la Journée des Doctorants du Centre Atlantique IFREMER. Octobre 2017, Nantes, France.

Chapitre 1

Introduction générale



Sommaire

1.1	De l'importance écologique des microalgues.	4
1.1.1	Définition et rôle écologique du phytoplancton	4
1.1.2	Origine et classification des microalgues	6
1.1.3	Contribution des microalgues aux cycles biogéochimiques . . .	7
1.2	Méthodes de culture et valorisation des microalgues	10
1.2.1	Modes de culture et de production des microalgues	10
1.2.2	Microalgues : source de diversité pour diverses applications . .	15
1.3	Interactions microalgues-bactéries dans les systèmes marins.	17
1.3.1	Nature des interactions	17
1.3.2	Mode d'action des interactions	21
1.3.3	Dynamique et spécificité des associations	22
1.3.4	Bilan et limites des analyses	23
1.4	Vitamine B ₁₂ et production primaire marine	25
1.4.1	Découverte	25
1.4.2	Structure et formes biologiquement actives de la vitamine B ₁₂ .	26
1.4.3	Biosynthèse de la vitamine B ₁₂	30
1.4.4	Répartition de l'auxotrophie pour la B ₁₂ dans le vivant	37
1.4.5	Enzymes B ₁₂ -dépendantes dans le vivant	39
1.4.6	Interventions métaboliques de la B ₁₂ chez les microalgues . . .	43
1.4.7	Importance des métabolites issus de l'utilisation de la B ₁₂ chez les microalgues.	47
1.4.8	Concentrations naturelles en vitamine B ₁₂ et limitation de la croissance des microalgues par la B ₁₂	50
1.4.9	Interactions microbiennes pour la vitamine B ₁₂ dans les sys- tèmes marins.	55
1.5	Présentation des haptophytes et du modèle d'étude : <i>Tisochrysis lutea</i> .	58
1.5.1	Le phylum des <i>Haptophyta</i>	58
1.5.2	<i>Tisochrysis lutea</i> , espèce haptophyte modèle	60
1.6	Objectifs de la thèse	62

1.1 De l'importance écologique des microalgues

1.1.1 Définition et rôle écologique du phytoplancton

Les océans recouvrent les deux tiers de la surface du globe et constituent un immense réservoir de biodiversité dont nous commençons à peine à comprendre l'importance écologique. Parmi les organismes habitant ces masses d'eau, le phytoplancton joue le rôle de producteur primaire. Cette production primaire marine consiste en la conversion du dioxyde de carbone (CO_2) en matière organique. Ce processus est réalisé par la conversion de l'énergie lumineuse solaire en énergie chimique par le biais de la photosynthèse. Cette dernière est réalisée dans la couche superficielle des masses d'eau où les rayonnements solaires ne sont pas complètement atténués, appelée "zone euphotique".

Le phytoplancton (du grec, *phyton*, plante ; et *planktos*, dérivant) rassemble deux grands groupes d'organismes. Il est constitué par les Cyanobactéries et les microalgues. Les Cyanobactéries sont des bactéries photosynthétiques qui auraient été les premiers organismes à réaliser la photosynthèse oxygénique sur la planète, ayant conduit à l'oxygénation de l'atmosphère et à l'évolution de la vie (Brocks et al., 1999). Les microalgues sont des organismes eucaryotes photosynthétiques microscopiques, la plupart du temps unicellulaires. Majoritairement aquatiques, les microalgues ont colonisé des milieux très divers allant des eaux douces, saumâtres, marines, aux zones nivales et sources chaudes, voire jusqu'à la croûte supérieure terrestre.

L'activité photosynthétique du phytoplancton représente, selon les études, 40 à 50 % de la production primaire à l'échelle planétaire, soit plus que la forêt Amazonienne, alors même que le phytoplancton ne représente que 1 % de la biomasse photosynthétique globale (Falkowski, 1994 ; Falkowski et al., 1998 ; Geider et al., 2001). La fixation du carbone par le phytoplancton est estimée entre 45 et 50 GT de carbone par an (Falkowski et al., 1998 ; Geider et al., 2001).

Au sein des écosystèmes marins le phytoplancton est la source primaire de matière organique et se situe donc à la base du réseau trophique. Les organismes situés aux niveaux trophiques supérieurs dépendent tous de manière directe ou indirecte du phytoplancton. Les bactéries marines hétérotrophes contribuent quant à elles au recyclage de la matière organique dissoute et rendent alors des composés inorganiques essentiels, tels que l'azote, le phosphore, le fer ou le carbone, de nouveau disponibles pour les mi-

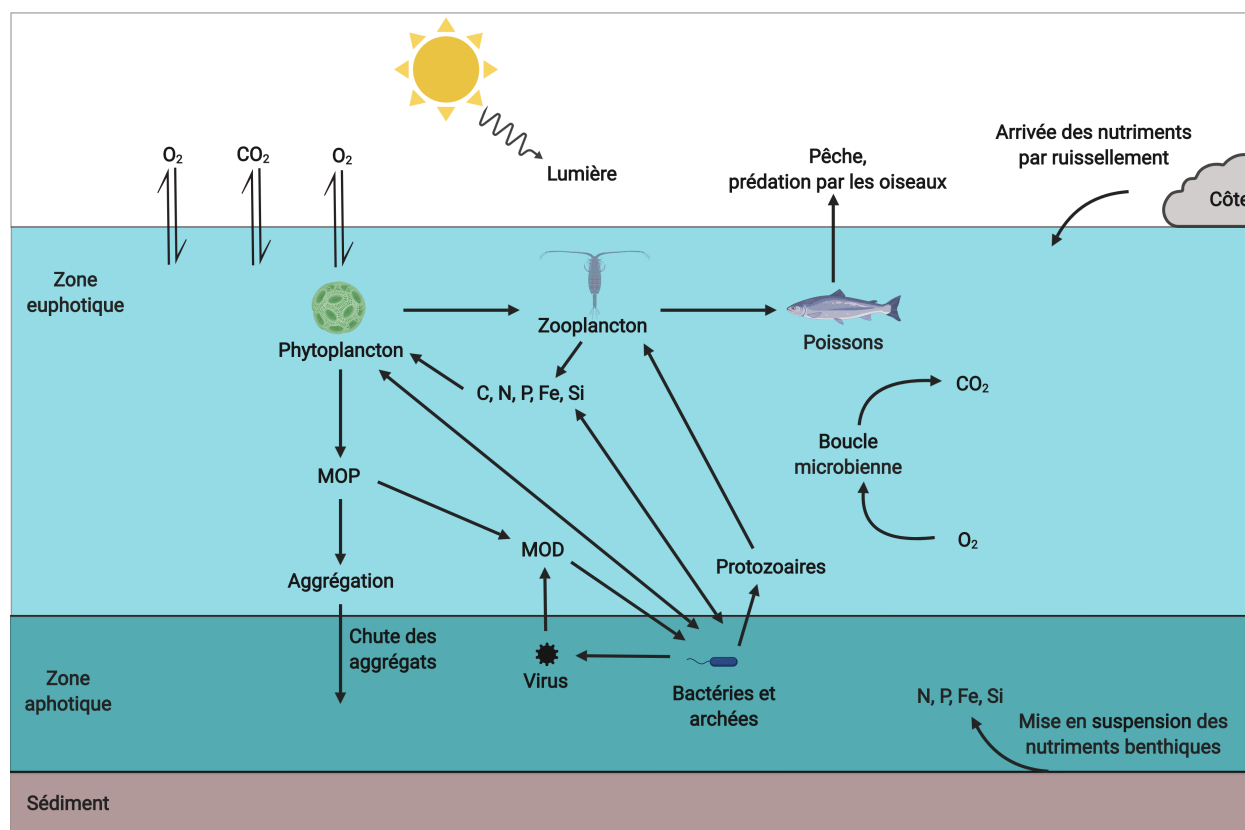


FIGURE 1.1 – Représentation des réseaux microbiens, des consommateurs secondaires et tertiaires, ainsi que des phénomènes physico-chimiques régissant les interactions au sein de l'écosystème marin. MOD : matière organique dissoute ; MOP : matière organique particulaire. Modifié d'après [Azam and Malfatti \(2007\)](#).

croalgues. Des échanges de matière ont donc lieu entre les taxons microbiens. Le zooplancton consomme le phytoplancton et est lui-même consommé par les poissons. Les mammifères et oiseaux marins, situés en haut du réseau trophique, consomment les poissons. La Figure 1.1 illustre schématiquement les interconnexions des réseaux biotiques microbiens marins et leur lien avec les niveaux trophiques supérieurs. Le phytoplancton joue donc un rôle écologique essentiel.

Des conditions environnementales favorables (ensoleillement, disponibilité des nutriments, température) peuvent conduire à la prolifération d'espèces de microalgues ou de Cyanobactéries qui atteignent des densités élevées pouvant être visibles à l'œil nu ([Landberg, 2002](#)). Ces épisodes dits d'efflorescence, ou "bloom" sont naturels mais peuvent avoir un impact néfaste sur les écosystèmes et la santé publique. Ces efflorescences nuisibles sont appelées "*Harmful Algal Blooms*". La nuisance peut être définie par différentes caractéristiques : la synthèse de toxines par des microorganismes conduisant à des intoxications directes pour les organismes marins et/ou les humains, la synthèse de toxines

s'accumulant dans les réseaux trophiques et pouvant provoquer des épisodes d'intoxication chez le consommateur, comme par exemple la consommation de mollusques ou de poissons, la prolifération de microorganismes non toxiques mais pouvant nuire aux organismes des niveaux trophiques supérieurs par réduction de la quantité d'oxygène dissous (hypoxie ou anoxie) (Landsberg, 2002 ; Deeds et al., 2008 ; Hallegraeff, 2010 ; Hinder et al., 2011 ; Caruana and Amzil, 2018).

1.1.2 Origine et classification des microalgues

Le terme "microalgues" n'a pas de sens en taxonomie car ce groupe est polyphylétique (Figure 1.2). L'origine des grands taxons de microalgues et, par extension, de tous les végétaux est expliquée par la théorie de l'endosymbiose, basée sur l'étude des chloroplastes. Ce terme désigne le phénomène par lequel, il y a environ 1,2 à 1,8 milliard d'années, un organisme cyanobactérien aurait été phagocyté puis conservé sous la forme de chloroplaste par un eucaryote hétérotrophe, lui permettant de réaliser la photosynthèse (endosymbiose primaire) (Mereschkowsky, 1910 ; Margulis, 1975 ; Gould et al., 2008 ; Parfrey et al., 2011 ; Gould, 2012). Des phénomènes de transfert de gènes de l'organisme endosymbiotique à son hôte ont accompagné ces événements, dont les traces sont détectables chez les microalgues actuelles (Keeling et al., 2005 ; Not et al., 2012). L'endosymbiose primaire aurait donné naissance au cours de l'évolution aux Chlorophytes (lignée verte), Rhodophytes (lignée rouge) et aux Glaucophytes (Figure 1.3). Des événements d'endosymbioses secondaires, caractérisés par la phagocytose de Chlorophytes et de Rhodophytes par des eucaryotes hétérotrophes, auraient conduit à l'apparition des Chlorarachniophytes, Euglénophytes, Cryptophytes, Dinophytes, Haptophytes et Straménopiles (Figure 1.3) (Gould, 2012 ; Keeling, 2013). Des endosymbioses tertiaires auraient également eu lieu. Cette complexité évolutive serait à l'origine de la grande diversité des taxons de microalgues. Les principaux taxons de microalgues contribuant à la production primaire océanique actuelle sont les Diatomées, les Dinoflagellés, les Prasinophytes et les Haptophytes (Not et al., 2012).

Environ 5000 espèces de microalgues sont décrites sur des critères morphologiques, bien que ce nombre soit débattu et reconnu comme sous-estimant largement la diversité spécifique des microalgues (Simon et al., 2009). Le nombre réel d'espèces de microalgues est estimé entre 70 000 et 150 000 et les estimations hautes prévoient jusqu'à 1 million d'espèces (de Vargas et al., 2015). Les critères morphologiques se révèlent généralement

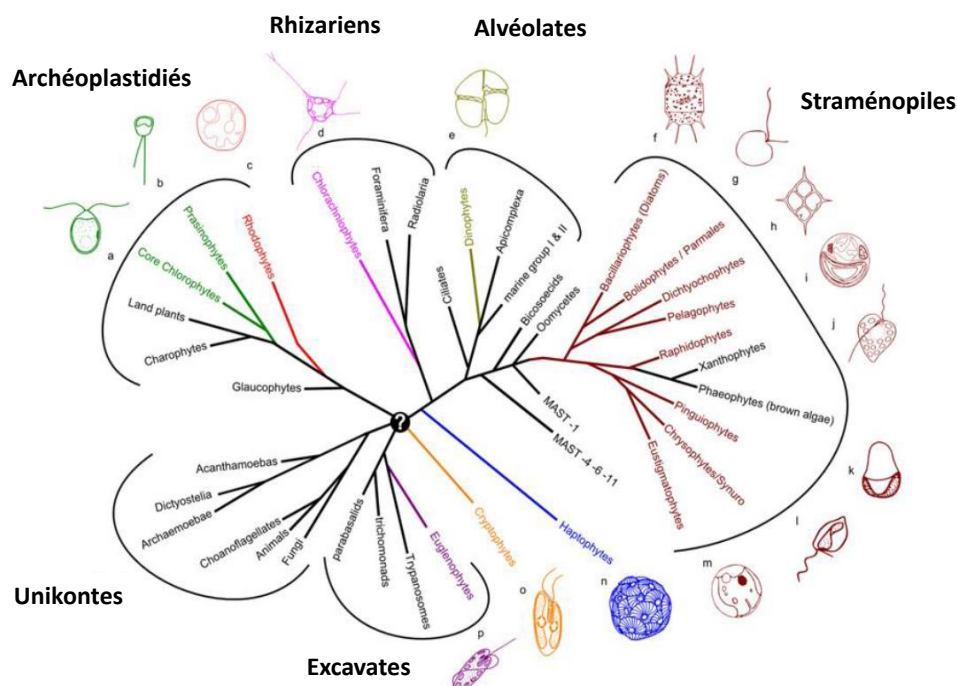


FIGURE 1.2 – Arbre phylogénétique illustrant le répartition des taxons de microalgues (modifiée d'après [Not et al. \(2012\)](#)).

insuffisants pour différencier des espèces cryptiques. L'utilisation combinée de méthodes moléculaires et de caractéristiques morphologiques permet de pallier en partie les difficultés d'identification des taxons. Les méthodes de metabarcoding pourraient permettre de faire des progrès dans l'identification des espèces encore non cultivables ([Bik et al., 2012](#)).

1.1.3 Contribution des microalgues aux cycles biogéochimiques

Les microalgues contribuent également de façon importante aux cycles biogéochimiques du fait de leur consommation de nutriments inorganiques qu'elles transforment en composés organiques. Ces organismes nécessitent de la lumière, des éléments minéraux (carbone, azote, phosphore, silice), métalliques (fer, cuivre, zinc) et des vitamines pour se développer. Ces ressources sont acquises sous forme dissoute dans le milieu environnant. Selon les besoins des espèces, la disponibilité des nutriments et leurs ratios, des phénomènes de compétition pour l'accès aux ressources peuvent avoir lieu, aboutissant à une succession des espèces ([Tilman et al., 1982](#)). Les microalgues utilisent le carbone inorganique (CO_2) pour construire leur matière organique par la photosynthèse oxygénique. La matière organique est ensuite minéralisée ou respirée et une partie est séquestrée en profondeur dans les fonds océaniques. Cette pompe biologique du carbone est essentielle

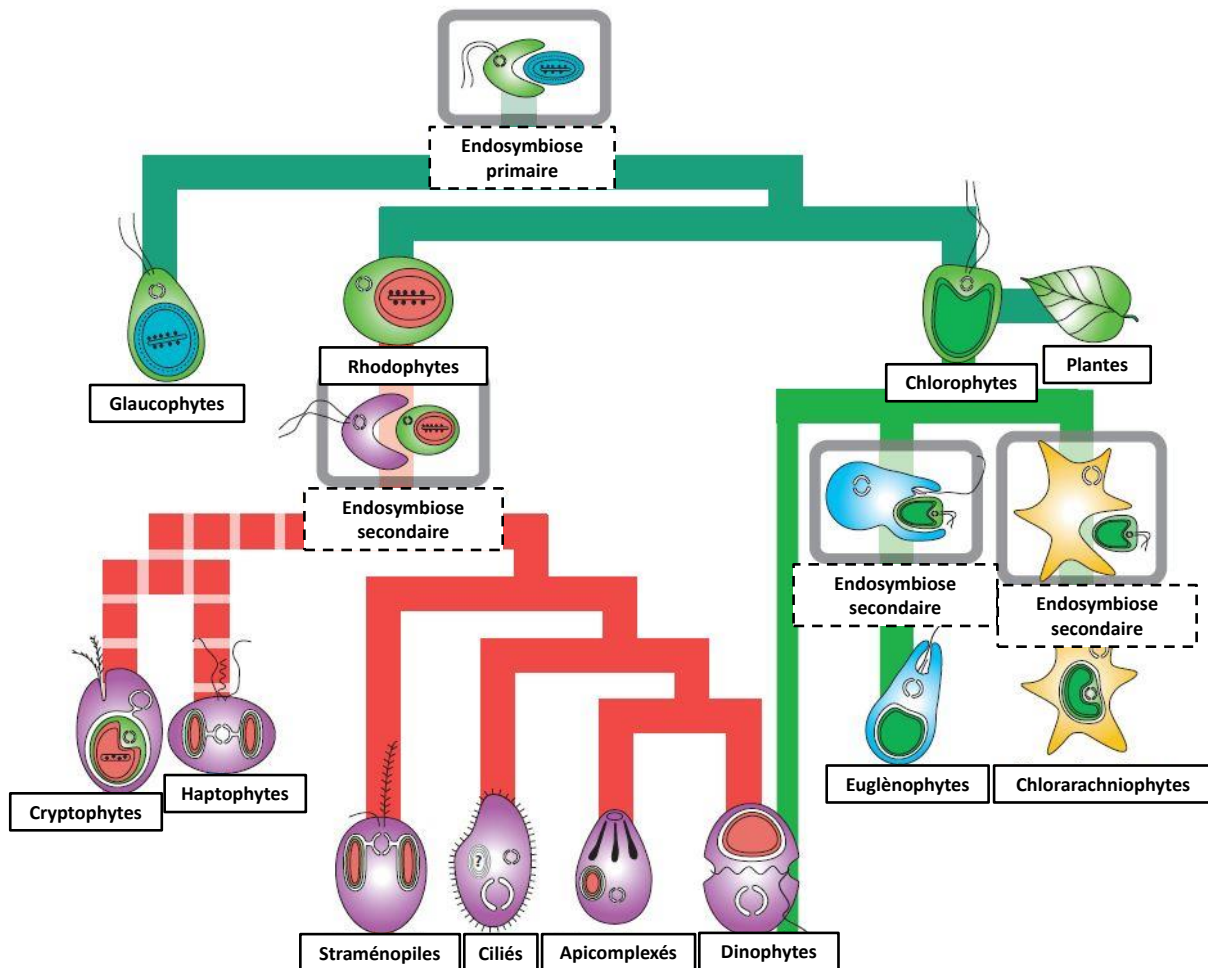


FIGURE 1.3 – Illustration schématisée de la théorie de l'endosymbiose chez les microalgues. Une endosymbiose primaire d'une cyanobactérie phototrophe par un hôte eucaryote hétérotrophe serait à l'origine de l'apparition des Chlorophytes, Glaucophytes et Rhodophytes. Puis, des phénomènes d'endosymbioses secondaires auraient conduit à l'apparition d'autres groupes taxonomiques. L'origine des chloroplastes des Cryptophytes et Haptophytes (en pointillés) est plus sujette à débat. Les phénomènes supposés d'endosymbiose sont représentés en encadrés pointillés et les groupes taxonomiques en encadrés pleins (modifiée et simplifiée d'après [Keeling \(2013\)](#)).

dans la régulation de la concentration du CO_2 atmosphérique (Falkowski et al., 1998 ; Falkowski, 2002). Les phénomènes de circulation océanique et de mélange vertical rendent de nouveau disponibles les éléments minéraux pour les producteurs primaires. Aussi, les Coccolithophores, des Haptophytes formant des coccolithes, sont supposées être responsables de la moitié des précipitations de carbonates de calcium dans les systèmes marins (Milliman, 1993). Les microalgues sont aussi impliquées dans le cycle de l'azote, principalement disponible dans le milieu marin sous forme de N_2 , qui ne peut être fixé dans la biomasse que par certains organismes, tels que des Cyanobactéries, par le phénomène de diazotrophie. Les microalgues peuvent assimiler les nitrates (NO_3), les nitrites (NO_2) et l'ammonium (NH_4) pour la synthèse des protéines, acides nucléiques et acides aminés (Corner and Davies, 1971 ; Masclaux-Daubresse et al., 2010). Ces microorganismes participent aussi au cycle du phosphore du fait de leur capacité d'assimilation du phosphore inorganique sous la forme de phosphates (PO_4) pour la synthèse de polymères d'orthophosphate granulaires, les polyphosphates (Eixler et al., 2005), les acides nucléiques, les métabolites énergétiques (ATP, ADP, AMP, NADP) et les lipides membranaires.

La contribution des microalgues dans le cycle du soufre est due en majorité à l'activité biologique des Dinoflagellés et des Haptophytes, qui sont parmi les principaux producteurs du diméthylsulfoniopropionate (DMSP) (Keller, 1989 ; Matrai and Keller, 1994 ; Keller et al., 1999 ; Malin and Steinke, 2004 ; Franklin et al., 2010), un composé soufré qui, lorsqu'il est relargué dans l'environnement par la lyse ou l'excrétion, peut être clivé en diméthylsulfure (DMS) par l'activité biologique de certains organismes. Le DMSP peut également être converti en DMS lors du passage par l'interface air-eau. Le DMS est ensuite oxydé dans l'atmosphère en divers composés tel que l'acide sulfurique, un agent de condensation des nuages. C'est en 1972 que Lovelock a proposé que la production de DMS par les microalgues permettait de fermer le budget global du cycle du soufre (Lovelock et al., 1972). Il a par la suite été montré que la production de DMS conduisait à une modification de l'albédo des nuages et pourrait avoir un impact sur la régulation climatique (Charlson et al., 1987). Enfin, les Diatomées nécessitent du silicium pour la synthèse de leur frustule, l'exosquelette plus ou moins orné protégeant les cellules. Comme ces organismes comptent parmi les groupes majoritaires du phytoplancton eucaryote (Not et al., 2012), leur contribution au cycle du silicium peut être plus ou moins importante localement en fonction de leurs besoins en cet élément et de leur biomasse. La contribution des microalgues aux réseaux trophiques et aux cycles biogéochimiques font

de ces microorganismes des maillons essentiels des écosystèmes.

1.2 Méthodes de culture et valorisation des microalgues

1.2.1 Modes de culture et de production des microalgues

L'étude des microalgues peut passer par leur culture en conditions plus ou moins contrôlées, en particulier en ce qui concerne l'analyse de l'effet des facteurs abiotiques (indépendants du *biota*) sur leur physiologie. Les études d'écophysiologie se basent le plus souvent sur une approche réductionniste : c'est-à-dire l'analyse de l'effet d'un petit nombre de facteurs, généralement un ou deux que nous essayons de contrôler le mieux possible, sur la physiologie de l'organisme. Il existe différents modes de culture des microalgues, tels que le mode discontinu, le mode semi-continu et le mode continu. Dans le mode discontinu (séquentiel ou batch), la totalité des éléments requis pour la croissance des microalgues sont apportés lors de l'ensemencement de la culture. Ce mode de culture est aisé et rapide à mettre en place. La biomasse est le plus souvent récoltée à la fin du développement de la culture, lorsqu'il y a épuisement de l'élément limitant. Le mode de culture semi-continu, ou *fed-batch*, est caractérisé par l'ajout de nutriments au cours de la culture. La biomasse peut être récoltée partiellement à intervalles réguliers puis la culture est diluée de nouveau avec le même milieu nutritif. La revue de [Cadoret et al. \(2014\)](#) précise que ce mode de culture permet d'atteindre des niveaux de productivité élevés, en particulier pour les espèces hétérotrophes. Le mode de culture continu est caractérisé quant à lui par un apport permanent de milieu nutritif dans les enceintes de culture. Dans une enceinte de volume constant, le débit en sortie (surverse) est égal à celui en entrée. Ce mode permet une récolte en continu de la biomasse. Les cultures continues peuvent permettre à la population cellulaire d'atteindre un état d'équilibre.

Les deux principaux modes de culture en continu sont le chimostat et le turbidostat. Dans le chimostat, le débit de la pompe apportant le milieu nutritif est fixé, imposant un taux de croissance spécifique à la culture et donc une biomasse particulière dépendante de la concentration de l'élément limitant dans l'alimentation. Pour le turbidostat, la valeur de biomasse à atteindre est fixée par un système de mesure, la plupart du temps optique. Lorsque la valeur de biomasse dépasse la consigne, la culture est diluée.

La revue bibliographique de [Cadoret et al. \(2014\)](#) subdivise les systèmes de produc-

tion industriels en deux catégories : les systèmes de culture ouverts, tels que les bassins, et les systèmes fermés, tels que les poches et les photobioréacteurs. Les bassins de production présentent des coûts plus faibles mais une productivité moindre et des risques de contamination élevés. À l'inverse, les photobioréacteurs représentent un moyen contrôlé de production, permettant en particulier un contrôle fin de la lumière, un facteur clé de production. Ces systèmes présentent l'avantage de pouvoir être aseptisés, mais leur coût de production est élevé. La majorité des systèmes de production de microalgues sont effectués en séquentiel en bassins.

Les modes de culture discontinue et le continu en chimostat ont été utilisés lors de cette thèse. Les détails de ces méthodes sont décrits dans les sections suivantes.

Culture en mode discontinu

La culture des microorganismes en mode discontinu suit une cinétique particulière, pour laquelle plusieurs phases de développement de la population ont été décrites par [Buchanan \(1918\)](#) pour des bactéries. Les phases de développement basées sur l'exemple de cultures limitées en un élément nutritif sont les suivantes (Figure 1.4) :

1. Phase de latence plus ou moins longue, les organismes s'acclimatent aux conditions écophysologiques et acquièrent les nutriments
2. Phase de croissance exponentielle où le taux de division cellulaire tend vers un maximum (μ_{max}), c'est une croissance équilibrée où les contraintes de l'environnement ne sont pas limitantes
3. Phase de croissance linéaire où la diminution de la disponibilité du substrat limitant conduit à une réduction du taux de croissance
4. En phase stationnaire, l'absence totale du substrat limitant, ou *carence*, conduit à l'arrêt de la multiplication cellulaire ($\mu = 0$)
5. La phase de déclin se traduit par l'augmentation de la mortalité cellulaire

La notion de carence en un élément nutritif se réfère donc à son absence totale dans le milieu de culture. La carence en élément limitant a lieu lors de la phase stationnaire des cultures discontinues, si la lumière n'est pas limitante. La diminution du taux de croissance en phase de croissance linéaire puis en stationnaire peut néanmoins induire des processus cellulaires impactant de nombreuses voies métaboliques conduisant à des

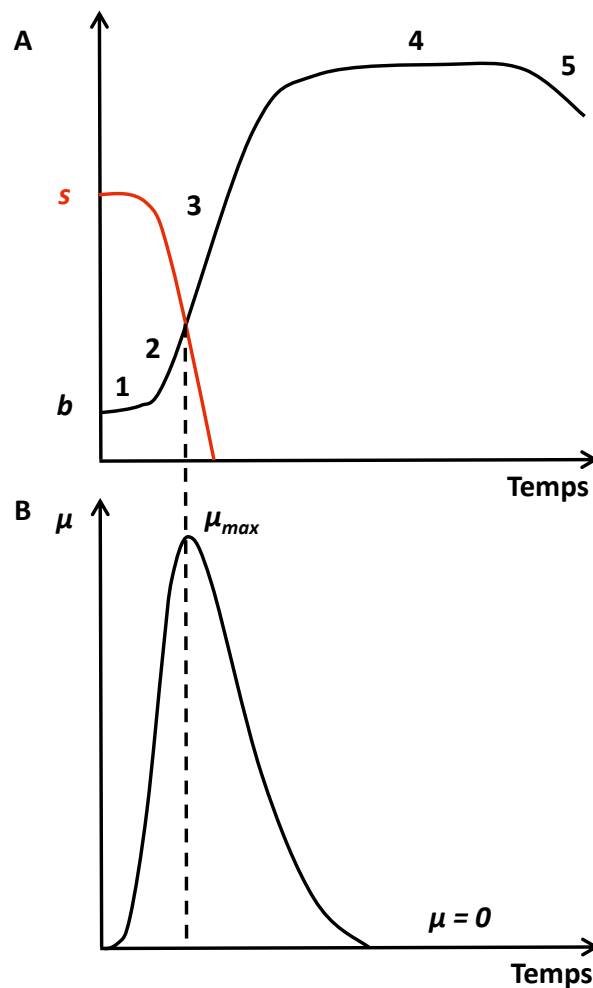


FIGURE 1.4 – Représentation schématique d'une culture en batch. A) Évolution de la biomasse algale et de la quantité de substrat limitant en fonction du temps. b représente l'évolution de la biomasse microalgale, s l'évolution de la quantité de l'élément limitant dans la culture. 1), phase de latence ; 2), phase de croissance exponentielle ; 3), phase linéaire de croissance ; 4), phase stationnaire ; 5), phase de déclin. B) Évolution du taux de croissance (μ) de la culture en fonction du temps.

résultats non reproductibles et n'ayant pas forcément de lien spécifique avec le facteur étudié (Bull, 2010).

Culture en mode continu en chémostat

Jannash (1967) propose trois critères pour caractériser une culture continue en mode chémostat : une limitation par un seul facteur, des conditions de développement cellulaire constantes (taux de dilution, volume, conditions physico-chimiques) et un mélange homogène. Lors d'une culture en mode continu en chémostat, la population microalgale évolue après ensemencement jusqu'à se stabiliser. La composition du milieu de renouvellement impose la limitation par un élément limitant. L'élément est dit limitant lorsque l'arrêt de la croissance cellulaire est dû à l'épuisement de l'élément. Le taux de dilution impose le niveau de limitation. À l'inverse du discontinu, l'état stable du chémostat est caractérisé par un taux de croissance non-nul, égal au taux de dilution imposé au système, appelé état d'équilibre : c'est une croissance équilibrée limitée (Figure 1.5). La limitation est l'atteinte d'un état d'équilibre en culture continue où la quantité de biomasse dépendra de la concentration en élément limitant. Les perturbations de l'état d'équilibre, comme par exemple un ajout discret de l'élément limitant, influencent le taux de croissance de la population et permettent le suivi de mécanismes d'acquisition et de déplétion dudit élément. Les travaux de Droop (1974) se sont basés sur des cultures de microalgues en mode continu pour établir que la vitesse de croissance d'une population de microalgues est fonction du quota interne de l'élément limitant la culture, et non pas de sa concentration dans le milieu externe. Ce type de culture est particulièrement intéressant pour les études d'écophysiologie, car il permet d'échantillonner avec une grande reproductibilité une biomasse de qualité constante (Hoskisson and Hobbs, 2005 ; Bull, 2010). Les deux modes de cultures en batch et en chémostat sont complémentaires.

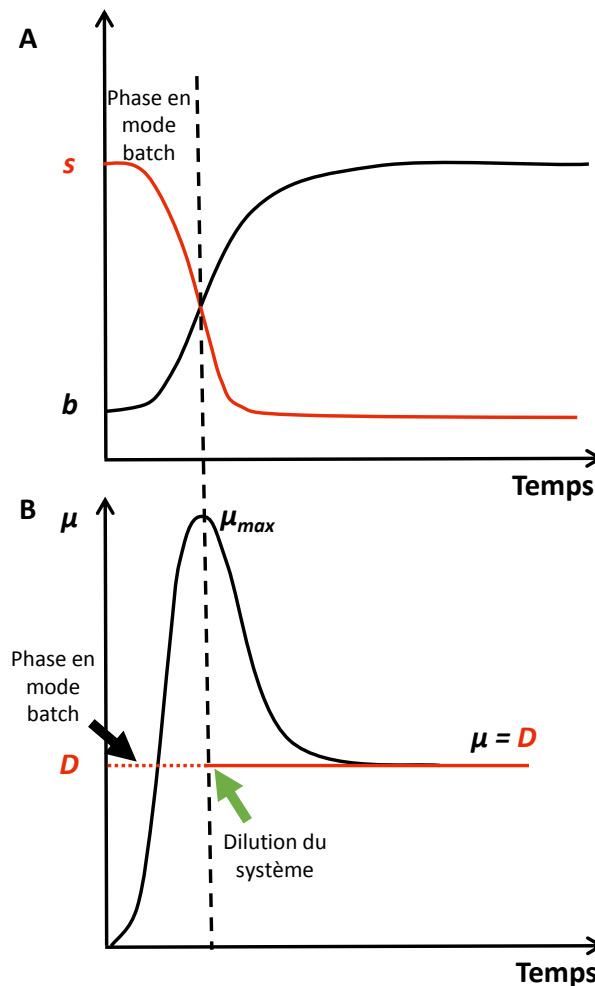


FIGURE 1.5 – Représentation schématique d’une culture en chémostat. A) Évolution de la biomasse algale et de la quantité de substrat limitant en fonction du temps. b représente l’évolution de la biomasse microalgale, s l’évolution de la quantité de l’élément limitant dans la culture. B) Évolution du taux de croissance (μ) de la culture en fonction du temps et du taux de dilution (D) imposé au système. Les pointillés en rouge signifient que le début de culture est effectué en mode batch, la dilution du système (flèche verte) est effectuée lorsque la biomasse et le taux de croissance sont suffisants.

1.2.2 Microalgues : source de diversité pour diverses applications

Au-delà de leur rôle écologique essentiel, la grande diversité des microalgues représente un réservoir de potentialités biologiques pour des applications biotechnologiques diverses. Cette section présente brièvement les différents domaines de valorisation des produits issus de microalgues. Les microalgues sont utilisées pour l'alimentation humaine en tant que compléments alimentaires, de par leur composition en protéines, acides aminés, lipides et leurs propriétés anti-oxydantes. L'acide docosahéxaénoïque (DHA), par exemple, entre dans la composition de certains laits infantiles (Barclay and Abril, 1994). En France, neuf espèces de microalgues sont autorisées par l'ANSES (saisie numéro 2017-SA-0086) pour la consommation humaine, principalement sous la forme de produits dérivés : *Auxenochlorella protothecoides*, *A. pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *C. sorokiniana*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Odontella aurita*, *Parachlorella kessleri* et *Scenedesmus vacuolatus*. L'ANSES a également autorisé la commercialisation pour consommation d'une cyanobactérie, *Arthrospira platensis*, communément appelée "spiruline", riche en protéines et en oligo-éléments.

Le domaine de l'aquaculture requiert aussi des microalgues comme source alimentaire pour nourrir les larves de crevettes, les juvéniles de poissons et mollusques bivalves (Muller-Feuga, 2000). La recherche de molécules antimicrobiennes et fongicides d'origine microalgale pour limiter le développement des pathogènes en aquaculture est aussi un secteur en développement (Falaise et al., 2016).

Les activités biologiques associées aux molécules à valeur médicinale des microalgues sont diverses. Les principales activités recensées sont les effets anti-inflammatoire, anti-oxydant, antimutagène et antiprolifératifs des pigments (Picot et al., 2009 ; Gagez et al., 2012 ; Mimouni et al., 2012), les effets hypocholestérolémiants des acides gras poly-insaturés (Mimouni et al., 2012) et enfin les effets antimicrobiens et antiviraux (Borowitzka, 1995 ; Falaise et al., 2016). La production de biomasses algales est aussi étudiée pour la valorisation sous forme d'algocarburants ou de biogaz. L'énergie obtenue par l'utilisation de métabolites issus de microalgues serait propre, renouvelable, non toxique et n'entrerait pas en compétition avec l'occupation des terres arables pour l'agriculture (Brune et al., 2009 ; Islam et al., 2017). Néanmoins, des verrous demeurent quant à la viabilité économique des systèmes de production et de récolte actuels, loin d'être compétitifs face aux prix du pétrole (Islam et al., 2017). De par leur capacité d'absorption de l'azote et du

phosphore, les microalgues peuvent être appliquée pour le traitement des eaux issues des zones urbanisées (Renuka et al., 2015) et des effluents d'élevage (Godos et al., 2009), où l'azote et le phosphore sont souvent en excès. La culture de microalgues pour la décontamination des milieux pollués par des métaux fait également l'objet de recherches (Wilde and Benemann, 1993).

Cette section a présenté les points clés de l'importance écologique des microalgues, leurs principaux modes de culture ainsi que leurs applications. Dans la section suivante, nous ciblerons les interactions entre microalgues et bactéries dans l'environnement marin, objet d'étude principal de cette thèse.

1.3 Interactions microalgues-bactéries dans les systèmes marins

Dans la zone euphotique des écosystèmes marins et d'eau douce, la quantité de biomasse des bactéries hétérotrophes et leur activité biologique a été à de nombreuses reprises corrélée à l'abondance des microalgues et des Cyanobactéries (Bell and Mitchell, 1972 ; Cole, 1982 ; Bird and Kalff, 1984 ; Cole et al., 1988). Les bactéries hétérotrophes consomment de la matière organique, qui, en système oligotrophe, est le plus souvent issue de l'excrétion par les microalgues (Bell and Mitchell, 1972 ; Wiebe and Smith, 1977 ; Cole et al., 1982).

Bell and Mitchell (1972) ont proposé le concept de phycosphère pour désigner la zone autour de la cellule algale où les microorganismes sont influencés par les produits issus de l'activité des algues. Cole et al. (1982) ont par la suite étendu la définition aux Cyanobactéries qui, bien que procaryotes, possèdent des caractéristiques microalgales de part leur capacité à réaliser la photosynthèse oxygénique. La phycosphère est caractérisée par un environnement chimique altéré par rapport au milieu, où les niveaux d'oxygène et de pH sont modifiés et où des composés organiques sont excrétés par les algues et Cyanobactéries et forment un gradient favorisant certaines communautés bactériennes au détriment d'autres (Bell and Mitchell, 1972 ; Seymour et al., 2017). Ces caractéristiques sont pour la plupart similaires avec la rhizosphère des végétaux terrestres (Seymour et al., 2017). La phycosphère est donc un microenvironnement complexe au sein duquel une grande diversité d'interactions et d'échanges de matière se produisent. Cette partie présente les différentes catégories d'interactions entre microalgues et bactéries, leurs modes d'action et leurs dynamiques.

1.3.1 Nature des interactions

L'interaction signifie étymologiquement une influence ou une action réciproque entre plusieurs organismes. Par souci de simplification et pour rester cohérents avec la littérature, nous considérerons que le terme interaction se réfère à l'influence d'un organisme sur un autre, de façon réciproque ou non.

Les interactions entre microalgues et bactéries sont multiples et peuvent affecter positivement ou négativement les organismes. Les différentes interactions biotiques possibles

pour un duo d'organismes et leurs conséquences sont résumées dans la Figure 1.6 et des exemples tirés de la littérature sont décrits dans les sections suivantes.

Mutualisme Le mutualisme désigne une interaction au sein de laquelle chaque organisme retire un avantage (Figure 1.6). L'échange de nutriments est considéré comme une interaction mutualiste courante entre bactéries et microalgues et consiste le plus souvent en un relargage par l'algue de produits issus de la photosynthèse sous forme de matière organique (Kouzuma and Watanabe, 2015). Celle-ci pourra être utilisée par les bactéries hétérotrophes en tant que source de nutriments ; les cellules d'algues mortes peuvent également être considérées comme un substrat. Les bactéries peuvent en retour minéraliser cette matière organique en matière inorganique de nouveau disponible pour les algues.

Une relation mutualiste d'échange réciproque de nutriments a été décrite entre des bactéries du genre *Alteromonas* et la Chlorophyte *Dunaliella salina* lors de cultures discontinues limitées en azote (Le Chevanton et al., 2013). Les auteurs ont observé que la microalgue excréta du carbone et de l'azote organiques, assimilés par la bactérie et recyclés en azote inorganique, permettant en retour la croissance de la microalgue. Un autre exemple est celui de la Diatomée *Pseudo-nitzschia multiseries*, dont la croissance est favorisée par l'acide indole-3-acétique, une hormone excrétée par une bactérie associée du genre *Sulfitobacter* qui consomme du tryptophane excrété par la microalgue (Amin et al., 2015).

Commensalisme Le commensalisme est une interaction bénéfique pour un des deux organismes (Figure 1.6). Certaines espèces de bactéries n'influencent pas directement les microalgues auxquelles elles sont associées, on parle alors de neutralisme. En revanche, ces bactéries peuvent avoir une activité biologique permettant de réduire la mortalité des algues. Ce phénomène a été observé lors de l'étude de Sison-Mangus et al. (2014), durant laquelle les bactéries associées à des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* inhibaient la croissance d'autres bactéries synthétisant des composés algicides, dans une interaction commensale.

Parasitisme et prédation Le parasitisme et la prédation sont des relations dans lesquelles un organisme tire profit d'un autre, qui est habituellement lésé (Figure 1.6). Le parasitisme peut comprendre l'installation dans une cellule hôte. La frontière entre prédation et parasitisme est étroite, car le parasite peut coexister avec son hôte jusqu'à un

certain point et peut atteindre un niveau où l'hôte devient pathogène, conduisant à la destruction de l'hôte.

Les relations microalgues-bactéries peuvent s'inscrire dans un contexte trophique de prédation, où les microalgues peuvent consommer les bactéries dans une relation de type proie/prédateur (Figure 1.6). Unrein et al. (2014) ont par exemple suivi l'évolution de populations de bactéries marquées par un marqueur fluorescent et leur consommation par des Chlorophytes, Cryptophytes, Dinoflagellés et Haptophytes. Leurs résultats ont mis en évidence une consommation élevée des bactéries par les Haptophytes, leur permettant d'acquérir jusqu'à environ 7 % de leur carbone cellulaire par jour.

Amensalisme L'amensalisme caractérise une interaction où une espèce a une influence négative sur une autre (Figure 1.6). Ce type d'interaction peut par exemple faire référence à l'excrétion de produits à action algicide par des bactéries (Figure 1.6). Les travaux de Guan et al. (2014) ont montré qu'une bactérie du genre *Bacillus* provoquait la lyse des cellules de l'haptophyte *Phaeocystis globosa*, une microalgue à l'origine de HAB. Le mode d'action de la bactérie semble être lié à l'excrétion de métabolites affectant l'expression de certains gènes de la microalgue, en particulier liés à l'intégrité de son appareil photosynthétique et à sa capacité de régulation des dommages des espèces réactives de l'oxygène (Guan et al., 2015). Un autre exemple d'amensalisme est celui de l'action de la bactérie *Pseudoalteromonas piscicida* sur la microalgue haptophyte *Emiliania huxleyi*. Il semblerait que la production de 2-heptyl-4-quinolone par la bactérie induise la mortalité de la microalgue (Harvey et al., 2016). La culture d'autres espèces de microalgues, telles que la chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* et la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* avec ce métabolite ne semble pas à l'inverse avoir d'effet négatif sur leur développement, suggérant une spécificité d'action de la molécule sur certaines espèces (Harvey et al., 2016). D'autres molécules à effet algicide excrétées par les bactéries ont été recensées et parmi elles nous pouvons citer les chitinases (Lee et al., 2016), protéases (Lee et al., 2000), et la deinoxanthine (Li et al., 2015).

Les microalgues peuvent également synthétiser des métabolites bactéricides et fongicides. En effet, la récente revue de Falaise et al. (2016) a rassemblé de nombreuses données de la littérature et les auteurs ont mis en évidence la grande diversité des espèces produisant des molécules antimicrobiennes, en particulier pour les pathogènes des cultures d'algues et les pathogènes des humains. Un autre exemple est l'étude de Kokou et al.

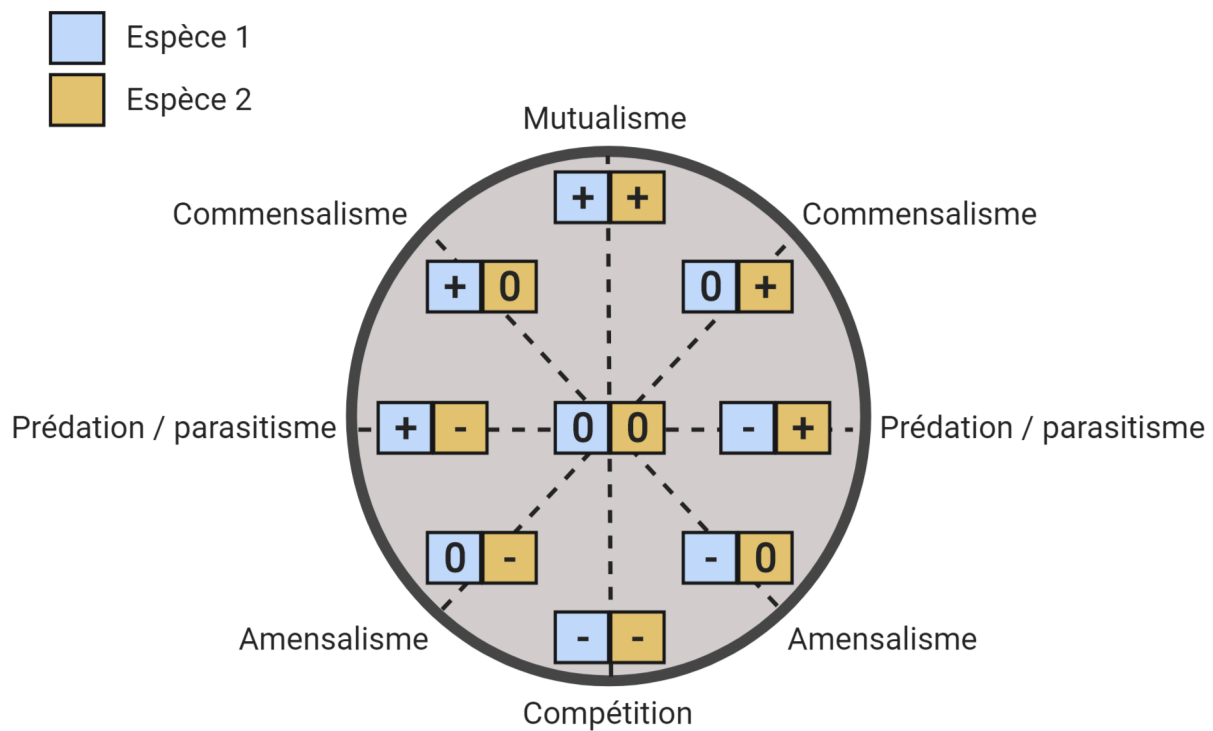


FIGURE 1.6 – Représentation des diverses interactions biotiques possibles entre deux organismes. Cette figure illustre les interactions sous forme de paire avec trois résultats possibles : neutre (0), négatif (-) et positif (+) pour chacun des membres du duo d'organismes (modifié d'après [Faust and Raes \(2012\)](#)).

(2012) où les auteurs ont noté l'excrétion de composés inhibant la croissance de bactéries du genre *Vibrio* par différentes espèces de microalgues, dont l'Haptophyte *Tisochrysis lutea*.

Compétition Des organismes sont en compétition lorsque leur influence réciproque est négative (Figure 1.6). La compétition a lieu lorsque des espèces convoitent une ressource limitée, qui peut être un élément nutritif (Hardin, 1960). Certaines régions océaniques sont pauvres en nutriments, conduisant à des phénomènes de compétition pour l'accès aux ressources entre les microorganismes. Thingstad et al. (1993) ont mis en évidence la compétition entre microalgues et bactéries pour le phosphore minéral. Les deux microorganismes synthétisent des phosphatases alcalines qui permettent le clivage du phosphore organique dissous en orthophosphates. Les deux microorganismes entrent alors en compétition pour leur acquisition. Une compétition pour l'azote inorganique a également été observée lors de la culture en chimostat limité en azote de la chlorophyte *D. salina* et de la bactérie *Alteromonas* (Le Chevanton et al., 2016). Lorsque le niveau de limitation est faible les organismes se partagent la ressource azotée, mais l'augmentation du niveau de limitation conduit à une augmentation de l'acquisition de l'ammonium par la bactérie, réduisant l'ammonium disponible pour la microalgue.

1.3.2 Mode d'action des interactions

Le mode d'action sert souvent de base dans l'étude des interactions entre organismes. L'influence d'un organisme sur un autre peut parfois nécessiter un attachement à la cellule cible dans le cas d'une action dite directe, ou bien par la production d'un métabolite diffusible, pour les actions dites indirectes. L'influence (positive ou négative) d'un microorganisme sur un autre ne peut être possible le plus souvent qu'à partir d'une certaine densité cellulaire ou une certaine proximité de la cellule cible. Le couplage de mécanismes de chimiotactisme et de la mobilité cellulaire permettent aux bactéries d'atteindre des concentrations critiques leur permettant d'avoir un effet sur l'espèce cible (Lovejoy et al., 1998). L'attachement des bactéries à une cellule cible peut permettre de créer un microenvironnement avec des concentrations élevées en métabolite(s) actif(s) (Lovejoy et al., 1998).

Un exemple d'action directe est celui de la bactérie *Phaeobacter inhibens*, qui s'attache aux cellules de *E. huxleyi* et favorise sa croissance (Segev et al., 2016) jusqu'à un certain

point où les métabolites issus de la bactérie conduisent à la mort de l'algue. Une autre étude a mis en évidence que la bactérie *Saprospira* sp. SS98-5 pouvait s'attacher aux cellules de la microalgue *Chaetoceros ceratosporum* et procéder à la lyse de l'algue (Furusawa et al., 2003).

À l'inverse, l'effet d'un organisme sur un autre peut parfois se produire par la diffusion passive d'un métabolite dans le milieu extracellulaire. C'est par exemple le cas pour la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. A28, qui excrète une molécule algicide dans le milieu, affectant la Diatomée *Skeletonema costatum* (Lee et al., 2000), tout comme pour *Phaeobacter gallaeciensis* vis-à-vis d'*E. huxleyi* (Seyedsayamdost et al., 2011a).

Une même souche bactérienne peut réaliser son activité algicide par un couplage des différents modes d'action en fonction de l'espèce cible. Nous pouvons citer l'exemple de la bactérie *Aquimarina salinaria* qui réalise la lyse de *Chlorella vulgaris* après attachement, et conduit à la destruction des cellules de la Cyanobactérie *Mycrocystis aeruginosa* par transport passif des molécules algicides (Furusawa et al., 2012).

1.3.3 Dynamique et spécificité des associations

Les relations algues-bactéries ne sont pas figées dans le temps et leurs dynamiques dépendent de facteurs biotiques et abiotiques (Faust and Raes, 2012). Par exemple, *E. huxleyi* en croissance non limitée excrète du diméthylsulfoniopropionate (DMSP), utilisable comme source de carbone et de soufre par la bactérie hétérotrophe *Phaeobacter gallaeciensis* (*Roseobacteraceae*) (Seyedsayamdost et al., 2011a). En retour la bactérie excrète des facteurs de croissance (acide phénylacétique) utilisables par la microalgue en une relation de type mutualiste. En revanche, lors de la sénescence de cultures de *E. huxleyi* les microalgues produisent de l'acide p-coumarique, auquel les bactéries répondent par la synthèse des roseobacticides pouvant conduire à la lyse des algues (Seyedsayamdost et al., 2011a).

La dynamique des interactions peut aussi dépendre de facteurs abiotiques. Par exemple, Grossart (1999) a observé que des bactéries hétérotrophes et des Diatomées entraient en compétition pour l'accès à certains nutriments organiques, tels que les vitamines. Lorsque ces microorganismes étaient cultivés en milieu pauvre en nutriments organiques, leur biomasse s'accroissait grâce à la reminéralisation bactérienne de la matière organique excrétée par les Diatomées.

La spécificité des co-occurrences entre algues et bactéries est peu connue et il y a débat concernant les associations entre taxons (Sapp et al., 2007 ; Amin et al., 2012). Pour les

Diatomées par exemple, les travaux de métagénomique de [Crenn et al. \(2018\)](#) ont montré que les communautés bactériennes épibiotiques associées aux microalgues évoluaient au cours du temps en fonction des conditions abiotiques. Les phyla de bactéries associés étaient des Alpha-, Gamma- ou Béta-protéobactéries, des Zctinobactéries, des Flavobactéries ou des Sphingobactéries. L'étude de [Amin et al. \(2012\)](#) a montré à l'inverse que les genres *Roseobacter* et *Sulfitobacter* (Alpha-protéobactéries) ainsi que *Flavobacterium* (Flavobacteries) composaient la majorité des bactéries associées aux Diatomées.

Les récentes analyses de métagénomique réalisées suite aux croisières du projet *Tara Oceans* ont tenté de prédire la part des facteurs biotiques et abiotiques dans la structuration des communautés planctoniques ([Lima-Mendez et al., 2015](#)). Les résultats ont montré que les interactions positives entre organismes planctoniques (organismes toujours retrouvés ensemble) sont largement supérieures aux exclusions mutuelles (organismes jamais retrouvés ensemble), suggérant que la majorité des interactions entre microorganismes permet leur survie respective. Les interactions biotiques sont en effet un élément moteur de l'évolution des algues, à l'origine même de leur apparition du fait des endosymbioses primaire, secondaire et tertiaire. Ces interactions ont donné lieu à des transferts de matériel génétique entre des microorganismes voisins, appelé transfert horizontal des gènes, dont les traces sont observées chez les algues actuelles. Par exemple, les travaux de [Allen et al. \(2011\)](#) ont montré que des gènes impliqués dans le cycle de l'urée chez les Diatomées étaient d'origine bactérienne et permettaient aux algues de réguler plus rapidement leur métabolisme après une limitation azotée. [Brembu et al. \(2014\)](#) ont analysé le génome chloroplastique de la diatomée *Seminavis robusta* et ont suggéré un transfert horizontal des gènes d'une bactérie du genre *Clostridia*. Une autre étude a permis d'identifier des traces de transfert horizontal des gènes de bactéries (*Bacteroidetes*) dans le génome chloroplastique des Dinoflagellés ([Moszczyński et al., 2011](#)).

1.3.4 Bilan et limites des analyses

Pour conclure, les relations entre algues et bactéries sont contrôlées par une combinaison complexe d'interactions trophiques, d'échanges de nutriments et de signaux chimiques dont la nature dépend de facteurs biotiques et abiotiques. Les avancées des techniques de biologie moléculaire (métagénomique, métabolomique, génomique, transcriptomique, protéomique) depuis ces deux dernières décennies permettent d'analyser en profondeur les mécanismes physiologiques d'interaction entre communautés de microor-

ganismes (Seyedsayamdost et al., 2011a ; Amin et al., 2015 ; Guan et al., 2015). Il est estimé que seulement 0.001 à 0.1 % des espèces de bactéries est aujourd'hui cultivable (Amann et al., 1995). L'observation des interactions en laboratoire ne représentant que la partie visible de la diversité naturelle, il s'avère donc nécessaire de coupler les expériences de laboratoire avec les données de terrain pour avoir une vision globale des différents organismes réellement associés dans des échantillons naturels. La combinaison d'analyses chimiques, moléculaires et physiologiques permettra de mieux caractériser le fonctionnement et les dynamiques des écosystèmes microbiens complexes.

Parmi les nombreux échanges de nutriments entre microalgues et bactéries, cette thèse a pour objet la vitamine B₁₂. Les sections suivantes tâcheront de faire le lien entre cette vitamine et ces deux compartiments microbiens.

1.4 Vitamine B₁₂ et production primaire marine

1.4.1 Découverte

Les vitamines sont des composés organiques nécessaires en petite quantité et essentiels au métabolisme cellulaire. La plupart des organismes nécessitent une combinaison de plusieurs vitamines qu'ils ne peuvent synthétiser ou du moins pas en quantités suffisantes. L'étymologie du terme "vitamine" proviendrait de la contraction de "vitale" et "amine", bien que toutes les vitamines ne soient pas en possession d'un groupement aminé. Il existe deux catégories chimiques de vitamines : les vitamines lipophiles, aux propriétés antioxydantes, et les vitamines hydrophiles, jouant la plupart du temps le rôle de cofacteurs enzymatiques permettant l'activité biochimique d'une enzyme (Smith et al., 2007). Les vitamines du groupe B (pour bérubéri, une maladie causée par une carence en vitamine B₁, la première découverte) sont au nombre de huit, et non pas douze comme l'on pourrait s'y attendre. En effet, des facteurs de croissance organiques, tels que l'adénine (vitamine B₄) ont été considérés à tort comme des vitamines : le corps humain peut en effet les synthétiser. La numérotation des vitamines a ainsi été revue à de nombreuses reprises et les numéros intermédiaires ont été retirés. La Table 1.1 présente les différentes vitamines du groupe B. Toutes sont hydrosolubles et obtenues par l'alimentation chez l'humain.

Les revues bibliographiques de Raux et al. (2000) et Martens et al. (2002) ont fait état de l'historique de la découverte de la vitamine B₁₂. En 1926, les américains George Whipple, George Minot et William Murphy prouvèrent qu'une cure de foie cru permettait de guérir de l'anémie pernicieuse, maladie caractérisée par une quantité d'hématies dans le sang trop faible et mortelle jusqu'alors. Le foie était alors connu pour contenir un "facteur actif" permettant la guérison, reconnu plus tard sous le nom vitamine B₁₂ (Minot and Murphy, 1926). Ils partagèrent tous les trois le prix Nobel de médecine en 1934 à parts égales.

En 1942, l'ouverture des postes scientifiques aux femmes du fait de la seconde guerre mondiale permis à l'américaine Mary Shorb d'obtenir un emploi de technicienne en bactériologie dans une laiterie où elle devait cultiver la bactérie *Lactobacillus lactis*. Elle comprit que l'extrait de foie utilisé comme milieu de culture devait contenir la fraction active

TABLE 1.1 – Présentation des différentes vitamines du groupe B (Smith et al., 2007).

Nom général	Composé actif	Rôle métabolique chez l'homme
Vitamine B ₁	Thiamine	Cofacteur pour le cycle de Krebs
Vitamine B ₂	Riboflavine	Cofacteur pour la dégradation des lipides
Vitamine B ₃	Niacine	Cofacteur pour la dégradation des lipides
Vitamine B ₅	Acide pantothénique	Biosynthèse de coenzyme A
Vitamine B ₆	Phosphate de pyridoxal	Métabolisme des acides aminés
Vitamine B ₇	Biotine	Cofacteur pour le cycle de Krebs
Vitamine B ₉	Acide folique	Synthèse de méthionine et des bases nucléiques
Vitamine B ₁₂	Cobalamine	Synthèse de méthionine et des bases nucléiques, de la gaine de myéline des nerfs, des globules rouges

correspondant à la B₁₂ (Shorb, 1947b ; Raux et al., 2000). Mary Shorb en déduisit que le taux de croissance du lactobacille devait être proportionnel à la concentration en cette vitamine et mis ainsi en place la méthode de quantification microbiologique de la vitamine B₁₂ au sein de l'équipe de Karl Folkers (Shorb, 1947a ; Shorb and Briggs, 1948 ; Shorb, 1948). Par la suite, le composant fut purifié et cristallisé par l'équipe de E. Lester Smith (Smith, 1948).

La structure de cette vitamine fut élucidée en 1958 par la britannique Dorothy Hodgkin à l'aide de la méthode de cristallographie rayons-X (Figure 1.7), ce qui lui valut également le prix Nobel de médecine en 1964 (Crowfoot-Hodgkin et al., 1955).

Enfin, la synthèse chimique complète de la B₁₂ aboutit en 1973, suite à plus de 11 ans de recherches dirigées par l'équipe anglo-suisse de Robert Woodward et Albert Eschenmoser, impliquant 91 post-doctorants et 12 doctorants (Eschenmoser, 1974). C'est à ce jour la vitamine dont la voie de biosynthèse est la plus complexe.

1.4.2 Structure et formes biologiquement actives de la vitamine B₁₂

La vitamine B₁₂ possède un noyau corrinoïde tétrapyrrolique avec un atome de cobalt en son centre (acide cobyrique) et une boucle nucléotidique, ce qui lui vaut le nom de cobalamine, contraction de "cobalt" et "amine" (Figure 1.8). L'atome de cobalt lui donne sa couleur rouge-rosée en solution. Au noyau de cobalt central sont liés des ligands axiaux

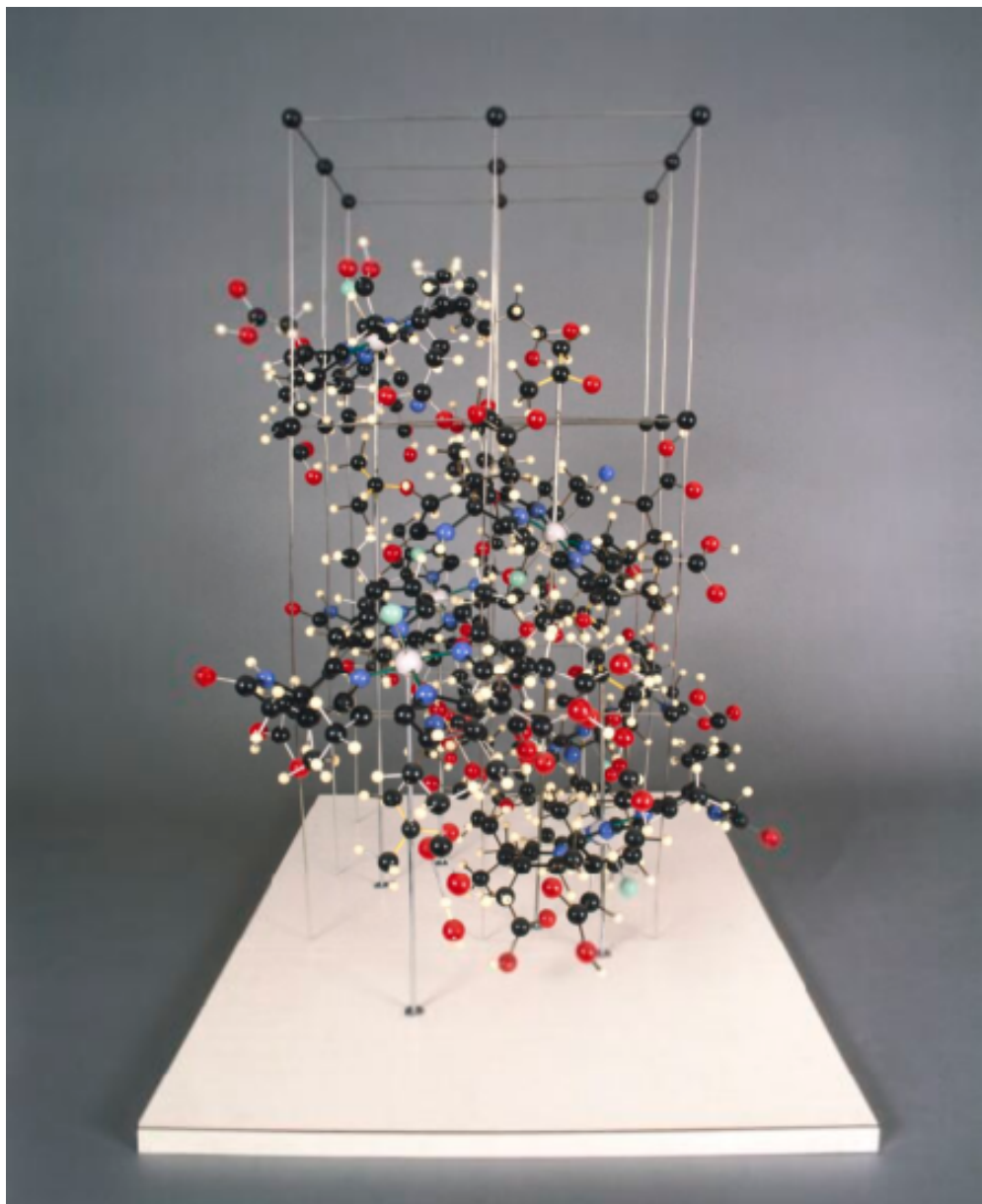


FIGURE 1.7 – Maquette de la structure cristalline de la vitamine B₁₂ réalisée à partir des données de cristallographie rayons-X de Dorothy Hodgkin. Photographie libre de droits réalisée par le conseil d'administration du Museum des Sciences de Londres (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

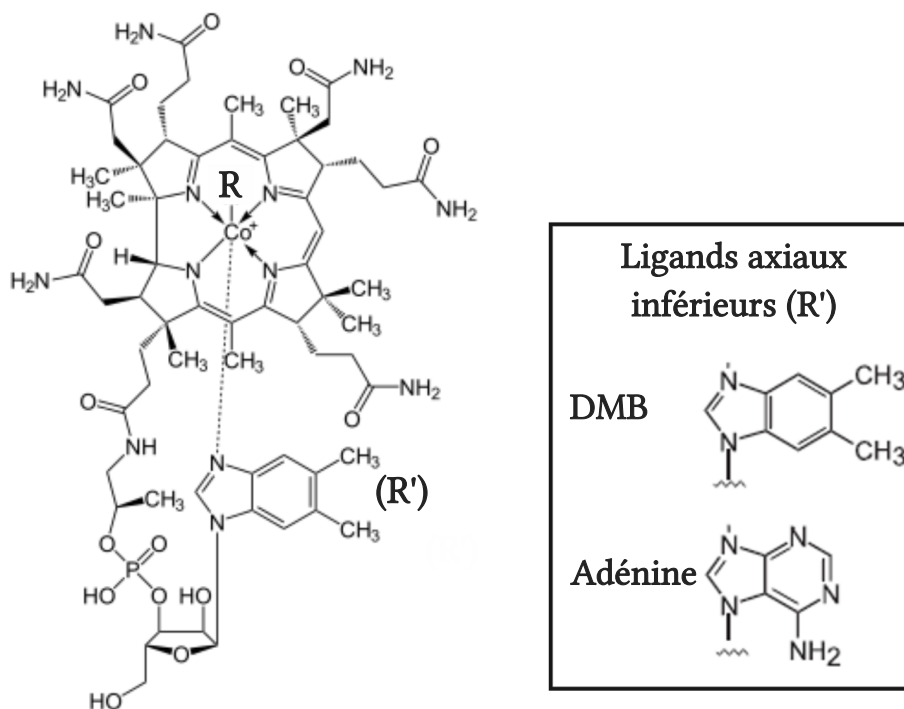


FIGURE 1.8 – Structure générale de la cobalamine et des ligands axiaux inférieurs (modifié d'après [Helliwell et al. \(2016\)](#)).

supérieur (R) et inférieur (R') (Figure 1.8). Ces ligands sont variables et peuvent prendre différentes formes (Figure 1.8, Table 1.2). Les termes "vitamine B₁₂" regroupent donc par abus de langage les différentes formes chimiques de cette molécule.

Lorsque le ligand axial supérieur est adénosylé la molécule prendra le nom adénosylcobalamine (AdoCbl), lorsqu'il est méthylé la molécule se nommera méthylcobalamine (MeCbl) (Table 1.2) ([Raux et al., 2000](#)). La MeCbl et l'AdoCbl sont toutes deux photosensibles et leur photolyse par exposition aux UV-A en solution aqueuse les convertit en hydroxycobalamine (OHCbl) ([Juzeniene and Nizauskaite, 2013](#)). Les formes synthétisées naturellement et biologiquement actives de la B₁₂ sont la MeCbl et l'AdoCbl ([Raux et al., 2000](#)). Il existe une autre forme de vitamine B₁₂, la cyanocobalamine (CNCbl), c'est la forme communément utilisée pour la préparation de milieux nutritifs pour la culture de microalgues. Cette forme possède un résidu cyanure en ligand axial supérieur (Table 1.2). La cyanocobalamine résulte du processus industriel d'extraction de la vitamine B₁₂ biologique, à partir de bactéries, qui nécessite l'utilisation de cyanure de potassium (KCN). Par souci de simplification et de cohérence avec la littérature, nous considérerons que la masse molaire moléculaire de la vitamine B₁₂ est celle de l'AdoCbl, soit 1580 g/mol.

TABLE 1.2 – Structure des différentes formes chimiques du groupe des cobalamines, en fonction des ligands axiaux supérieur et inférieur.

Ligand axial supérieur (R)	Ligand axial inférieur DMB	Ligand axial inférieur adénine
Ado	Adénosylcobalamine (AdoCbl)	Adénosylpseudocobalamine
CH ₃	Méthylcobalamine (MeCbl)	Méthylpseudocobalamine
CN	Cyanocobalamine (CNCbl)	Cyanopseudocobalamine
OH	Hydroxycobalamine (OHCbl)	Hydroxypseudocobalamine

Le ligand axial inférieur de la vitamine peut être un groupement diméthylbenzimidazole (DMB) ou bien un groupement adénine (Figure 1.8). Le groupement DMB est présent sur les formes biologiquement utilisables de la B₁₂. La B₁₂ contenant un ligand axial inférieur adénine est produite par des Cyanobactéries telles que *Synechococcus* sp. et la spiruline *Arthrospira platensis* et est difficile à métaboliser pour d'autres organismes, dont les microalgues et l'homme (Taga and Walker, 2008 ; Helliwell et al., 2016). La spiruline n'est donc pas une source de vitamine B₁₂ assimilable par l'humain. La difficulté d'assimilation de la cobalamine possédant un ligand adénine lui vaut le nom de pseudocobalamine. En fonction des ligands axiaux supérieurs, la molécule prendra ainsi la dénomination "cyanopseudocobalamine", "méthylpseudocobalamine", "hydroxypseudocobalamine" ou "adénosylpseudocobalamine" (Table 1.2).

1.4.3 Biosynthèse de la vitamine B₁₂

Généralités

Seules certaines espèces d'Archées et de bactéries disposent de l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse de la cobalamine et deux voies de biosynthèse distinctes ont été identifiées en utilisant les bactéries modèles *Pseudomonas denitrificans* et *Salmonella typhimurium* (Roth et al., 1993 ; Raux et al., 1996, 2000). La première voie de biosynthèse est oxygène-dépendante et l'organisme chez lequel cette voie a été élucidée est *P. denitrificans*. La seconde voie de biosynthèse est oxygène-indépendante et a été décrite chez *S. typhimurium*.

La question de la coexistence de deux voies de biosynthèse distinctes a été étudiée dans plusieurs travaux. Roth et al. (1996) ont proposé que le rôle primaire de la cobalamine était de permettre les réactions de fermentation. La fermentation aurait généré des composés oxydables et un puits d'électrons permettant l'équilibre des réactions d'oxydo-réduction. D'autres activités biologiques anaérobies, telles que la méthanogenèse et la fermentation des acides aminés, nécessitent de la cobalamine, ce qui donne des arguments en faveur de cette théorie (Roth et al., 1996). Aussi, le fait que la synthèse de B₁₂ commence à partir de l'utilisation d'une molécule aminoacyl-ARNt (Jahn et al., 1992) suggère un rôle ancien, du "monde à ARN", où l'oxygénation de l'atmosphère était incomplète et où le mode principal de production d'énergie était anaérobie (Warren et al., 2002). Les expériences de reconstitution de l'atmosphère primitive de la Terre ont montré que les molécule porphyrinogènes, impliquées dans la synthèse de B₁₂, peuvent être synthétisées de façon non-enzymatique à partir de précurseurs simples (Hodgson and Ponnampuruma, 1968). Ces observations ont conduit Benner et al. (1989) à proposer que la production anaérobie de vitamine B₁₂ a émergé dans le monde à ARN. L'oxygénation progressive de l'atmosphère, suivie de l'évolution des mécanismes de synthèse des molécules organiques, aurait conduit à l'émergence de la voie de biosynthèse aérobie et à la coexistence de deux voies parallèles de biosynthèse (Roth et al., 1996 ; Martens et al., 2002).

La Figure 1.9 représente une illustration simplifiée des voies de biosynthèse de la vitamine B₁₂ (adénosylcobalamine). Les molécules précurseurs sont soit le glutamate (glutamyl-ARNt) (voie à 5 carbones) pour la majorité des bactéries et les Archées, soit la glycine et le succinyl-CoA (voie à 4 carbones) pour les alpha-protéobactéries (Figure

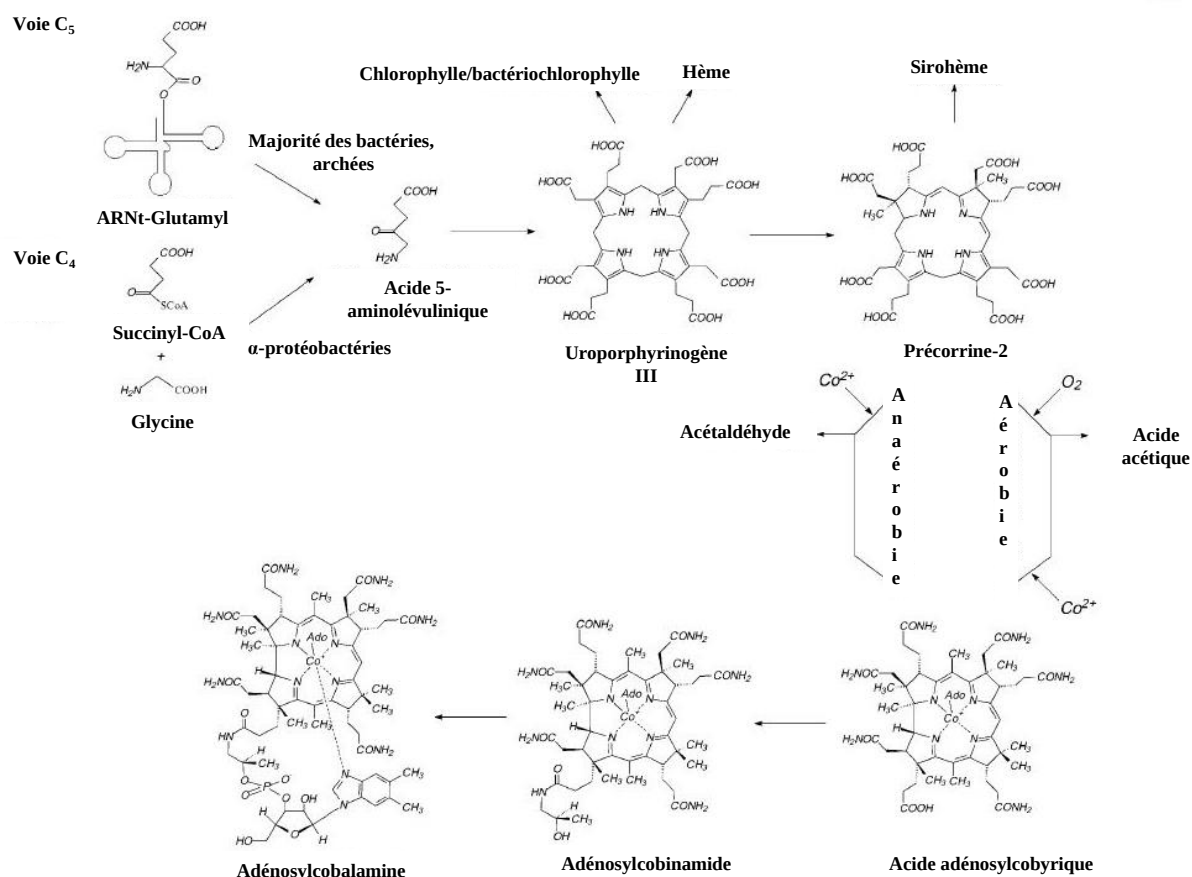


FIGURE 1.9 – Schéma simplifié des voies de biosynthèse de la vitamine B₁₂ (modifié d'après Martens et al. (2002)).

1.9) (Jahn et al., 1992 ; Martens et al., 2002). Les précurseurs sont convertis en acide 5-aminolévulinique (ALA). L'ALA est ensuite converti en uroporphyrinogène III, une molécule située au carrefour des voies de synthèse des molécules hémiques (hémoglobine, chlorophylle, bactérochlorophylle, adénosylcobalamine) (Figure 1.9) (Martens et al., 2002). Puis, l'uroporphyrinogène III est converti en précorrène-2, le précurseur des voies de biosynthèse aérobie et anaérobie de la cobalamine (Figure 1.9). La synthèse de la vitamine B₁₂ nécessite 8 molécules de S-adénosylméthionine (SAM) pour l'obtention de résidus méthylés (Uzar et al., 1987). L'ordre d'attachement des groupements méthyles a conduit à la nomenclature des molécules intermédiaires (précorrène-*n*, où *n* réfère aux nombres de groupements méthyles ajoutés à la molécule centrale (Uzar et al., 1987).

L'insertion du noyau de cobalt dans la molécule est différente entre les deux voies de biosynthèse : le cobalt est inséré plus tardivement dans la voie aérobie et la biosynthèse produit de l'acide acétique (Figures 1.9 et 1.10) (Raux et al., 1999). Les gènes encodant les enzymes correspondant à cette voie sont dénotés par le préfixe "cob" (Figure 1.10). La

voie anaérobie est caractérisée par la chélation rapide du cobalt et la production d'acétaldéhyde (Figure 1.9 et 1.11). Les gènes de cette voie possèdent le préfixe "*cbi*" (Figure 1.11).

Nous avons vu qu'il existe deux formes de cobalamine biologiquement actives, qui sont l'adénosylcobalamine (AdoCbl) et la méthylcobalamine (MeCbl). Les voies de biosynthèse présentées ici produisent de l'AdoCbl. L'AdoCbl peut être convertie dans la cellule en cobalamine à l'état d'oxydation 1 (cob(I)alamine) par la corrinoïde adénosyltransférase (E.C. 2.5.1.17) (Figure 1.12 A), puis la cob(I)alamine est convertie transitoirement en MeCbl lors des réactions enzymatiques nécessitant le transfert de groupements méthyles.

La cyanocobalamin, ajoutée dans les milieux de culture des microorganismes, est convertie en cob(I)alamine par la cyanocobalamine réductase (E.C. 1.16.1.6) (Figure 1.12 B). L'hydroxycobalamine, issue de la photoconversion de l'AdoCbl et de la MeCbl, peut être de nouveau convertie en une forme de cobalamine biologiquement active en passant par la conversion en cobalamine à l'état d'oxydation 2 (cob(II)alamine) par l'hydroxycobalamine reductase (E.C. 1.16.1.5) (Figure 1.12 C), puis la cob(II)alamine pourra être convertie en cob(I)alamine par la cob(II)alamine reductase (E.C. 1.16.1.4) (Figure 1.12 D). Ces réactions permettant l'interconversion des différentes formes de cobalamine assurent la disponibilité de la MeCbl et de l'AdoCbl.

Plus de 20 gènes encodant près d'une trentaine de réactions enzymatiques sont impliqués dans la biosynthèse de la vitamine B₁₂, ce qui en fait la vitamine la plus complexe à produire (Figure 1.10 et 1.11) (Raux et al., 2000). Il est généralement admis que la synthèse de cobalamine nécessite 1 % du génome bactérien (Roth et al., 1993). Des cas extrêmes existent cependant, comme l'a montré l'étude de McCutcheon et al. (2009) où 7 % du protéome de la bactérie symbiotique d'insectes *Hogkinia* sp. sont impliqués dans la synthèse de la vitamine B₁₂. L'étude de Zhang et al. (2009) a montré que seule la moitié des espèces de bactéries pouvant assimiler le cobalt, le noyau métallique nécessaire à la synthèse de B₁₂, serait capable de synthétiser la cobalamine. Certaines de ces bactéries sont aussi capables de produire de la cobalamine à partir d'anneaux corrinoïdes importés du milieu extracellulaire (Escalante-Semerena, 2007), ou d'importer directement la cobalamine par un système de transport ABC (Woodson et al., 2005).

Du fait de la complexité et du coût de la synthèse chimique de la vitamine B₁₂, la production industrielle de ce cofacteur est réalisée à partir de souches bactériennes sé-

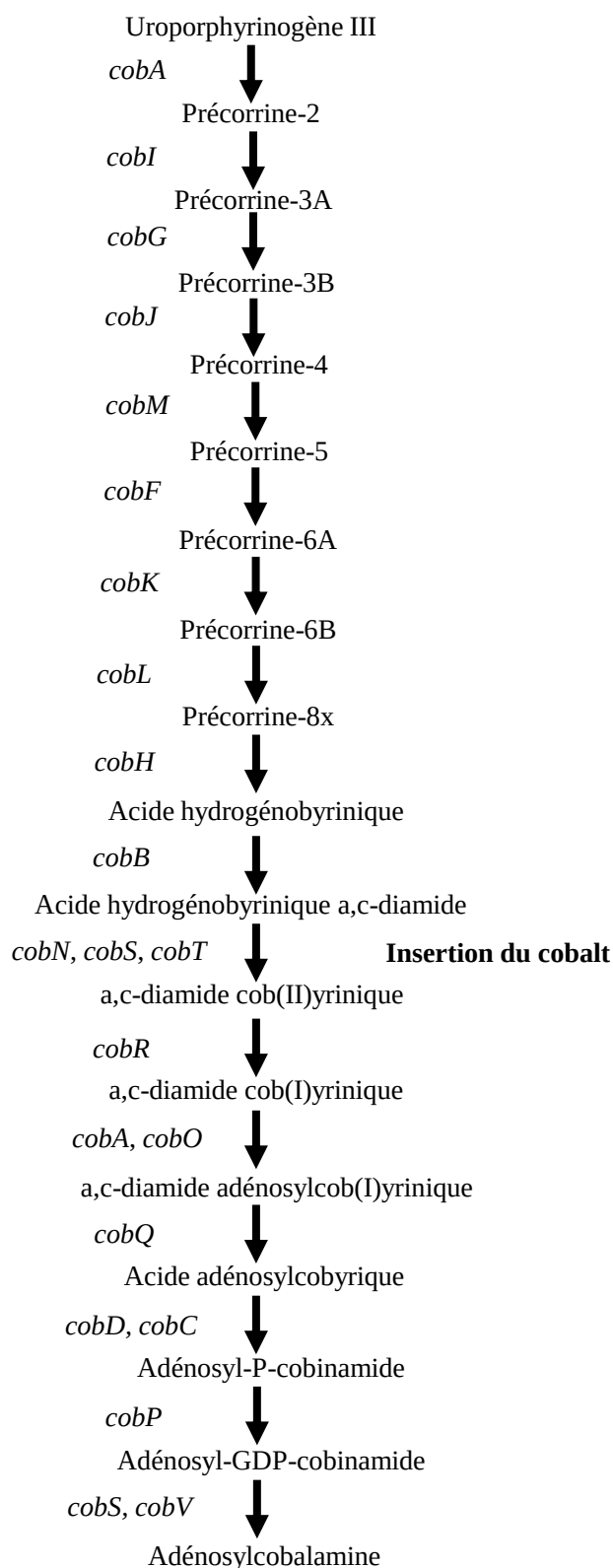


FIGURE 1.10 – Détails de la voie de biosynthèse aérobie de la vitamine B₁₂ (adénosylcobalamine). Les gènes sont représentés en italique. La séparation des gènes par une virgule indique que tous les gènes sont requis pour réaliser la réaction. La réaction où l'insertion du cobalt est effectuée est indiquée.

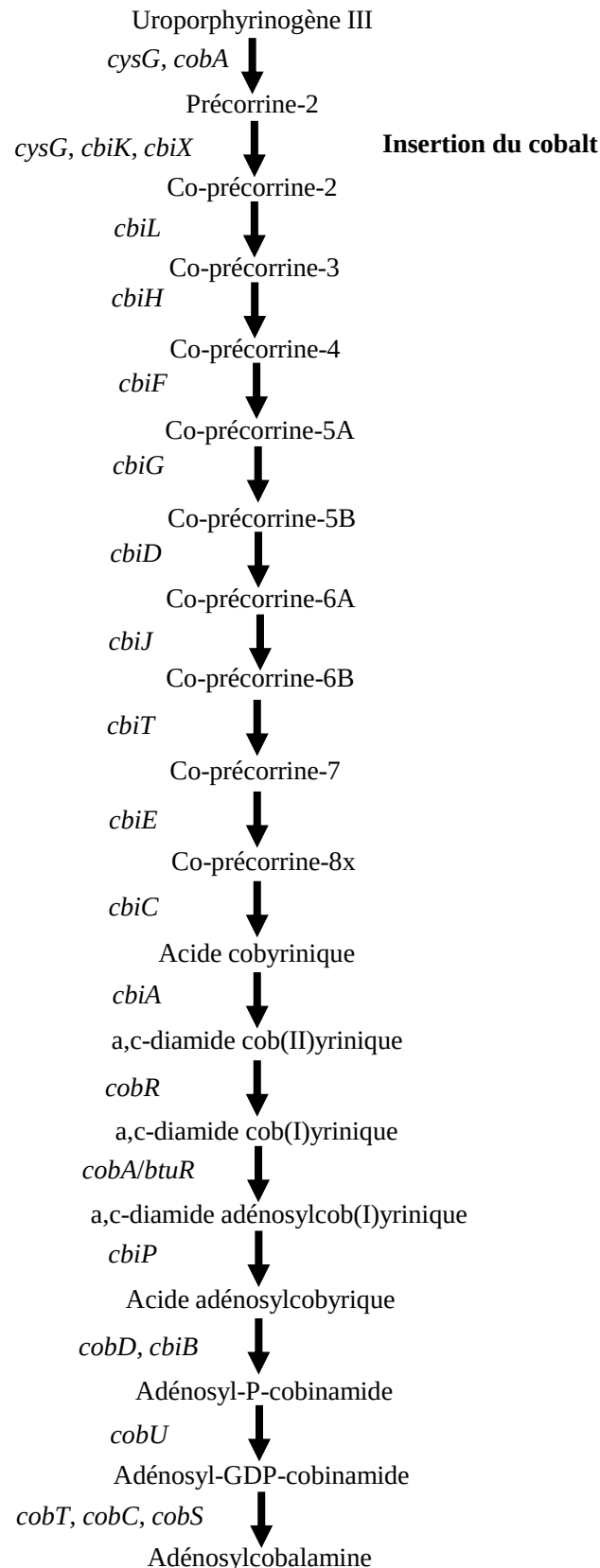


FIGURE 1.11 – Détails de la voie de biosynthèse anaérobie de la vitamine B₁₂ (adénosylcobalamine). Les gènes sont représentés en italique. La séparation des gènes par une virgule indique que tous les gènes sont requis pour réaliser la réaction. La séparation des gènes par un slash indique que l'un ou l'autre des gènes peut réaliser la réaction. La réaction où l'insertion du cobalt est effectuée est indiquée. Le préfixe "Co" signifie que la molécule contient un noyau de cobalt.

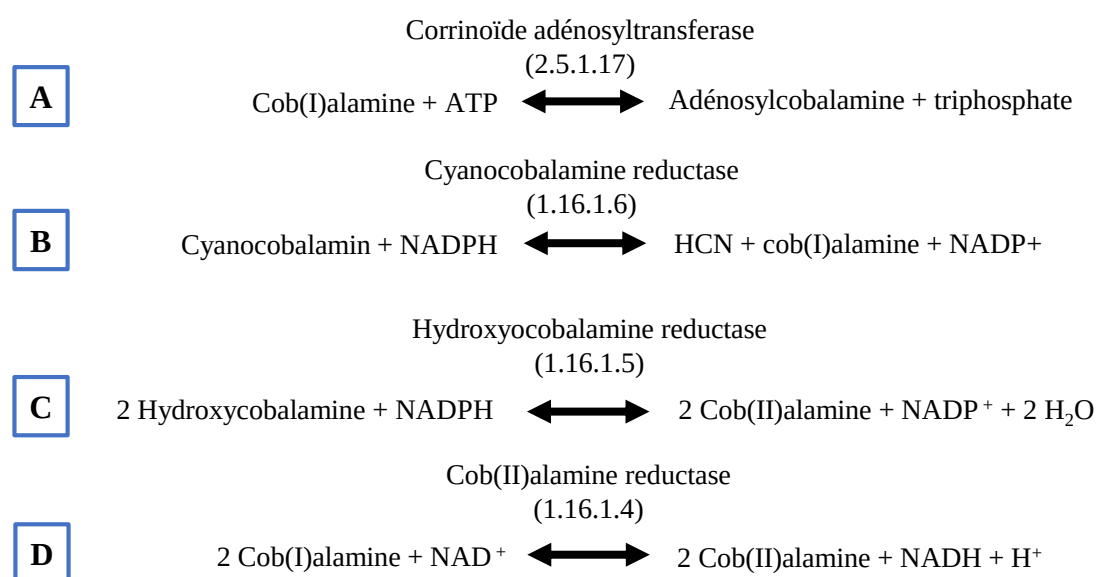


FIGURE 1.12 – Réactions d’interconversion des différentes formes de cobalamine dans la cellule d’après la base de données KEGG. Les codes enzymatiques sont notés entre parenthèses pour chaque réaction.

lectionnées pour leur productivité (Eschenmoser, 1974). Cette vitamine est produite dans l’industrie pour la production de compléments alimentaires, destinés aux animaux d’élevage et à la consommation humaine. La Table 1.3 résume les genres de bactéries utilisées dans l’industrie pour la production de cobalamine ainsi que les taxons auxquels ils appartiennent.

TABLE 1.3 – Genres bactériens communément utilisés dans l’industrie pour la production de vitamine B₁₂ (d’après Martens et al. (2002) ; Croft et al. (2005)).

Taxon	Genres bactériens
Actinobactéries	<i>Corynebacterium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Norcardia</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Streptomyces</i>
Alpha-protéobactéries	<i>Aerobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>
Béta-protéobactéries	<i>Alcaligenes</i>
Gamma-protéobactéries	<i>Azotobacter</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Protaminobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Xanthomonas</i>
Firmicutes	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Streptococcus</i>
Flavobactéries	<i>Flavobacterium</i>

Synthèse de vitamine B₁₂ par les Archées

La synthèse de cobalamine est mieux connue et décrite chez les bactéries que chez les Archées. Ceci est en partie dû à la difficulté de cultiver ces organismes ainsi qu'à la faible similarité des séquences bactériennes et d'Archées pour les gènes de la biosynthèse de cobalamine (Thomas and Escalante-Semerena, 2000 ; Brindley et al., 2003). Plusieurs études ont néanmoins identifié des gènes impliqués dans la biosynthèse de B₁₂ chez des Archées, telle que *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH (Thomas and Escalante-Semerena, 2000 ; Brindley et al., 2003), *Halobacterium* sp. NRC-1 (Woodson et al., 2003b), *Methanosarcina barkeri* (Brindley et al., 2003) et *Thermosipho africanus* (Swithers et al., 2012). L'étude de Swithers et al. (2012) a de plus mis en évidence que certaines Archées appartenant au genre *Thermotagales* peuvent synthétiser de la vitamine B₁₂ *de novo* à partir de glutamate, considéré comme un substrat spécifique de la voie de biosynthèse de la B₁₂ chez les eubactéries (Martens et al., 2002). Les auteurs proposent que ces organismes auraient acquis le cluster de gènes permettant la biosynthèse par transfert horizontal via des bactéries Firmicutes, ce qui suggère une évolution complexe de ces groupes d'organismes (Swithers et al., 2012). Les *Thermotagales* peuvent aussi produire la vitamine à partir de molécules intermédiaires de la voie de biosynthèse complète (Swithers et al., 2012 ; Butzin et al., 2013). Ce phénomène suggère une potentielle coopération des microorganismes pour la production de vitamine B₁₂. Enfin, l'étude de Zhang et al. (2009) a proposé, en se basant sur des données de génomique comparative, que 75 % des Archées assimilant le cobalt pouvaient produire la cobalamine.

Producteurs marins de la vitamine B₁₂

Il n'y a pas d'étude présentant les principales espèces source de vitamine B₁₂ dans le milieu océanique. Les Cyanobactéries sont les organismes les plus représentés du phytoplancton et synthétisent de la pseudocobalamine, peu disponible pour les microalgues auxotrophes (Helliwell et al., 2016). Une récente étude de métagénomique a analysé la présence de gènes de synthèse de la cobalamine chez les *Thaumarchaeota*, un phylum d'Archées peu étudié (Doxey et al., 2015). Leurs résultats ont montré que tous les génomes de ce phylum contenaient les gènes de biosynthèse de la vitamine B₁₂. Il semblerait que les *Thaumarchaeota* soient distribuées de façon ubiquitaire dans les milieux aquatiques, domineraient les eaux polaires et seraient plus représentées en profondeur dans la colonne

d'eau. Les auteurs proposent donc que ce taxon peu connu représente une source de vitamine B₁₂ non négligeable pour le phytoplancton (Doxey et al., 2015).

Pour les Eubactéries, les travaux de Dupont et al. (2012) ont abouti, en utilisant des méthodes bioinformatiques, à l'identification de voies de biosynthèse de la cobalamine chez certaines bactéries du groupe de gamma-protéobactéries SAR86, un taxon marin ubiquiste. Dans la même veine, Luo and Moran (2014) ont fait un inventaire des données génomiques du clade marin des *Roseobacter* et ont identifié dans chacun des 52 génomes de leurs échantillons la présence d'une voie fonctionnelle de biosynthèse de la vitamine B₁₂.

Enfin, le genre de bactéries marines *Halomonas* sp. semble abriter une grande proportion d'espèces productrices de cobalamine, comme en témoignent les travaux de cocultures algues-bactéries de Croft et al. (2005) et les analyses génomiques de Romine et al. (2017). La fréquence d'association de ces différents groupes de bactéries et d'Archées avec le phytoplancton reste cependant méconnue. L'exploration des nombreuses données génomiques et transcriptomiques obtenues à l'issue de projets tels que *Tara Oceans* apportera sans doute des éléments de réponse quant à la répartition des taxons bactériens producteurs de vitamine B₁₂.

1.4.4 Répartition de l'auxotrophie pour la B₁₂ dans le vivant

Les organismes ayant besoin d'un composé pour se développer mais ne pouvant pas le synthétiser sont dits auxotrophes. Comme expliqué précédemment, la vitamine B₁₂ est un cofacteur enzymatique. La dépendance vis-à-vis de ce cofacteur est donc liée à la présence d'enzymes B₁₂-dépendantes et à l'absence d'enzymes ou de voies métaboliques connexes permettant d'obtenir le même produit de réaction. La Table 1.4 récapitule la répartition de la dépendance à la cobalamine dans le vivant. Les végétaux supérieurs et les mycètes n'ont pas d'enzymes nécessitant la cobalamine et sont donc dépourvus de cette vitamine dans leurs cellules (Eschenmoser, 1988 ; Marsh, 1999). Les métazoaires ont besoin de ce cofacteur. Les herbivores pourvoient à leurs besoins soit par la rumination, qui permet la fermentation bactérienne dans le tube digestif, soit par caecotrophie, c'est-à-dire la consommation de leur fèces riche en vitamine du fait de l'activité bactérienne (Raux et al., 1996, 2000). Les carnivores y parviennent pour leur part en consommant des organismes herbivores. L'homme nécessite un apport en vitamine de l'ordre de 0.1 à 1 µg/jour, qui est généralement atteint en consommant des produits issus de l'exploitation

TABLE 1.4 – Répartition de l'auxotrophie pour la vitamine B₁₂ au sein du vivant.

Organismes	Auxotrophie pour la vitamine B ₁₂ (+/–)	Source de B ₁₂
Métazoaires carnivores	+	Consommation d'herbivores
Humain	+	Consommation d'herbivores/suppléments vitaminiques
Métazoaires herbivores	+	Fermentation bactérienne, cécotrophie
Végétaux à port dressé	–	
Mycètes	–	
Algues	+ (50 %) et – (50 %)	Lyse/excrétion bactérienne
Bactéries	+ et –	Lyse/excrétion bactérienne
Autres protistes	inconnue	inconnue

animale. En revanche, les végétaux ne contenant pas de cobalamine, il est indispensable pour les végétaliens de se suppléer avec des compléments alimentaires issus de bactéries. Il faut tout de même noter que le foie humain possède une réserve de B₁₂ de l'ordre de 3 à 6 ans (Herrmann and Obeid, 2008). Des carences éventuelles ne se déclareront donc que sur le long terme (Loew et al., 1999).

Chez les organismes unicellulaires, l'auxotrophie pour la vitamine B₁₂ est plus variable. Très peu d'information est disponible concernant les Amibes. Les travaux de Ma et al. (2017) ont montré que l'Amibe LPG3, récemment isolée d'un échantillon naturel, était auxotrophe pour la cobalamine. Pour les Foraminifères, la vitamine B₁₂ ajoutée dans le milieu de culture favorise la croissance de certaines espèces (Lee et al., 1963) mais aucune étude n'a estimé la proportion d'espèces auxotrophes pour cette vitamine. Des recherches plus poussées de la littérature n'ont pas permis d'identifier clairement la proportion d'espèces auxotrophes pour la vitamine B₁₂ chez ces groupes. La recherche de séquences d'enzymes B₁₂-dépendantes sur la base de données Uniprot n'a permis d'identifier qu'une méthionine synthase chez l'Amibe mycetozaire *Polysphondylium pallidum* et le Foraminifère *Reticulomyxa filosa*.

La moitié des espèces de microalgues seraient auxotrophes pour la cobalamine et la distribution de cette dépendance ne semble pas suivre de patron évolutif précis car

même chez les Chlorophytes, les algues considérées comme les plus proches évolutivement des plantes terrestres, des espèces B₁₂-dépendantes et B₁₂-indépendantes coexistent (Croft et al., 2005 ; Helliwell et al., 2013). En ce qui concerne les bactéries, les études génomiques de Rodionov et al. (2003) et de Zhang et al. (2009) ont proposé que la moitié des bactéries B₁₂-dépendantes auraient la voie de biosynthèse complète. Cela signifie que la moitié des bactéries nécessitant ce cofacteur devrait bénéficier d'une source externe de cette vitamine.

1.4.5 Enzymes B₁₂-dépendantes dans le vivant

La MeCbl et l'AdoCbl catalysent des réactions enzymatiques différentes. L'AdoCbl agit comme cofacteur pour la majorité des enzymes B₁₂-dépendantes (Table 1.5) (Brown, 2005). Chez les bactéries et les Archées, l'AdoCbl agit comme cofacteur principalement pour l'activité des isomérases qui jouent un rôle dans les réactions de fermentation (Banerjee and Ragsdale, 2003), et celles impliquées dans les transferts de groupement méthylés à partir de substrats méthanogènes comme le méthanol (Keltjens and Vogels, 1993), les méthylamines (Burke and Krzycki, 1995) et l'acétate (Ferry, 1992) (Table 1.5). La plupart des Cyanobactéries semblent posséder des ribonucléotides réductases de classe II, nécessitant l'AdoCbl (Gleason and Wood, 1976).

La MeCbl permet les réactions de transferts de groupements méthylés. Trois enzymes dépendantes de la MeCbl ont été décrites et toutes peuvent être identifiées chez des procaryotes (Table 1.5) (Banerjee and Ragsdale, 2003 ; Rodionov et al., 2003 ; Zhang et al., 2009 ; Sañudo-Wilhelmy et al., 2014).

Chez les eucaryotes, trois enzymes cobalamine-dépendantes ont été décrites jusqu'à présent : la méthionine synthase (METH), la méthylmalonyl-CoA mutase et la ribonucléotide réductase de classe II (Table 1.5) (Banerjee and Matthews, 1990 ; Banerjee, 2006).

Chez les procaryotes et eucaryotes marins, les enzymes B₁₂-dépendantes sont généralement bien connues. Par exemple, les travaux de Sañudo-Wilhelmy et al. (2014) ont analysé la proportion de microorganismes marins possédant des enzymes B₁₂-dépendantes et ont conclu que la méthionine synthase METH est la cause la plus fréquente d'auxotrophie pour cette vitamine. Par des recherches de séquences homologues dans les grands taxons microbiens marins, ces auteurs ont proposé que la méthionine synthase B₁₂-dépendante

TABLE 1.5 – Liste des enzymes dépendantes de la vitamine B₁₂ et leur répartition dans le vivant.

Enzyme	E.C.	Cofacteur	Organismes
β -lysine-5,6-aminomutase	5.4.3.3	AdoCbl	Bactéries et Archées
D-ornithine-4,5-aminomutase	5.4.3.5	AdoCbl	Bactéries et Archées
Diol déshydratase	5.4.3.5	AdoCbl	Bactéries et Archées
Éthanolamine ammonia lyase	4.3.1.7	AdoCbl	Bactéries et Archées
Glutamate mutase	5.4.99.1	AdoCbl	Bactéries et Archées
Glycérol déshydratase	4.2.1.30	AdoCbl	Bactéries et Archées
Isobutyryl-CoA mutase	5.4.99.13	AdoCbl	Bactéries et Archées
Méthylèneglutarate mutase	5.4.99.4	AdoCbl	Bactéries et Archées
Méthylmalonyl-CoA mutase	5.4.99.2	AdoCbl	Bactéries, Archées et certains eucaryotes
Propanediol déshydratase	4.2.1.28	AdoCbl	Bactéries et Archées
Ribonucléotide réductase	1.17.4.2	AdoCbl	Bactéries, Archées et certains eucaryotes
Acétyl-CoA synthase	2.1.1.258	AdoCbl	Bactéries et Archées
Méthionine synthase	2.1.1.13	MeCbl	Bactéries, Archées, tous les métazoaires, majorité des eucaryotes (sauf végétaux à port dressés et mycètes)
Vanillate O-déméthylase	2.1.1.341	MeCbl	Bactéries et Archées

était encodée par plus de 80 % des taxons microbiens analysés (Cyanobactéries, Alpha- et Gamma-protéobactéries, Bacteroidetes et mircoorganismes eucaryotes). Il existe une isoforme B₁₂-indépendante de la METH : la méthionine synthase METE, qui serait traduite lors d'un manque de cobalamine dans l'environnement chez les organismes possédant les deux isoformes (Foster et al., 1964 ; Withfield et al., 1970). Les végétaux et les mycètes possèdent uniquement la METE (Duda et al., 1967 ; Brown, 2005). Les travaux de González et al. (1992) et Pejchal and Ludwig (2005) ont conclu qu'il y avait peu de similarité entre les séquences protéiques de METH et de METE. Les auteurs proposent que les deux protéines auraient évolué par duplication des gènes. Les organismes possédant la METE en plus de la METH ne sont pas considérés comme auxotrophes pour la cobalamine. Chez les Archées, Swithers et al. (2012) ont également montré que le clade des *Thermotoga* possèdent les deux isoformes B₁₂-dépendantes et B₁₂-indépendantes de la méthionine synthase et des ribonucléotides réductases. Les méthionine synthases, qu'elles soient cobalamine-dépendantes ou cobalamine-indépendantes, sont donc des enzymes présentes dans toutes les branches de l'arbre du vivant.

La méthionine synthase (METH) méthylcobalamine-dépendante catalyse la conversion du 5-méthyl-tétrahydrofolate et de l'homocystéine en tétrahydrofolate et méthionine, ce qui se traduit par deux demi-réactions de transfert de groupements méthyles : la cob(I)alamine récupère un méthyle du méthyltétrahydrofolate et est convertie en MeCbl, puis la MeCbl méthyle l'homocystéine en méthionine et est régénérée en cob(I)alamine (Figure 1.13). La cob(I)alamine hautement réactive est majoritairement reméthylée par le méthyltétrahydrofolate (Banerjee and Matthews, 1990 ; Drummond et al., 1993 ; Koutmos et al., 2009). La cob(I)alamine peut parfois être oxydée en cob(II)alamine en condition aérobie. Sa réactivation en cob(I)alamine est nécessaire pour être fonctionnelle de nouveau. Cette réactivation est assurée par la succession d'une réaction de réduction par une flavodoxine puis par une méthylation par la S-adénosylméthionine (SAM) (Drummond et al., 1993 ; Koutmos et al., 2009). La répartition de cette voie de réactivation de la MeCbl dans le vivant est inconnue.

Nous avons présenté les spécificités de la vitamine B₁₂, ses producteurs, ainsi que les enzymes la nécessitant pour leur activité. Les sections suivantes présenteront plus en détail l'utilisation de cette vitamine par les microalgues ainsi que les limitations environnementales en ce cofacteur.

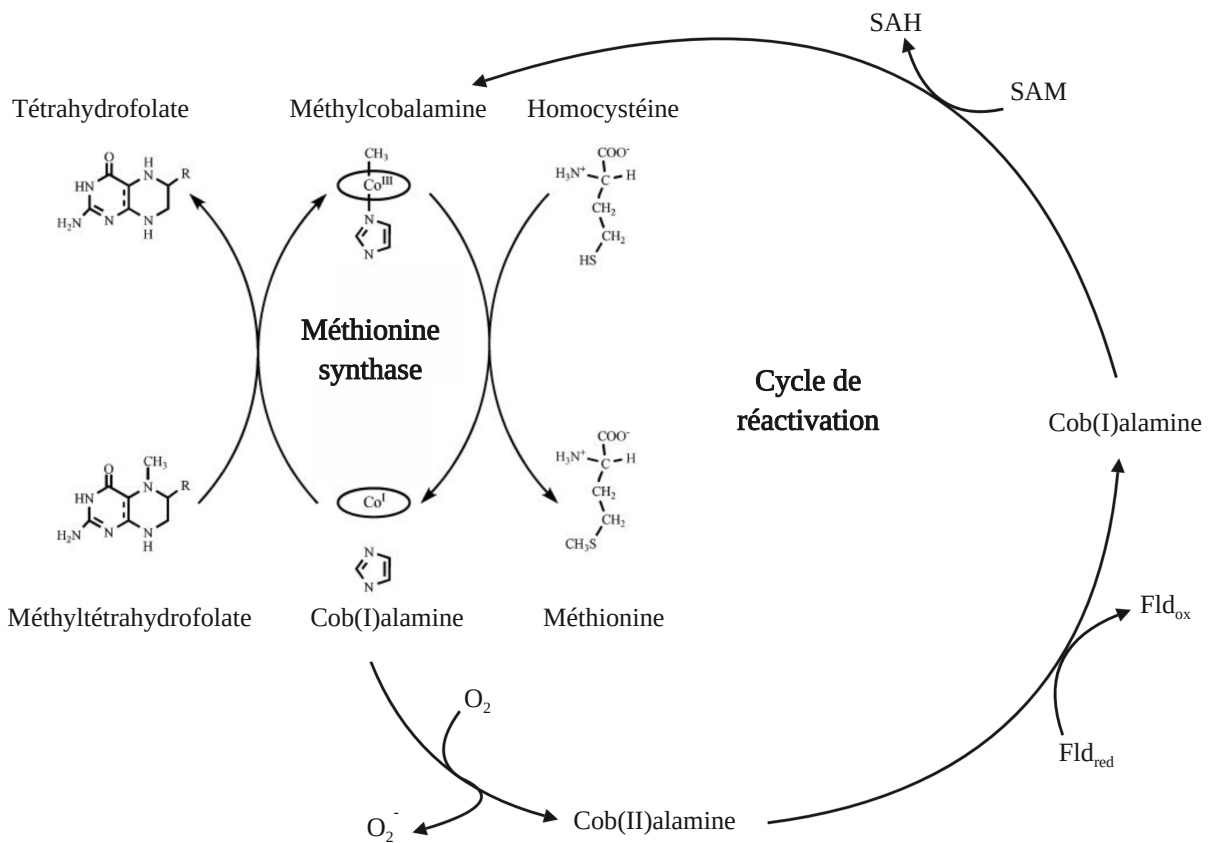


FIGURE 1.13 – Réaction de la méthionine synthase cobalamine-dépendante et cycle de réactivation de la molécule (modifié d'après Drummond et al. (1993), Brown (2005) et Koutmos et al. (2009)).

1.4.6 Interventions métaboliques de la B₁₂ chez les microalgues

Acquisition de la cobalamine

L'acquisition de la vitamine B₁₂ par les microalgues est mal connue. [Bertrand et al. \(2012\)](#) ont réalisé des analyses de protéomique afin d'identifier les remaniements métaboliques en lien avec un manque de vitamine B₁₂ chez les diatomées. Lors de ces expériences, ces auteurs ont identifié une protéine transmembranaire jusqu'à 160 fois plus accumulée lors d'une limitation en cobalamine chez la diatomée B₁₂-dépendante *Thalassiosira pseudonana* ainsi que chez son homologue B₁₂-indépendante *Phaeodactylum tricornutum*. Le suivi de l'acquisition de vitamine B₁₂ marquée par des lignées de *P. tricornutum* surexprimant la protéine a démontré que l'augmentation de la synthèse de cette protéine conduisait à une acquisition de vitamine B₁₂ de deux à trois fois supérieure à celle des lignées sauvages ([Bertrand et al., 2012](#)). Cette protéine, ensuite nommée la protéine d'acquisition de la cobalamine 1 (CBA1), est à ce jour la seule protéine identifiée dans les microalgues permettant l'import de cobalamine. La recherche d'homologues de cette protéine dans des échantillons naturels a été réalisée par ces auteurs et il semblerait que la CBA1 soit spécifique au phylum des Straménopiles (Diatomées et autres groupes d'algues tels qu'*Ectocarpus siliculosus* et *Aureococcus anophagefferens*) ([Bertrand et al., 2012](#)). La question de l'acquisition de la vitamine B₁₂ par les autres microalgues reste à élucider.

Méthionine synthases et vitamine B₁₂

L'auxotrophie pour la vitamine B₁₂ chez les microalgues est caractérisée par la présence d'une méthionine synthase B₁₂-dépendante (METH), ainsi que par l'absence de son isoforme indépendante de la vitamine B₁₂, la METE ([Croft et al., 2005](#)). Les espèces de microalgues indépendantes de la cobalamine encodent les deux isoformes de méthionine synthase ([Croft et al., 2005](#)). [Helliwell et al. \(2011\)](#) ont analysé les niveaux d'expression du gène *metE* et de la protéine correspondante chez les Chlorophytes *Gonium pectorale* et *Chlamydomonas reinhardtii* ainsi que sur la Diatomée *P. tricornutum*, cultivées avec et sans cobalamine. Les auteurs ont observé qu'en présence de vitamine B₁₂ les microalgues possédant la METE exprimaient préférentiellement le gène *metH* et la protéine correspondante. Les auteurs suggèrent que ce phénomène serait lié à une activité catalytique supérieure de la METH par rapport à son homologue cobalamine-indépendante ([González et al., 1992](#) ; [Helliwell et al., 2011](#)). L'expression de la METH à la place de la METE

serait plus avantageuse du fait de son coût métabolique moindre pour obtenir une activité biochimique équivalente (Helliwell et al., 2011). Les estimations, basées sur une analyse de la répartition des gènes *metH* et *metE* sur des représentants de chaque phylum de microalgues, ainsi que sur la culture de nombreuses espèces en absence de cobalamine, prévoient que 50 % des espèces de microalgues seraient auxotrophes pour la B₁₂ (Croft et al., 2005).

La question de la coexistence des deux gènes encodant la METH et la METE chez certaines microalgues a été étudiée par le laboratoire d'Alison Smith à l'Université de Cambridge. Helliwell et al. (2015) ont montré par des travaux d'évolution dirigée la perte d'une copie fonctionnelle du gène *metE* en moins de 500 générations chez *Chlamydomonas reinhardtii* cultivée en présence d'une source de vitamine B₁₂. La perte de fonctionnalité du gène semble liée à l'insertion d'un élément transposable dans la séquence du gène, décalant le cadre de lecture et empêchant sa bonne transcription. Par cette démonstration, ces auteurs suggèrent que l'auxotrophie pour la B₁₂ serait apparue suite à de multiples phénomènes de perte du gène *metE* au cours de l'évolution. Ils proposent que ceci pourrait être le résultat de processus de diminution de la pression de sélection sur le gène *metE*, dus à la présence de bactéries productrices de B₁₂ dans la phycosphère rendant disponible ce cofacteur pour les algues. Il existe des espèces d'algues dont les génomes n'encodent que la METE, telles que la Chlorophyte *Coccomyxa* sp. C-169 et de la Rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae* (Helliwell et al., 2011). L'origine évolutive de ces espèces est difficile à expliquer.

Pour expliquer la présence de la METE seule chez les végétaux terrestres et *C. merolae*, les auteurs suggèrent que la METE pourrait tirer son origine de l'ancêtre eucaryote d'avant l'endosymbiose primaire d'une cyanobactérie. La majorité des algues auraient conservé la copie cyanobactérienne du gène *metE*, alors que les végétaux terrestres auraient gardé la copie eucaryote (Helliwell et al., 2011). Certains taxons ancestraux auraient ainsi conservé les deux copies du gène pendant une partie de leur évolution, qui aurait été suivie de multiples phénomènes de perte du gène. La duplication du gène suivie d'une divergence pourrait être à l'origine du remplacement de la METH ou de la copie cyanobactérienne de la METE chez les végétaux terrestres et certaines algues (Helliwell et al., 2011).

Comme expliqué précédemment, la METH catalyse en présence de MeCbl la conversion du méthyltétrahydrofolate (MeTHF) en tétrahydrofolate (THF) et de l'homocystéine

en méthionine, un acide aminé indispensable présent dans presque toutes les protéines. Le THF est également essentiel car impliqué dans la synthèse des bases puriques (Scott, 1999). Cette conversion s'intègre au sein du cycle de la méthionine, qui permet la régénération de l'homocystéine pour créer de la méthionine (Figure 1.14). Une fois synthétisée, la méthionine peut être intégrée dans les protéines ou pour la synthèse d'autres métabolites, comme le diméthylsulfoniopropionate (DMSP). La méthionine peut aussi être convertie en S-adenosylméthionine (SAM), un donneur de groupements méthyle, par la méthionine adénosyl transférase (MAT) (Figure 1.15). La SAM est alors utilisée comme donneur de groupements méthyles pour de nombreuses réactions biochimiques, ce qui produit de la S-adenosylhomocystéine (SAH) (Figure 1.15). La SAH est à son tour recyclée en homocystéine par la S-adenosylhomocystéine hydrolase (SAHH) (Figure 1.15).

Autres enzymes B₁₂-dépendantes chez les microalgues

Deux autres enzymes identifiées chez les microalgues nécessitent la cobalamine en cofacteur enzymatique : la méthylmalonyl-CoA mutase (MMCM) et la ribonucléotide reductase de classe II (RNR II) (Hamilton, 1974 ; Miyamoto et al., 2004). La MMCM utilise l'AdoCbl pour convertir le (R)-méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA et représente une des entrées du cycle de Krebs (Takashi-Iñíguez et al., 2012) (Figure 1.14). Les RNR II utilisent également l'AdoCbl pour produire les désoxyribonucléotides à partir de ribonucléotides, réaction essentielle à la biosynthèse d'ADN (Sengupta, 2014) (Figure 1.14). Les analyses génomiques réalisées lors des travaux de Helliwell et al. (2011) ont identifié une MMCM B₁₂-dépendante chez toutes les microalgues appartenant au phylum des Chromalvéolates analysées (6 au total). La répartition exacte de ces deux enzymes chez les microalgues reste peu connue.

Croft et al. (2005) ont observé que les microalgues encodant la METH et n'ayant pas la METE ne se développaient pas dans un milieu carencé en vitamine B₁₂, et ce indépendamment de la présence de la MMCM et des RNR II. Inversement, la présence de la METE seule permet aux microalgues de se développer sans ajout de cobalamine, peu importe le nombre d'autres enzymes B₁₂-dépendantes. Ces observations ont conduit les auteurs à admettre que la réaction réalisée par la METH est la seule critique pour la croissance des microalgues cobalamine-dépendantes. Pour cette raison, il est supposé que des mécanismes compensatoires existent et permettent de pallier le manque de cofacteur pour l'activité de la MMCM et des RNR II.

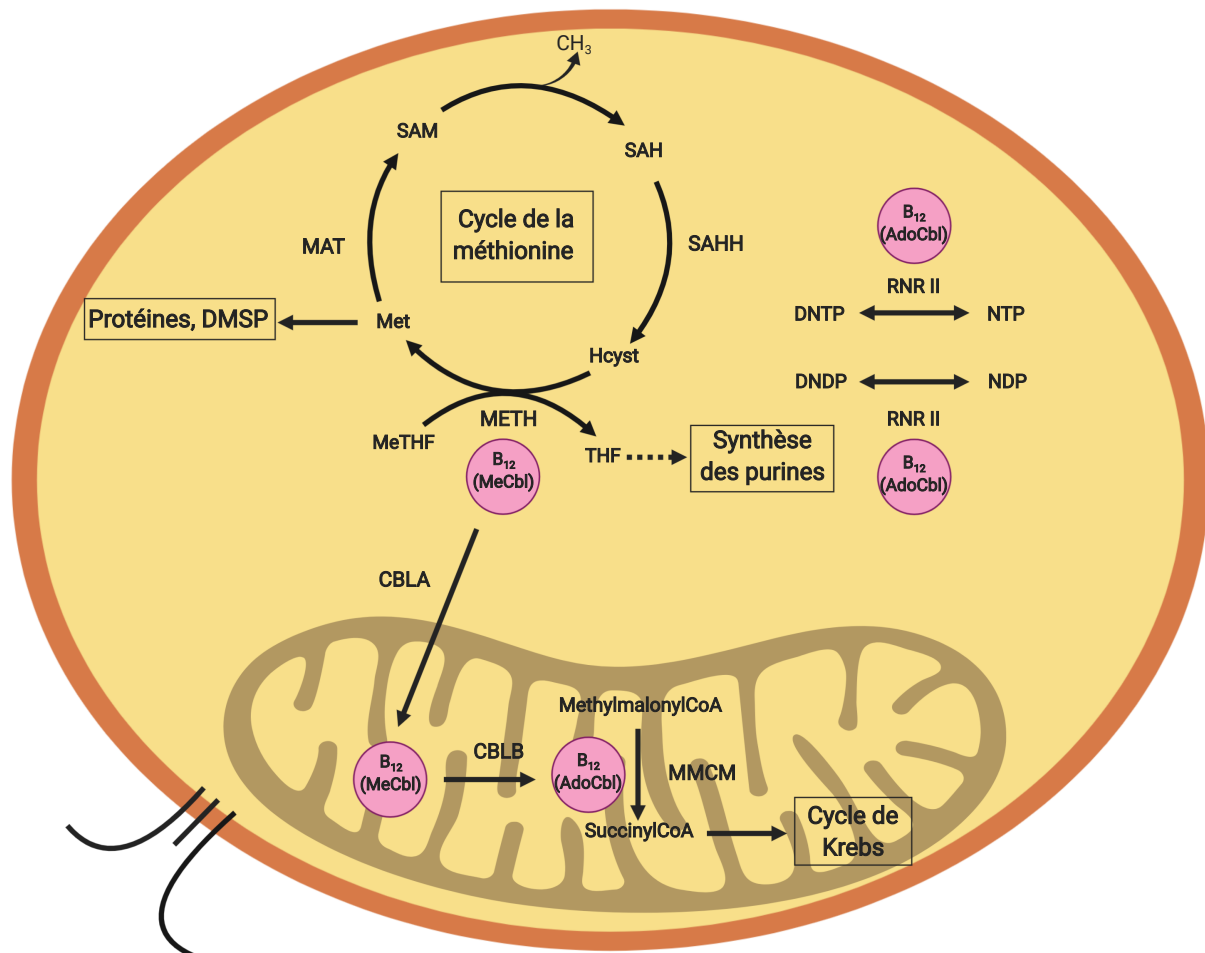


FIGURE 1.14 – Illustration schématique de l'implication de la vitamine B₁₂ dans le métabolisme des microalgues. Hcyst : homocystéine, MAT : méthionine adénosyltransférase, Met : méthionine, MeTHF : méthyltétrahydrofolate, MMCM : méthylmalonyl-CoA mutase, RNR II : ribonucléotides reductases de classe II, SAH : S-adenosylhomocystéine, SAHH : S-adenosylhomocystéine hydrolase, SAM : S-adenosylméthionine, THF : tétrahydrofolate.

Protéines accessoires du métabolisme de la B₁₂

Deux autres protéines accessoires, qui n'utilisent pas la cobalamine comme cofacteur, semblent étroitement liées au transport de la vitamine dans la cellule. Ces protéines sont la CBLA, une protéine chaperone permettant le transport de la vitamine B₁₂ à la mitochondrie sous la forme de MeCbl (Dobson et al., 2002b) (Figure 1.14). Une fois à l'intérieur de la mitochondrie, la MeCbl peut être convertie en adénosylcobalamine (AdoCbl) par la CBLB, ce qui rend disponible le cofacteur pour l'activité de la MMCM (Dobson et al., 2002a) (Figure 1.14). L'étude de Helliwell et al. (2011) a permis d'identifier la CBLA et la CBLB chez la plupart des microalgues qui encodent la MMCM. La CBLB a de plus été identifiée chez des microalgues chez lesquelles la MMCM semble absente. Les auteurs suggèrent que le gène de la CBLB aurait été conservé après la perte du gène de la MMCM (Helliwell et al., 2011). Toutes ces protéines semblent être encodées dans le génome nucléaire des microalgues (Helliwell et al., 2014).

1.4.7 Importance des métabolites issus de l'utilisation de la B₁₂ chez les microalgues

Cette section a pour but de souligner l'importance de la réaction permise par la méthionine synthase, à l'origine de la synthèse de métabolites cellulaires essentiels.

Le THF, ou acide folique, issu de la conversion du méthyltétrahydrofolate, est essentiel dans le métabolisme monocarboné pour la synthèse des bases nucléiques (Scott, 1999). La méthionine est le premier acide aminé (codon start) des protéines, et peut être convertie en S-adénosyl méthionine (SAM) (Figure 1.15). La SAM est un donneur universel de groupements méthyles impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires dont nous présenterons certaines particularités dans cette section (Chiang et al., 1996 ; Kozbial and Mushegian, 2005). Ce métabolite est par exemple nécessaire à l'activité des méthyltransférases, des enzymes assurant un grand nombre de réactions de méthylation dans la cellule, telles que la synthèse de phosphatidylcholine, un phospholipide retrouvé dans la plupart des eucaryotes (Hirashima et al., 2017), ou les réactions de méthylation de l'ADN, essentielles dans la régulation de l'expression des gènes (Chiang et al., 1996 ; Struck et al., 2012) (Figure 1.15). La forte méthylation de l'ADN des Dinoflagellés suggère que leur demande en vitamine B₁₂, pour les espèces auxotrophes, sera potentiellement plus élevée que celle des autres taxons de microalgues (Lin, 2011). Chez certaines espèces de microalgues, la

SAM peut transférer son groupement méthyle à la ThiC, une enzyme spécifiquement impliquée dans la synthèse de la vitamine B₁ (Bertrand and Allen, 2012). La SAM intervient également dans la synthèse des polyamines et des polyamines à longue chaîne, des constituants essentiels du frustule des Diatomées, à partir de l'ornithine (Köger and Poulsen, 2008) (Figure 1.15).

La synthèse de DMSP, un composé important du cycle du soufre (voir section 1.1.5), nécessite une molécule de méthionine comme squelette carboné initial. Sa production nécessite de plus un groupement méthyle transféré à partir de la SAM. Comme nous l'avons vu précédemment, les microalgues les plus productrices de DMSP sont les Haptophytes et les Dinoflagellés (Keller, 1989 ; Matrai and Keller, 1994 ; Keller et al., 1999 ; Malin and Steinke, 2004 ; Franklin et al., 2010). Chez les microalgues, le DMSP est supposé jouer un rôle dans la balance osmotique et la régulation de l'assimilation du soufre et de l'azote (Stefels, 2000). En conséquence, la synthèse de méthionine sera donc potentiellement plus critique pour le métabolisme de ces taxons chez lesquels la production de DMSP est élevée.

Nous avons abordé de façon non exhaustive l'importance de la vitamine B₁₂ dans le métabolisme des microalgues par le prisme de la SAM, un métabolite issu de la conversion de la méthionine par la méthionine adénosyl transférase. Ainsi, la B₁₂ est non seulement nécessaire à l'activité d'un nombre restreint d'enzymes mais est aussi liée de façon indirecte à l'activité de voies métaboliques variées qui permettent un bon fonctionnement cellulaire.

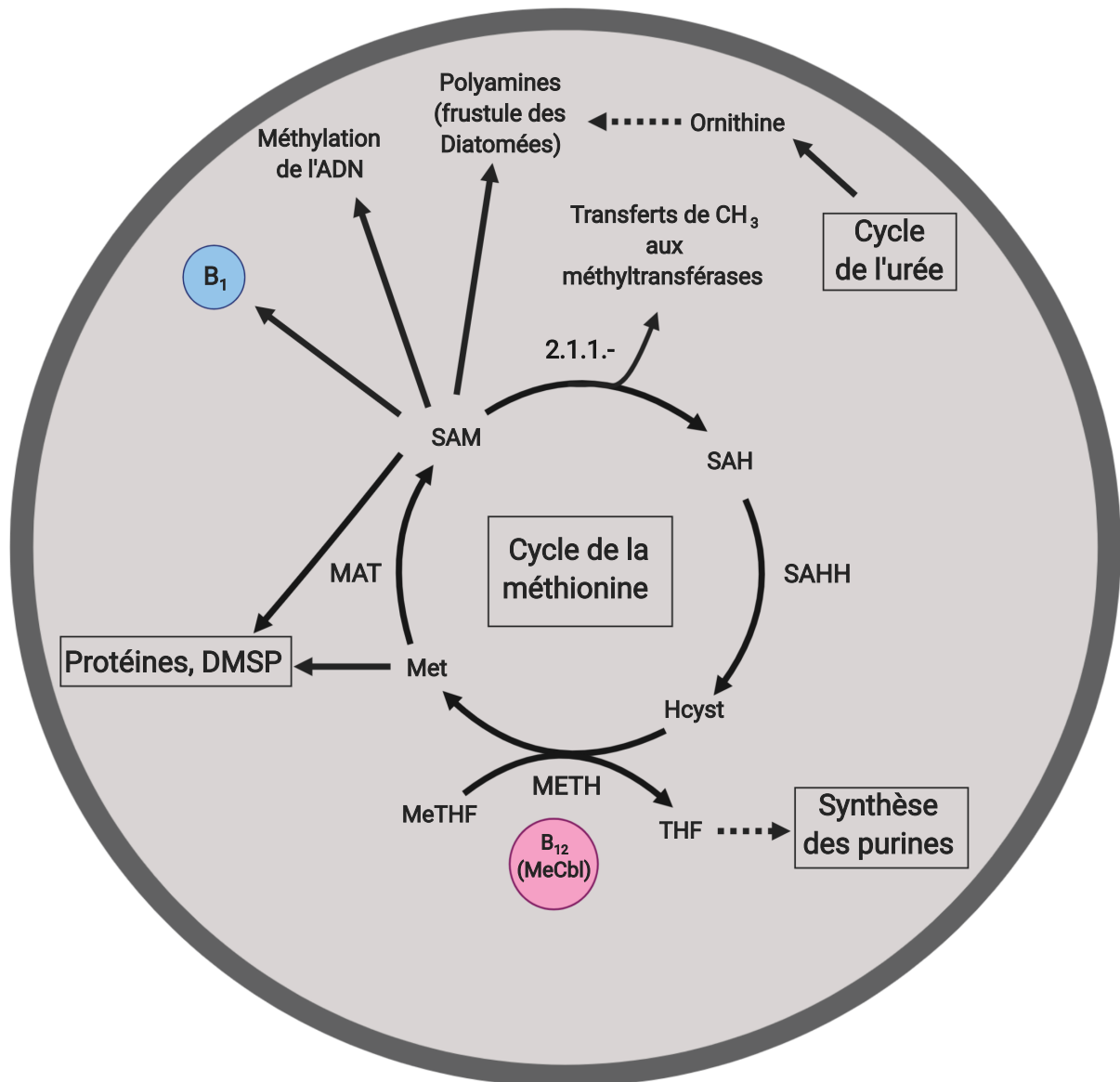


FIGURE 1.15 – Illustration schématique de l'implication de la B₁₂ dans le métabolisme microalgale par le biais de la S-adenosyl méthionine (SAM).

1.4.8 Concentrations naturelles en vitamine B₁₂ et limitation de la croissance des microalgues par la B₁₂

Concentrations naturelles en vitamine B₁₂

Nous avons vu précédemment que la vitamine B₁₂ est synthétisée exclusivement par certaines espèces de bactéries et d'Archées. Leur présence et leur productivité locales réguleront donc fortement la disponibilité en ce cofacteur pour les microalgues auxotrophes.

Les méthodes de mesure de la vitamine B₁₂ principalement utilisées sont les méthodes chromatographiques par HPLC et UPLC, parfois couplées à la spectrométrie de masse, permettant de différencier les formes de cobalamine, le test microbiologique, ainsi que les méthodes immunologiques de type ELISA. Ces méthodes sont discutées en annexe A.

La Table 1.6 présente les concentrations en cobalamine mesurées dans les systèmes marins d'après la littérature. Les concentrations en vitamine B₁₂ dissoute dans le milieu océanique sont variables et vont de valeurs en-dessous des limites de détection (en-dessous de 0,1 ng/L) en milieu océanique ouvert, à des concentrations jusqu'à plus de 100 ng/L dans les systèmes côtiers urbanisés (Sañudo-Wilhelmy et al., 2006). Une tendance se dégage cependant : les zones littorales sont la plupart du temps les plus riches en cobalamine, alors que les zones à régime océanique sont les plus pauvres. Le facteur anthropique semble jouer un rôle prépondérant dans le gradient de concentrations. En effet, Okbamichael and Sañudo-Wilhelmy (2004) ont montré qu'il y avait plus de vitamine dissoute retrouvée dans les zones côtières avec une forte contamination anthropique, liée en partie aux effluents domestiques (compléments alimentaires, ordures ménagères, médicaments, etc.). L'activité bactérienne élevée dans ces zones anthropisées, mise en évidence lors des travaux de Okbamichael and Sañudo-Wilhelmy (2004), peut aussi expliquer partiellement ce phénomène. Les zones où le temps de résidence des masses d'eau est élevé et où la profondeur est faible, telles que les baies semi-fermées, sont aussi plus riches en cobalamine (Okbamichael and Sañudo-Wilhelmy, 2004).

Les zones océaniques les plus pauvres en vitamine B₁₂ sont l'Océan Austral, l'Océan Pacifique Nord et des zones variables de l'Atlantique (Fiala and Oriol, 1984 ; Panzeca et al., 2009 ; Suffridge et al., 2018) (Table 1.6). Des expériences d'amendement de cobalt dans certaines de ces régions ont montré un regain de la production bactérienne de vitamine B₁₂ (Panzeca et al., 2008). Les concentrations en cobalt, le noyau métallique indis-

pensable à la synthèse de cobalamine, seraient donc localement trop faibles et limiteraient la synthèse bactérienne de B₁₂ (Panzeca et al., 2009).

Les gradients verticaux en cobalamine ont aussi été analysés lors de différentes études. Sañudo-Wilhelmy et al. (2012) ont observé une déplétion rapide en surface et un enrichissement en zone mésopélagique supérieure dans des stations de l'Océan Pacifique (ALOHA, San Pedro Ocean Time Series, Magdalena, Santa Catalina 1 et 2). Les récents travaux de Suffridge et al. (2018) ont analysé un transect entre la Mer Méditerranée et l'Atlantique et les auteurs ont montré une corrélation entre la diminution de la proportion de B₁₂ dissoute et l'augmentation en B₁₂ particulaire en surface. De plus, leurs résultats ont indiqué des corrélations fortes entre les concentrations en cobalamine et l'abondance bactérienne dans certaines zones de l'Atlantique (Suffridge et al., 2018). Ces patrons de concentrations verticales seraient probablement liés à une activité des bactéries hétérotrophes, qui excrèteraient de la vitamine B₁₂, utilisée ensuite par le phytoplancton (Suffridge et al., 2018).

Alors que plusieurs études ont mesuré le pool intracellulaire des différentes variantes de vitamine B₁₂, peu de travaux ont analysé les proportions des différentes formes de la cobalamine retrouvées dans l'eau de mer. La sensibilité à la lumière de la MeCbl et de l'AdoCbl pose une difficulté technique supplémentaire pour leur quantification. L'étude de Heal et al. (2014) a été la première à analyser les concentrations dissoutes des différentes formes de cobalamine dans des échantillons provenant de baies semi-fermées de l'Océan Atlantique. Les auteurs ont observé que l'OHCB₁₂ était majoritaire (70-80 %), suivie par l'AdoCbl et la MeCbl (entre 25 et 40 %) et des traces de CNCbl (Heal et al., 2014). Comme nous l'avons vu précédemment, l'OHCB₁₂ est générée du fait de la photolyse de l'AdoCbl et de la MeCbl. Une conversion partielle de la MeCbl et de l'AdoCbl en OHCB₁₂ par photolyse, naturelle ou causée par un biais expérimental d'exposition des échantillons à la lumière, pourrait potentiellement en être la cause (Heal et al., 2014).

À l'inverse, Suffridge et al. (2018) ont montré que la forme majoritaire de cobalamine dissoute dans le milieu le long d'un transect Méditerranée-Atlantique était la MeCbl (jusqu'à 75 % du total), suivie par l'OHCB₁₂ et l'AdoCbl (jusqu'à 20-25 %) et enfin par des niveaux presque indétectables de la CNCbl (jamais plus de 5-7 %). Ces concentrations de MeCbl peuvent sembler élevées étant donné que la MeCbl est sensible à la photodégradation, mais les auteurs proposent que la photosensibilité de la molécule pourrait être compensée par le fait que son groupement partant est plus faible que celui de l'AdoCbl

et de l'OHCbl en solution aqueuse ([Mebs et al., 2009](#) ; [Suffridge et al., 2018](#)).

TABLE 1.6 – Concentrations en vitamine B₁₂ mesurées dans différents écosystèmes marins et méthodes de mesure associées. HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance ; LC-MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse ; UPLC : chromatographie en phase liquide à haute pression. Table modifiée et amendée d'après [Sañudo-Wilhelmy et al. \(2014\)](#).

Zone	Concentration B ₁₂ (ng/L)	Méthode	Référence
Océan Austral	0,6 - 6,0	HPLC	(Panzeca et al., 2009)
Sud de l'Océan Indien	0,2 - 4,7	Microbiologique	(Fiala and Oriol, 1984)
Océan Pacifique Nord-Est	0 - 4,3	Microbiologique	(Carlucci and Silbernagel, 1966)
Océan Atlantique Nord (surface)	0,2 - 0,4	HPLC	(Panzeca et al., 2008)
Mer des Sargasses	0 - 0,5	Microbiologique	(Menzel and Spaeth, 1962)
Gradient méditerranéen jusqu'à l'Atlantique (dissout)	8,0 - 32,0	LC-MS	(Suffridge et al., 2018)
Gradient méditerranéen jusqu'à l'Atlantique (particulaire)	8,0 - 40,0	LC-MS	(Suffridge et al., 2018)
Mer Méditerranée	0,8 - 9,8	HPLC	(Bonnet et al., 2013)
Gradient côtier ouest des États-Unis	5,0 - 40,0	HPLC	(Okbamihael and Sañudo-Wilhelmy, 2004)
Côte Ouest des États-Unis (Long Island)	3,2 - 23,7	HPLC	(Gobler et al., 2007)
Côte Ouest des États-Unis (Long Island)	7,9 - 137,5	HPLC	(Sañudo-Wilhelmy et al., 2006)
Côte de Washington (États-Unis)	7,9 - 15,8	UPLC-MS	(Heal et al., 2014)
Baie de San Pedro (Californie, États-Unis)	0,3 - 2,8	HPLC	(Panzeca et al., 2009)
Basse Californie (États-Unis)	0 - 47,4	LC-MS	(Sañudo-Wilhelmy et al., 2012)
Baie de Todos Santos (Mexique)	0,3 - 95,0	HPLC	(Panzeca et al., 2009)
Zone d'upwelling (Mexique)	0,1 - 11,0	HPLC	(Panzeca et al., 2009)
Golfe de Gascogne	0,2 - 6,0	Microbiologique	(Daisley, 1958)

Limitation de la B₁₂ pour le développement du phytoplancton

La limitation en vitamine B₁₂ pour la croissance phytoplanctonique a été mise en évidence à plusieurs reprises dans la littérature. Dans l'Océan Atlantique par exemple, [Gobler et al. \(2007\)](#) ont réalisé des expériences d'amendement de cobalamine, d'azote et un mélange des deux nutriments, lors d'incubation d'échantillons naturels. Les auteurs ont observé une augmentation du développement phytoplanctonique après ajout de vitamine B₁₂. De la même manière, [Sañudo-Wilhelmy et al. \(2006\)](#) ont effectué des amendements de cobalamine seule et de cobalamine ainsi que d'azote dans des échantillons issus de baies le long de la côte des États-Unis. L'ajout de vitamine B₁₂ a permis d'augmenter la biomasse phytoplanctonique pour la fraction supérieure à 5 µm, ce qui suggère une limitation en vitamine B₁₂.

Des expériences similaires ont été réalisées avec des échantillons provenant du Golfe d'Alaska (Océan Pacifique) par [Koch et al. \(2011\)](#). L'incubation des cultures avec ajout de nitrates (20 µmol/L) et/ou de B₁₂ (100 pmol/L) en bouteilles a montré que l'amendement de B₁₂ seule ou avec d'autres nutriments a permis le développement des microalgues, en particulier pour les Dinoflagellés *Alexandrium* sp. et *Gymnodinium* sp. ainsi que la Diatomée *Chaetoceros* sp.

Les auteurs ont par la suite réalisé cette expérience à plusieurs reprises lors d'un cycle annuel et ont conclu que la cobalamine limitait ou co-limitait avec l'azote le développement du phytoplancton en été et à l'automne ([Koch et al., 2012](#)). De plus, ces auteurs ont noté une internalisation plus rapide de la B₁₂ dans la fraction bactérienne que dans la fraction phytoplanctonique après ajout du nutriment, ce qui suggérerait un phénomène de compétition avec les bactéries pour l'accès à la cobalamine. Pour conclure cette section, nous souhaitons insister sur le fait que la vitamine B₁₂ était limitante pour le développement du phytoplancton, seule ou avec d'autres nutriments, dans tous les systèmes marins où des expériences d'amendement de ce cofacteur ont été effectuées.

1.4.9 Interactions microbiennes pour la vitamine B₁₂ dans les systèmes marins

Nous avons vu que les concentrations naturelles de vitamine B₁₂ sont généralement faibles dans les écosystèmes marins, et de nombreuses données ont mis en évidence la limitation en vitamine B₁₂ pour le développement du phytoplancton. Nous avons également abordé l'importance de ce cofacteur enzymatique chez les algues B₁₂-dépendantes pour assurer le métabolisme monocarboné et les réactions de transfert de groupements méthyle. Ainsi, les microalgues nécessitant la vitamine B₁₂ ne pourraient en obtenir des quantités suffisantes que par sa source primaire : des procaryotes producteurs de B₁₂. Nous ignorons cependant si dans le milieu naturel des procaryotes pourvoient les microalgues auxotrophes en cobalamine par une relation réciproque, ou bien si c'est leur lyse, naturelle (autolyse) ou forcée par des mécanismes chimiques (virus, molécules bactéricides par exemple), qui permet le relargage de la vitamine dans la phycosphère. Dans cette optique, ces procaryotes auraient une interaction mutualiste ou commensale avec les microalgues.

Plusieurs études ont apporté des éléments de réponse au fonctionnement des interactions microbiennes pour la vitamine B₁₂. Le travail de [Croft et al. \(2005\)](#) a par exemple montré qu'en présence de fucoïdine, un sucre produit par des algues, une bactérie du genre *Halomonas* sp. se développait plus vite et qu'en même temps la concentration en B₁₂ dans le milieu augmentait, suggérant une excrétion du cofacteur par la bactérie en réponse à l'excrétion d'un métabolite algal. Des co-cultures de la souche de *Halomonas* sp. avec différentes espèces de microalgues auxotrophes (Chlorophytes et Rhodophytes) pour la B₁₂ ont montré une levée de la carence en ce cofacteur, corroborant l'hypothèse de l'échange de nutriments.

Dans la même veine, [Kazamia et al. \(2012\)](#) ont étudié les mécanismes de régulation de co-cultures d'une microalgue d'eau douce, *Lobomonas rostrata* (Chlorophytes) et d'une bactérie hétérotrophe productrice de cobalamine, *Mesorhizobium loti*. Cultivées ensemble en mode semi-continu, la biomasse des deux populations s'équilibre naturellement et ce indépendamment du ratio microalgue-bactérie initial. L'ajout d'une source de carbone à la co-culture conduit à un déséquilibre de l'association en faveur de la bactérie hétérotrophe, qui ne synthétise plus suffisamment de vitamine B₁₂ pour assurer la croissance de la microalgue. Le phénomène inverse est observé lors de l'ajout de vitamine B₁₂ dans la

co-culture qui permet à *L. rostrata* de se développer sans dépendre de l'excrétion bactérienne. La microalgue excréant moins de carbone, la biomasse bactérienne s'en retrouve diminuée. Les auteurs ont également montré qu'il n'y avait pas besoin de contact direct entre les deux organismes, pour lesquels l'échange de nutriment semble avoir lieu de façon passive (Kazamia et al., 2012). L'analyse de données de protéomique sur ces co-cultures a mis en évidence une réduction de l'activité photosynthétique de la microalgue et les auteurs ont suggéré une excrétion d'acides aminés par l'algue permettant la croissance de la bactérie en échange de vitamine B₁₂ (Helliwell et al., 2018).

Chaque taxon d'algue regroupe des espèces nécessitant une combinaison d'une, deux ou trois vitamines du groupe B que sont la B₁, la B₇ et la B₁₂ (Croft et al., 2006). Des phénomènes d'interdépendance des microalgues et des bactéries pour les vitamines du groupe B ont été proposés lors de l'étude de Cruz-López et al. (2018). La bactérie marine *Dinoroseobacter shibae* possède l'équipement génétique pour synthétiser les vitamines B₁ et B₁₂, pour lesquelles le dinoflagellé marin *Lingulodinium polyedrum* est auxotrophe. En retour de ces deux vitamines, le dinoflagellé excréterait de la vitamine B₇, nécessaire au développement de *D. shibae*. La vitamine B₇ n'ayant été retrouvée dans le milieu extracellulaire qu'en présence des deux microorganismes, les auteurs proposent une relation mutualiste basée sur la capacité de chaque membre de la communauté à synthétiser des cofacteurs indispensables aux autres.

Nous avons précisé précédemment que les Cyanobactéries synthétisent de la pseudocobalamine, faiblement métabolisable par les microalgues (Bonnet et al., 2010 ; Helliwell et al., 2016). L'étude de Helliwell et al. (2016) a montré que les algues *Chlamydomonas reinhardtii* et *Pavlova lutheri* étaient capables de remodeler la pseudocobalamine si du diméthylbenzimidazole (ligand axial inférieur de la cobalamine métabolisable, voir section 1.4.2) était présent. La cobalamine ainsi produite était ainsi rendue disponible pour d'autres espèces B₁₂-auxotrophes. Les travaux de Romine et al. (2017), qui combinent des données environnementales, génomiques, écophysiologiques et de modélisation ont mis en évidence des réseaux microbiens complexes pour l'accès aux cofacteurs. Les différents groupes bactériens auraient chacun des spécificités métaboliques, permettant un échange réciproque de cofacteurs optimisant la survie de l'ensemble de la communauté bactérienne. De la même manière, Gómez-Consarnau et al. (2018) ont analysé la répartition des producteurs de vitamines du groupe B sur une année en échantillonnant des données de métatranscriptomique provenant de la côte Géorgienne de l'Océan Atlantique. Leurs

résultats ont montré que les Rhodobacterales étaient responsables de la synthèse de vitamine B₁₂, les Flavobactéries quant à elles synthétisaient la vitamine B₇ et d'autres groupes bactériens minoritaires (moins de 4 % du total) produisaient de la B₁ (Gómez-Consarnau et al., 2018). La capacité de certains taxons à rendre accessible certains facteurs de croissance pour d'autres suggère une interrelation complexe entre les microorganismes pour l'accès aux vitamines, et à la vitamine B₁₂ en particulier.

La grande majorité de ces études se sont focalisées sur les Chlorophycées et les Diatomées ainsi que quelques Dinoflagellés. Ce projet de thèse vise ainsi à apporter des connaissances concernant le groupe des Haptophytes. La section suivante abordera donc les spécificités de la division des Haptophytes et présentera l'espèce modèle étudiée lors de ces travaux de thèse.

1.5 Présentation des haptophytes et du modèle d'étude : *Ti-sochrysis lutea*

1.5.1 Le phylum des *Haptophyta*

Les Haptophytes sont des microalgues caractérisées par la présence d'un appendice qui vient se supplémenter aux deux flagelles moteurs, l'haptonème. Cette organelle semble avoir un rôle dans la nutrition cellulaire, en particulier pour la phagotrophie (Figure 1.16) (Kawachi and Inouye, 1995).

Les Haptophytes forment un groupe de microalgues ubiquistes (Jordan and Chamberlain, 1997 ; O'Brien et al., 2013), qui tendent à dominer les eaux océaniques oligotrophes (Reynolds, 2006 ; Eikrem et al., 2016). Les microalgues haptophytes présentent une taille cellulaire entre 0,2 et 30 μm (Eikrem et al., 2016) et un grand nombre de ces espèces sont comprises entre 0,2 et 2 μm (Jardillier et al., 2010 ; Kirkham et al., 2011). Ces microalgues appartiennent donc au pico (<3 μm) et au nanoplancton (3-30 μm) et peuvent contribuer à hauteur de 50 % à ces communautés hors condition de bloom (Thomsen et al., 1994 ; Not et al., 2008). La diversité des microalgues haptophytes a été sous-estimée du fait des difficultés d'identification des espèces de petite taille (Edvardsen et al., 2016 ; Eikrem et al., 2016) et les méthodes d'analyse moléculaire des gènes de l'ADNr 18S ont conduit à une meilleure appréciation de leur diversité (Moon-van der Staay et al., 2001 ; Edvardsen et al., 2016).

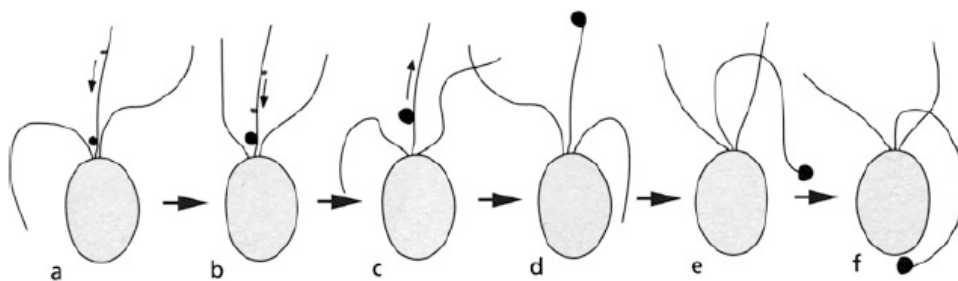


FIGURE 1.16 – Illustration de l'utilisation de l'haptonème pour la nutrition chez une microalgue haptophyte. (a-c) Les particules adhèrent à l'extrémité distale de l'haptonème, s'agrègent en région proximale puis sont de nouveau amenées en région distale. (d-f) Les particules sont amenées à l'extrémité de l'haptonème puis sont déposées à la surface cellulaire postérieure pour être internalisées par phagotrophie (modifié d'après Kawachi and Inouye (1995) ; Eikrem et al. (2016)).

Les premières algues haptophytes seraient apparues il y a environ 824 millions d'années (Liu et al., 2010). L'origine évolutive des Haptophytes est sujette à débat car ces espèces possèdent des génomes composites. En effet, l'analyse de l'ADN plastidial de ces algues montre des similitudes avec ceux des Cryptophytes et des Straménopiles et suggère donc une origine à partir des Rhodophytes (Cuvelier et al., 2010), alors que de nombreux gènes nucléaires suggèrent une ascendance avec des Prasynophytes, tirant son origine d'une endosymbiose secondaire d'une Chlorophyte. Les analyses phylogénétiques placent donc actuellement les Haptophytes près des Straménopiles du fait de l'homologie des génomes des plastes (Andersen, 2004).

Le phylum des Haptophytes est monophylétique et se divise en trois classes, les Pavlovophycées, les Rapphephycées et les Prymnesiophycées (Eikrem et al., 2016). *Tisochrysis lutea*, l'espèce d'étude de ce travail de thèse, appartient à cette dernière classe (Bendif et al., 2013). Les Pavlovophycées et les Prymnesiophycées sont les classes majoritaires de Haptophytes retrouvées dans les océans, pour lesquelles 13 (Bendif et al., 2011) et 378 espèces ont été recensées respectivement (Jordan et al., 2004 ; Bendif et al., 2013).

Les Prymnesiophycées se caractérisent par la présence de coccolithes, des écailles calcaïques ornementées protégeant les cellules, qui sont considérées comme des témoins fossiles en géologie (Hermoso, 2014). Les Haptophytes formant ces coccolithes sont plus couramment décrites sous le nom de coccolithophores. Les carbonates de calcium issus de la sédimentation des coccolithes seraient à l'origine de la moitié des précipitations de carbonates dans les océans (Milliman, 1993). Les bassins sédimentaires et les falaises de craie actuels (Figure 1.17) sont des témoins de l'accumulation des carbonates de calcium des coccolithophores.

Certaines espèces haptophytes, telles que celles appartenant aux genres *Chrysochromulina*, *Emiliania*, *Gephyrocapsa*, *Phaeocystis* et *Prymnesium* peuvent former des efflorescences importantes visibles à l'œil nu et pouvant causer des mortalités de poissons du fait de l'hypoxie et ont des conséquences pour le cycle biogéochimique du carbone (Jordan and Chamberlain, 1997). De plus, les Haptophytes participent de façon importante au cycle du soufre du fait de leur capacité de production du diméthylsulfoniopropionate (DMSP) (Keller, 1989 ; Steinke et al., 1998 ; Liu et al., 2009 ; Jardillier et al., 2010 ; Franklin et al., 2010).

La majorité des Haptophytes vivent dans des milieux marins sous la forme de cellule solitaire, et certaines forment des colonies (Green and Parke, 1975). Certaines espèces ont



FIGURE 1.17 – Falaises calcaires d'Étretat (Normandie, France). Les stratifications sont le résultat de l'accumulation de couches de carbonates de calcium biogéniques. Image libre de droits.

été trouvées dans des milieux d'eau douce, et d'autres en tant que symbiontes de radiolaires ou de foraminifères (Gast et al., 2000 ; Decelle et al., 2012). Les modes trophiques de ces microalgues sont principalement phototrophique (Eikrem et al., 2016). Les Haptophytes peuvent aussi réaliser la phagotrophie d'autres microorganismes, tels que des bactéries (Marchant and Thomsen, 1994 ; Unrein et al., 2014).

1.5.2 *Tisochrysis lutea*, espèce haptophyte modèle

T. lutea a été initialement décrite sous le nom *Isochrysis affinis galbana*, car morphologiquement proche de l'espèce type du genre, *Isochrysis galbana* (Bendif et al., 2013). *Isochrysis affinis galbana* ayant été isolée de Tahiti, elle a été identifiée sous le nom de "Tahiti *Isochrysis*". Les travaux de Bendif et al. (2013) ont mis en évidence une nette séparation génétique entre ces deux espèces. Ceci a permis de classer l'algue dans un genre qui lui est propre et, parce que la cellule apparaît dans les tons jaune-orangés voire mordorés, à prendre la dénomination finale *Tisochrysis lutea*. La cellule mesure entre 4 et 9 μm en moyenne (Figure 1.18) (Bendif et al., 2013).

Tisochrysis lutea est une espèce marine appartenant à l'ordre des Isochrysidales, groupe monophylétique où l'haptonème est généralement réduit (Eikrem et al., 2016). Ce groupe semble s'être séparé des Coccolithales au Mésozoïque, il y a 250 Ma (Liu et al., 2010). Seules des espèces de cet ordre peuvent synthétiser des alcénones, des cétones insatu-

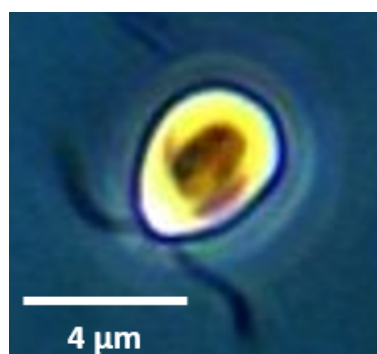


FIGURE 1.18 – Photographie en microscopie photonique d'une cellule de *Tisochrysis lutea* (grossissement x 500).

rées à longue chaîne, dont la fonction est encore à ce jour débattue. Ces composés sont néanmoins résistants à la diagénèse et servent donc de proxy pour les reconstitutions climatiques en paléoclimatologie (Marlowe et al., 1984). La famille de *T. lutea*, les Isochrysidacées, est constituée de genres qui forment des pseudo écailles et dont le cycle de vie est encore méconnu. Les travaux récents de Carrier et al. (2014) ont cependant suggéré que *T. lutea* serait capable de reproduction sexuée selon les conditions environnementales, et que son cycle de vie serait potentiellement haplo-diplophasique. Cette microalgue synthétise de l'acide docosahéxaénoïque (DHA), un acide gras oméga 3 et de l'acide stéridonique (SDA), précurseur du DHA. Bien que ces proportions varient en fonction des conditions écophysiologiques, *T. lutea* peut accumuler jusqu'à 30 % de sa masse sèche en lipides (Sheehan et al., 1998). Cette composition spécifique en fait une espèce d'intérêt pour la production aquacole, la nutrition humaine, les cosmétiques, ainsi que la production potentielle d'algocarburants.

La souche modèle étudiée durant les présents travaux est la CCAP 927/14, pour laquelle des données génomiques, transcriptomiques, protéomiques et relatives aux facteurs de transcription sont disponibles (Carrier et al., 2014 ; Garnier et al., 2016 ; Berthelier et al., 2018 ; Carrier et al., 2018 ; Thiriet-Rupert et al., 2018). Une récente méthode de transformation de l'espèce a été mise en place afin d'étudier les voies de biosynthèse des alcénones (Endo et al., 2018) et plusieurs souches mutantes ont été décrites (Bougaran et al., 2012 ; Carrier et al., 2014 ; Garnier et al., 2014). Enfin, de nombreuses informations biologiques à des conditions environnementales différentes ont été publiées sur *T. lutea*, faisant d'elle une espèce haptophyte modèle pour les études d'écophysiologie.

1.6 Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse s'intègre dans de grands questionnements concernant l'étude des facteurs qui régissent l'équilibre et les dynamiques des systèmes microbiens dans les océans. Les microalgues haptophytes sont ubiquistes et ont une importance écologique majeure. Nous nous heurtons cependant à un manque criant d'information concernant l'utilisation de la vitamine B₁₂ par ces microalgues ainsi que la nature de leur lien avec les producteurs de ce cofacteur, alors même que cette vitamine est limitante dans de nombreux écosystèmes marins et côtiers. En conséquence, comprendre les mécanismes permettant aux microalgues haptophytes d'acquérir et d'utiliser la vitamine B₁₂ permettrait d'apporter des éléments de réponse pour mieux comprendre l'influence des interactions biotiques en tant que processus régissant la production primaire marine.

Dans un contexte appliqué, l'ajout de bactéries productrices de vitamine B₁₂ dans les cultures de microalgues B₁₂-dépendantes permettrait de s'affranchir d'un intrant vitaminique. Les bactéries ainsi associées auraient également un rôle prophylactique du fait de l'occupation d'une niche écologique, réduisant la probabilité de contamination des cultures algale à grande échelle par des bactéries compétitrices indésirables. La robustesse des cultures de microalgues se retrouverait en théorie améliorée.

Les objectifs spécifiques de ces travaux visent à analyser l'effet d'une limitation en cette vitamine sur le métabolisme des Haptophytes ainsi qu'à comprendre les conditions d'acquisition de la B₁₂ produite par des bactéries. Ces objectifs ont été scindés en deux questions spécifiques :

- Quelle est la plasticité physiologique de *T. lutea*, microalgue haptophyte modèle, envers la disponibilité en vitamine B₁₂ dans le milieu et quels sont les mécanismes moléculaires associés ?
- Quelles sont les conditions environnementales qui permettraient à une bactérie productrice de B₁₂ d'assurer la croissance de *T. lutea* ?

Pour répondre à ces questions, nous avons considéré la microalgue haptophyte modèle d'intérêt biotechnologique, *Tisochrysis lutea*. La caractérisation de son métabolisme d'utilisation de la vitamine B₁₂ a été entreprise par des approches couplant des cultures contrôlées à différents niveaux de limitation en cobalamine, des méthodes d'analyse moléculaires et biochimiques. La sélection de souches bactériennes productrices de vitamine

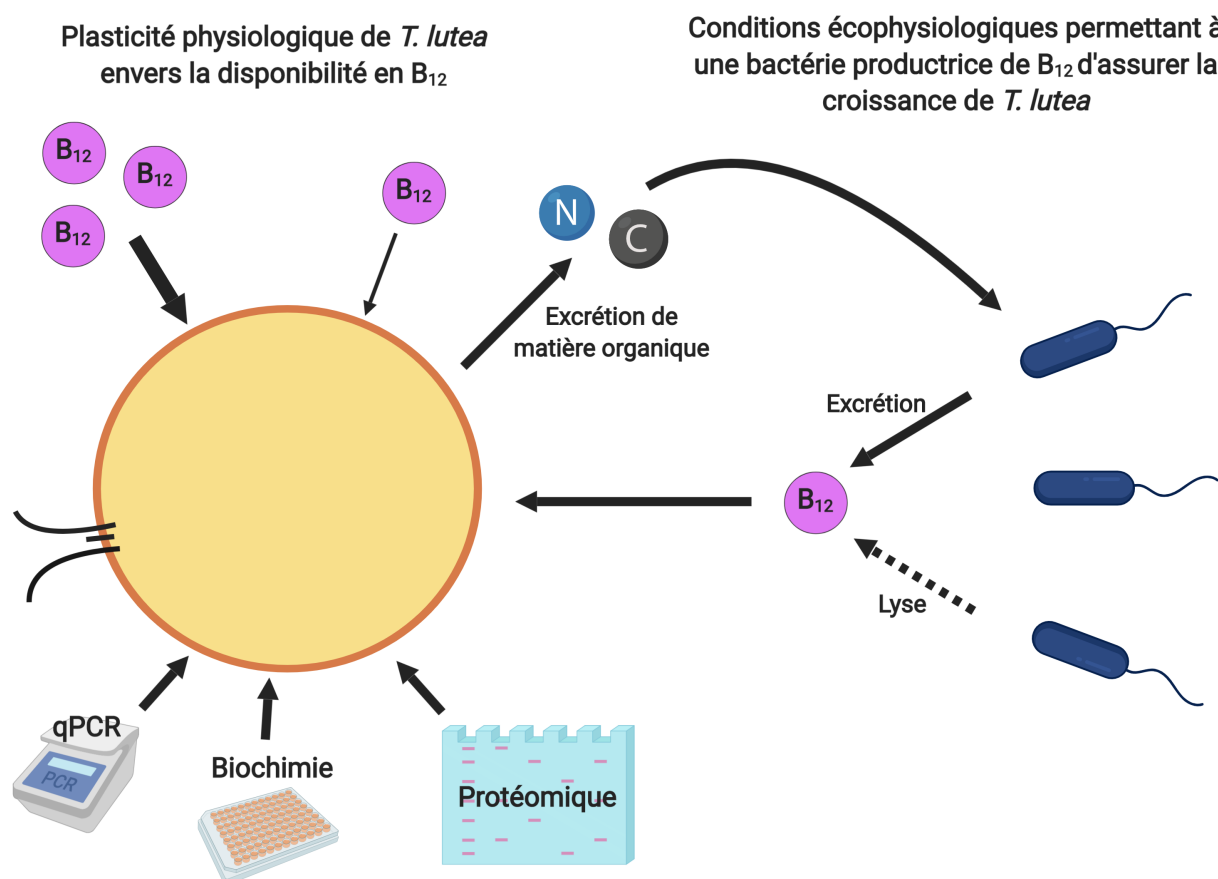


FIGURE 1.19 – Illustration schématique des différentes thématiques de recherche de la thèse. Des approches moléculaires et biochimiques ont été utilisées afin de caractériser la plasticité physiologique de *T. lutea* à différents niveaux de disponibilité en vitamine B₁₂. D'autre part, des travaux ont été menés afin d'identifier les mécanismes d'obtention de la vitamine B₁₂ par *T. lutea* via des interactions directes et indirectes avec des bactéries. C : carbone, N : azote.

a ensuite été réalisée. Une analyse pour comprendre comment ce cofacteur est rendu disponible pour *T. lutea* a été menée par la mise en place de co-cultures à différentes conditions. La Figure 1.19 représente les différentes parties et les approches méthodologiques de ce travail de thèse et leur recoupement.

Ce manuscrit est divisé en trois chapitres regroupant les principales thématiques de travail :

Chapitre 2 : Auxotrophie pour la vitamine B₁₂ chez les haptophytes : étude ciblée de l'effet de la disponibilité en vitamine B₁₂ sur la physiologie de *T. lutea*

Cette première partie présente l'analyse de la répartition de la dépendance à la B₁₂ chez le phylum des Haptophytes, ainsi que la caractérisation de l'auxotrophie pour la B₁₂ chez l'espèce modèle *T. lutea*. Nous avons par la suite étudié l'expression des gènes du métabolisme cœur d'utilisation de la cobalamine à différents niveaux de disponibilité du cofacteur. L'ensemble des résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Scientific Reports* (Nef et al., 2019) présentée en fin de chapitre.

Chapitre 3 : Effet d'une limitation en vitamine B₁₂ sur le métabolisme global de *T. lutea*

Ce chapitre présente les résultats issus d'une analyse visant à comprendre et à caractériser de façon globale l'effet d'une limitation en B₁₂ sur le métabolisme de *T. lutea*. Une approche de protéomique comparative couplée à des analyses de métabolites ont été appliquées. Les résultats sont prêts pour être soumis pour publication.

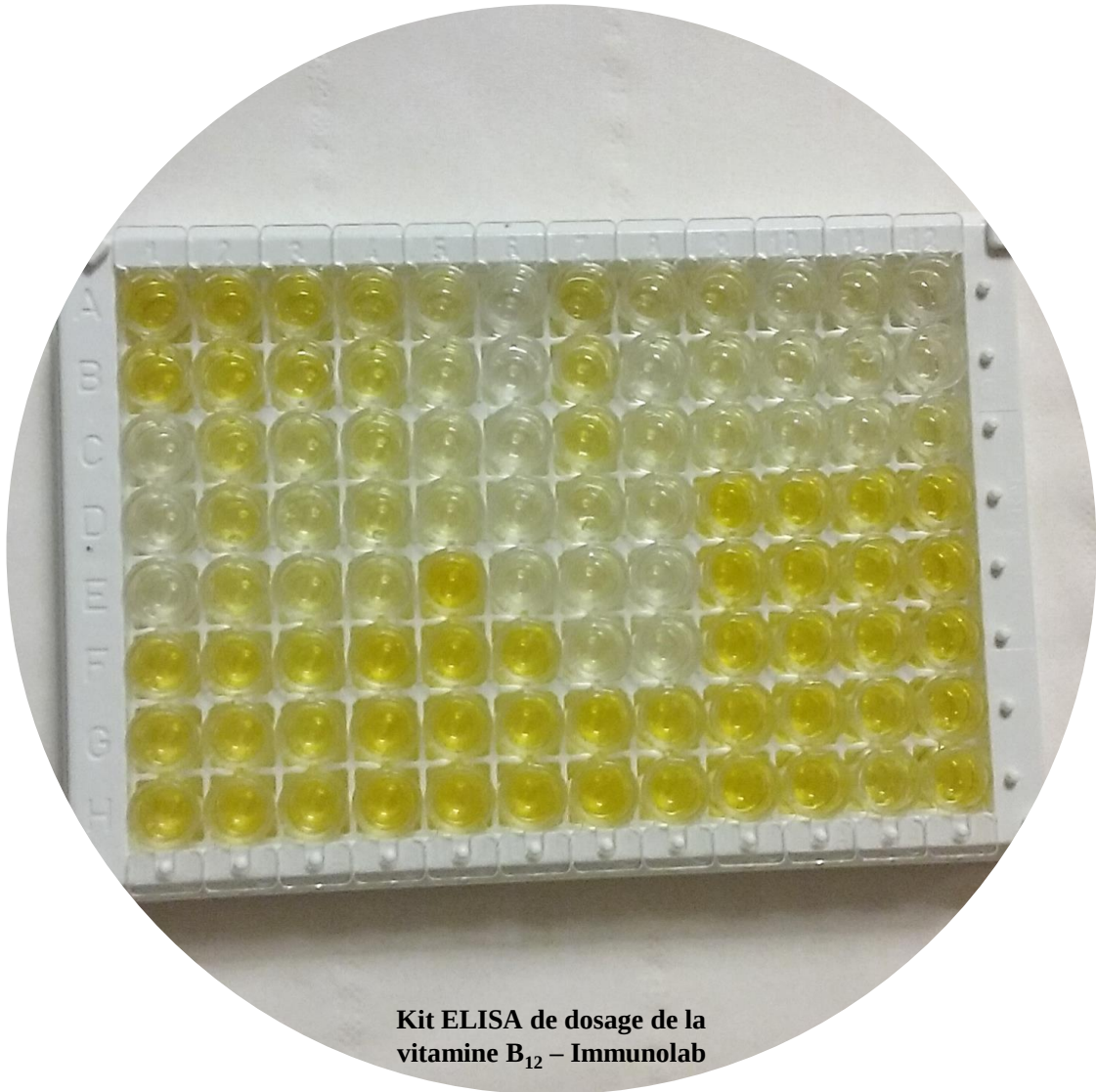
Chapitre 4 : Interactions microbiennes pour la vitamine B₁₂

Ce dernier chapitre est consacré à la caractérisation de la nature des interactions entre *T. lutea* et des bactéries sélectionnées sur la base de leur production de vitamine B₁₂. Différentes approches ont été couplées pour identifier le mode d'acquisition (direct ou indirect) de la vitamine B₁₂ par *T. lutea*. Un manuscrit préparé pour soumission est présenté en fin de chapitre.

La dernière partie de ce manuscrit (synthèse globale) replace l'ensemble des connaissances acquises dans un contexte environnemental et appliqué.

Chapitre 2

Auxotrophie pour la vitamine B₁₂ chez les Haptophytes : étude ciblée de l'effet de la disponibilité en vitamine B₁₂ sur la physiologie de *T. lutea*



Kit ELISA de dosage de la
vitamine B₁₂ – Immunolab

Sommaire

2.1	Introduction.	67
2.2	Matériel et Méthodes	69
2.2.1	Recherche de séquences homologues des gènes du métabolisme de la vitamine B ₁₂ chez <i>T. lutea</i> et les Haptophytes et étude de leur expression	69
2.2.2	Adaptation d'une méthode de dosage du quota de vitamine B ₁₂ chez <i>T. lutea</i>	70
2.2.3	Culture de <i>T. lutea</i> en batch et en chimostat limités en vitamine B ₁₂	74
2.2.4	Recherche de séquences homologues des gènes du métabolisme de la vitamine B ₁₂ chez <i>T. lutea</i>	77
2.3	Résultats et discussion	79
2.3.1	Répartition <i>in silico</i> de l'auxotrophie pour la vitamine B ₁₂ chez les microalgues haptophytes	79
2.3.2	Description d'une alternative à l'utilisation de la vitamine B ₁₂ chez <i>T. lutea</i>	79
2.3.3	Identification des gènes codant pour les protéines du cycle de la méthionine et les transporteurs de B ₁₂	83
2.3.4	Étude de la physiologie moléculaire de <i>T. lutea</i> à différents niveaux de limitation en vitamine B ₁₂	84
2.3.5	Mécanismes de régulation potentiels des gènes du métabolisme central d'utilisation de la vitamine B ₁₂	87
2.4	Conclusion	92
2.5	Article 1 : How haptophytes microalgae mitigate vitamin B ₁₂ limitation	93

2.1 Introduction

La moitié des espèces de microalgues dépendrait de la vitamine B₁₂ pour se développer. La répartition de cette dépendance ne semblerait pas avoir de lien phylogénétique (Croft et al., 2005 ; Helliwell et al., 2013). Comme décrit en introduction (section 1.2.6) l'auxotrophie pour la B₁₂ se caractérise par la présence d'une méthionine synthase dépendante de ce cofacteur pour son activité, la METH, ainsi que l'absence d'une isoforme permettant de fournir le même produit de réaction sans vitamine B₁₂, la METE.

Les premiers travaux à avoir analysé l'utilisation de la B₁₂ par les Haptophytes sont ceux de Droop (1970) chez *Monochrysis lutheri*, aujourd'hui *Diacronema lutheri*. Cette étude lui a servi de base pour établir son modèle établissant que le taux de croissance spécifique dépendait du quota en nutriment et non pas de la concentration extracellulaire. Peu d'études ont été publiées depuis concernant l'utilisation de la B₁₂ par les Haptophytes. À ce jour, une seule étude a démontré la présence d'une METH et d'une MMCM B₁₂-dépendantes chez *Emiliana huxleyi* (Helliwell et al., 2011). Nous ignorons si toutes les Haptophytes sont auxotrophes pour la cobalamine, ou bien s'il y a des espèces B₁₂-indépendantes. Les concentrations naturelles en cobalamine sont considérées comme limitantes pour le développement du phytoplancton dans de nombreux écosystèmes marins, notamment dans certaines régions polaires et côtières (Panzeca et al., 2009 ; Sañudo-Wilhelmy et al., 2012 ; Suffridge et al., 2018).

L'effet d'une limitation en vitamine B₁₂ sur la physiologie moléculaire des microalgues a été étudié chez certaines espèces de Diatomées et de Chlorophytes. Chez la diatomée cobalamine-dépendante *Thalassiosira pseudonana* par exemple, la carence en B₁₂ induit la surexpression de la *metH*. Pour la Diatomée cobalamine-indépendante *Phaeodactylum tri-cornutum* la carence en cobalamine ne modifie pas l'expression de la *metH* mais conduit à une surexpression de l'isoforme *metE* (Bertrand et al., 2012), phénomène également observé chez la Chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (Helliwell et al., 2014). Ainsi, la régulation des niveaux d'expression et donc possiblement d'accumulation de la méthionine synthase B₁₂-indépendante semblerait être une des clés de la plasticité physiologique des microalgues pouvant se passer de ce cofacteur. En absence du gène *metE*, les microalgues cobalamine-dépendantes disposent d'autres mécanismes de réponse aux niveaux de disponibilité en vitamine B₁₂, tels que la régulation de l'expression de la *metH*. Au même titre que pour la répartition de l'auxotrophie pour la B₁₂, il n'y a pas d'informations concer-

nant la physiologie moléculaire des microalgues haptophytes vis-à-vis de ce cofacteur, bien que ce groupe de microalgues constitue l'un des taxons majoritaires du phytoplancton (Fuller et al., 2006 ; Not et al., 2008 ; Lepere et al., 2009 ; Jardillier et al., 2010 ; Kirkham et al., 2011 ; O'Brien et al., 2013).

En conséquence, ce chapitre a pour ambition de mieux caractériser l'auxotrophie pour la B₁₂ chez les microalgues haptophytes, en prenant pour espèce modèle *T. lutea*. Nous tenterons de répondre aux questions suivantes :

- Peut-on estimer la fréquence de l'auxotrophie pour la vitamine B₁₂ chez les microalgues haptophytes ?
- Un ajout de méthionine permet-il de lever la limitation en vitamine B₁₂ chez la microalgue B₁₂-dépendante *T. lutea* ?
- Quel est l'effet de différents niveaux de limitation en cobalamine sur le métabolisme central d'utilisation et de transport de la B₁₂ de cette algue ?

Pour répondre à ces questions nous avons tout d'abord recherché la présence de gènes codant pour des méthionine synthases chez les Haptophytes. Dans un second temps, en prenant pour modèle *T. lutea*, nous avons caractérisé une alternative à l'utilisation de vitamine B₁₂ par l'ajout de méthionine, le produit de l'activité des méthionine synthases. Nous avons par la suite cultivé l'algue en mode batch et en mode chémostat limités en B₁₂ afin d'obtenir différents niveaux de limitation en cobalamine. Une méthode ELISA de dosage de la cobalamine a été adaptée pour mesurer le quota de la vitamine dans les cellules de *T. lutea*.

Nous avons étudié la physiologie moléculaire de l'algue, c'est-à-dire son fonctionnement au niveau moléculaire, pour estimer les modifications moléculaires associées aux différentes conditions de limitation en B₁₂. Pour cela, nous avons analysé l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation et le transport de cette vitamine, ainsi que ceux du cycle de la méthionine par PCR quantitative. La majorité de ces résultats sont présentés dans l'article publié dans la revue *Scientific Reports* (Nef et al., 2019) présentée en fin de chapitre (page 93).

2.2 Matériel et Méthodes

2.2.1 Recherche de séquences homologues des gènes du métabolisme de la vitamine B₁₂ chez *T. lutea* et les Haptophytes et étude de leur expression

Des données génomiques, transcriptomiques et protéomiques, ont été rassemblées pour 19 espèces d'haptophytes appartenant à 9 familles et 6 ordres et provenant de divers écosystèmes (voir données supplémentaires de l'article 1). Nous avons recherché des séquences de gènes homologues aux *metE* de *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum* et aux *metH* de *Chrysochromulina* sp., *Thalassiosira pseudonana*, *C. reinhardtii* et *P. tricornutum* (voir détails dans les méthodes de l'article page 101) dans les génomes et transcriptomes des 19 espèces haptophytes. La Figure 2.1 localise les échantillons pour lesquels le lieu de provenance a été recensé.



FIGURE 2.1 – Provenance géographique des échantillons de microalgues utilisés pour l'analyse de la répartition de la dépendance à la vitamine B₁₂ chez les Haptophytes. Les points d'échantillonnage sont représentés en rouge. Certains échantillons n'ont pas de localisation géographique précise (voir Table supplémentaire 1 de l'article à la fin du chapitre).

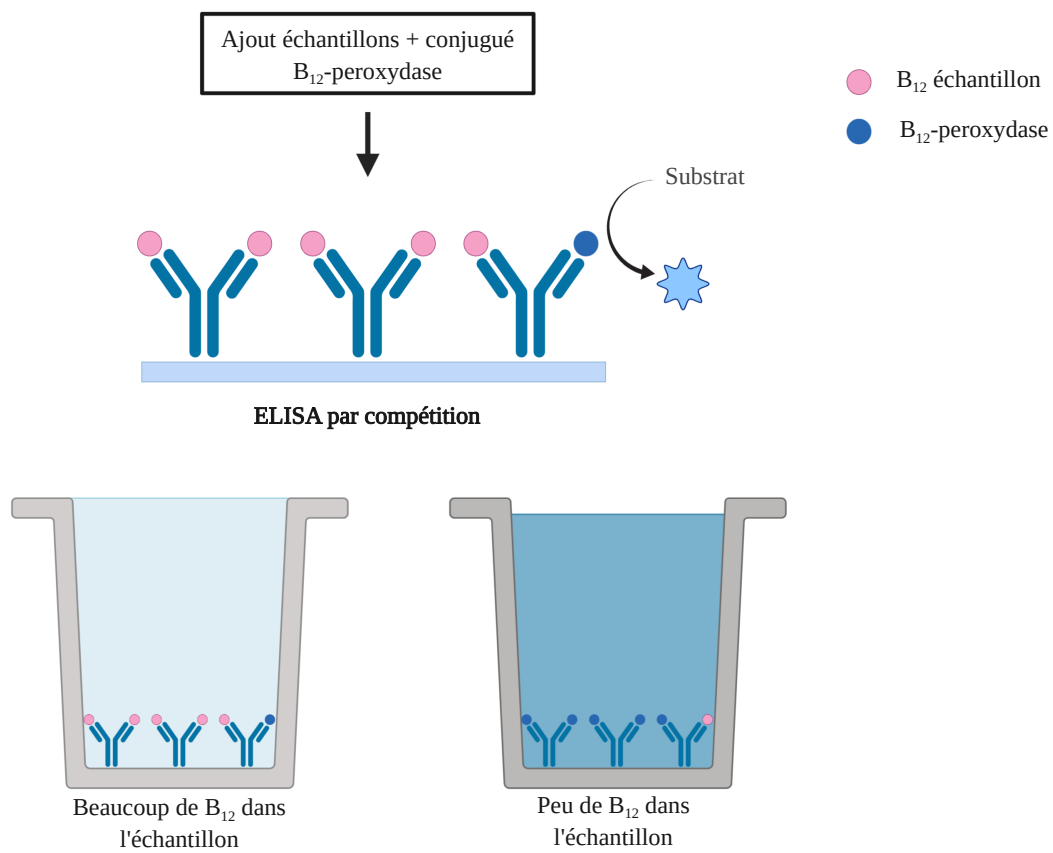
2.2.2 Adaptation d'une méthode de dosage du quota de vitamine B₁₂ chez *T. lutea*

La caractérisation de l'état physiologique des cultures de *T. lutea* à différents niveaux de disponibilité en vitamine B₁₂ a nécessité la paramétrisation d'une méthode de quantification de sa concentration intracellulaire, ou quota, en ce cofacteur.

Les principales méthodes de dosage de la vitamine B₁₂ ont été décrites en annexe A. La méthode d'extraction de la vitamine B₁₂ intracellulaire a été réalisée en se basant sur celle décrite par [Grant et al. \(2014\)](#) pour des bactéries, qui consiste en une ébullition 15 min à 99°C. Nous avons choisi d'appliquer une méthode de dosage par immunoaffinité de type ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*, Immunolab, GmbH). Cette méthode est disponible en un kit comprenant une microplaque 96 puits et peut être utilisée de façon séquentielle sur plusieurs lots d'échantillons. Les réactifs ont une bonne durée de vie (plusieurs années) et sa mise en œuvre est simple et rapide (2 heures), couplée à une sensibilité élevée (0,4 à 100 ng/mL). Le test permet la mesure de toutes les formes de cobalamine avec un taux de réactivité entre les différentes formes compris entre 98.3 et 100 % ([Zhu et al., 2011](#)). Les résultats des travaux de [Zhu et al. \(2011\)](#), effectués sur des matrices marines, ont montré que ni la salinité ni la turbidité ne modifiaient l'efficacité de mesure du kit.

Le protocole du test est le suivant : des anticorps anti-vitamine B₁₂ sont fixés dans les puits de la microplaque. L'ajout des échantillons à doser est effectué, suivi de l'ajout d'une solution de vitamine B₁₂ liée à une peroxydase (Figure 2.2). Les deux formes de B₁₂ entrent en compétition pour la liaison aux anticorps. Les puits sont par la suite rincés afin d'éliminer le matériel non lié et le substrat de la peroxydase, le peroxyde d'hydrogène lié à un chromophore, est ajouté. Une réaction colorée est ensuite observée, dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de B₁₂-peroxydase et donc inversement proportionnelle à la quantité de vitamine dans les échantillons à doser. La mesure par spectrophotométrie permet de quantifier l'intensité de coloration. La référence à une gamme de concentrations fournie permet de calculer la quantité de B₁₂ des échantillons.

Le kit ELISA a été testé sur une gamme de concentrations cellulaires (25 10⁶ à 200 10⁶ cellules) issues des cultures en mode chimostat limitées en vitamine B₁₂ (quota B₁₂ faible), ou en azote (quota B₁₂ élevé) (Fig. 2.3). Après le dosage, la gamme de quotas testée variait d'environ 4 10⁻⁴ fg B₁₂/cell à 2 10⁻² fg B₁₂/cell, soit un facteur 50 entre

FIGURE 2.2 – Illustration de la méthode immunologique ELISA pour le dosage de la B_{12} .

les conditions limitées en B₁₂ et les conditions limitées en azote. Il semblerait y avoir un léger effet de la quantité de cellules dosées sur l'efficacité de mesure du test ELISA (Figure 2.3 B), ce qui pourrait être dû à une plus grande variabilité d'extraction des échantillons riches en vitamine B₁₂. Du fait de cette variabilité de mesure, il a été choisi d'analyser au moins trois réplicats techniques par échantillon pour la suite des expériences utilisant ce test.

Le dosage du quota de B₁₂ par méthode ELISA a ainsi permis de différencier les quotas de vitamine B₁₂ provenant des échantillons aux différentes conditions écophysiologiques. La méthode a donc été acceptée pour la suite des expériences. Une quantité standardisée 80 millions de cellules, en milieu de gamme, a été choisie par la suite pour les mesures du quota de B₁₂.

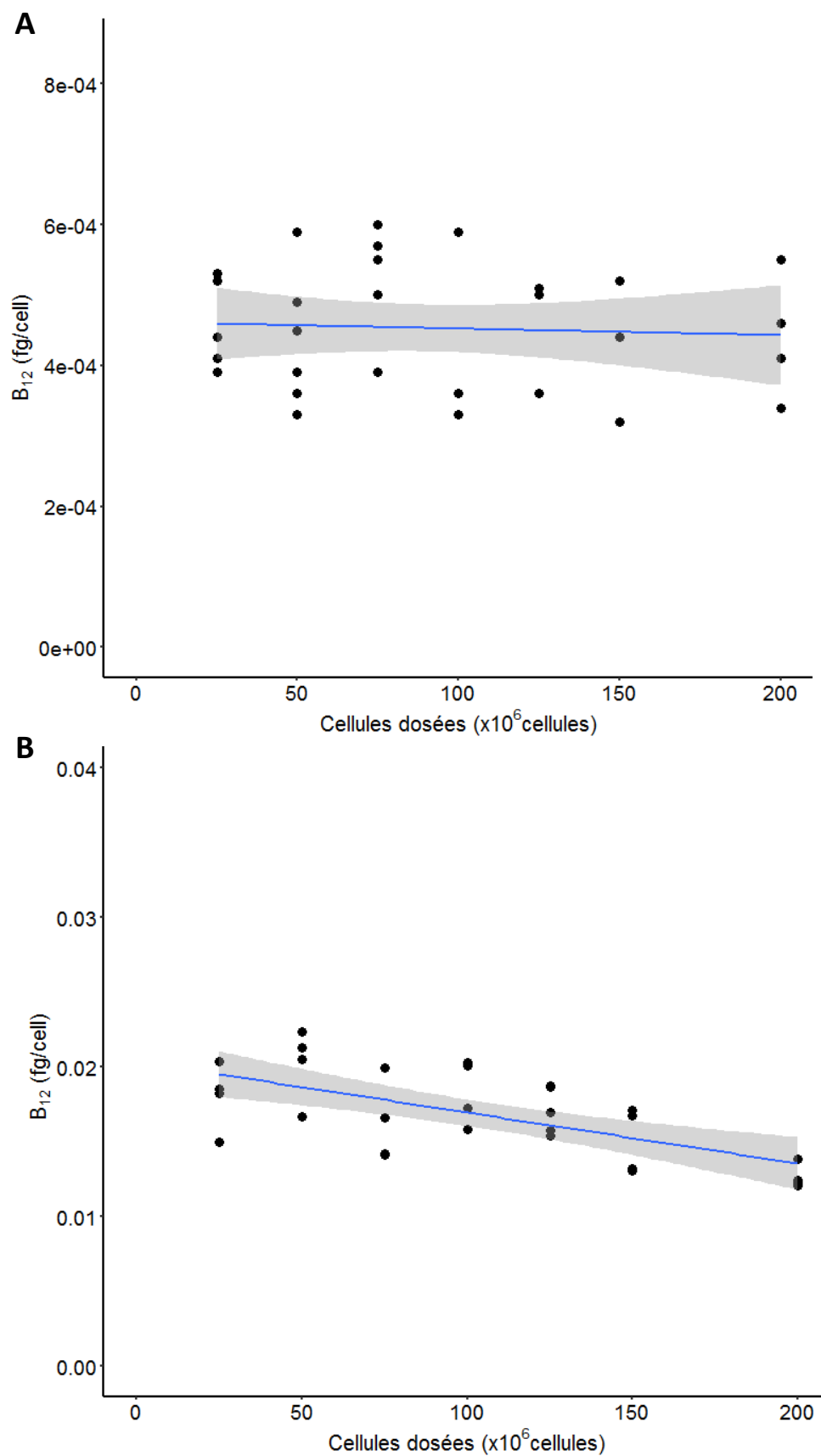


FIGURE 2.3 – Gamme de dosage du quota de B_{12} chez *T. lutea* à différentes concentrations cellulaires pour des échantillons à quota faible (A) et élevé (B). Les intervalles de confiance à 95 % des droites de régression sont représentés en gris.

2.2.3 Culture de *T. lutea* en batch et en chimostat limités en vitamine B₁₂

Nous avons étudié la croissance de *T. lutea* souche CCAP 927/14 à différentes conditions de limitation en vitamine B₁₂. Les inocula initiaux utilisés pour lesensemencements ont été purifiés de leurs bactéries afin d'écartier tout risque de contamination par des bactéries pouvant potentiellement synthétiser de la cobalamine et par là-même biaiser les résultats. Le protocole d'axénisation par ajout d'antibiotiques est décrit dans l'article [Nef et al. \(2019\)](#). La vérification de l'axénie a été réalisée régulièrement sur les cultures filles et sur les traitements lors des expériences par microscopie en épifluorescence couplée à un marquage au SYBR Green (Lonza) ainsi que par des étalements sur Marine Agar.

Afin d'étudier la physiologie moléculaire de l'algue à différentes conditions de disponibilité de la vitamine B₁₂, différentes cultures ont été mises en place. Une expérience en mode batch limité en vitamine B₁₂ a tout d'abord été réalisée (triplicats, voir Figure 4 de l'article page 97) afin d'analyser la réponse de *T. lutea* en absence de limitation et en carence en B₁₂. Des cultures en mode chimostat ont également été mises en place pour étudier la microalgue durant un équilibre limité en vitamine B₁₂ (40 ng/L, duplicats, Figure 2.4 et Figure 6 de l'article page 99). Le système de photobioréacteurs appliqué ici pour les chimostats permet de contrôler finement le pH, la température ainsi que l'intensité lumineuse reçue par les cultures. Le taux de croissance a été fixé à 0,5 j⁻¹, le pH à 8.2, la température à 27 ± 1°C et l'intensité lumineuse à 400 µmol photons m⁻² s⁻¹. Des chimostats témoins limités en azote (duplicats, 25 mg/L NaNO₃) ont également été réalisés. La limitation azotée a été choisie du fait de nombreuses données du laboratoire concernant l'effet de l'azote sur la physiologie de *T. lutea* ([Garnier et al., 2014](#) ; [Charrier et al., 2015](#) ; [Garnier et al., 2016](#)). La vitamine B₁₂ et l'azote sont tous les deux impliqués dans la synthèse des acides aminés. Comparer l'effet de ces deux limitations sur le métabolisme cellulaire de *T. lutea* devrait permettre d'identifier des différences liées spécifiquement à l'effet de chaque élément nutritif.

Un système de prélèvement particulier (Figure 2.4 E) a été utilisé pour limiter le risque de contamination bactérienne des cultures. Ce système est constitué d'une bouteille lavée à l'acide chlorhydrique (HCl 10 % v/v) et autoclavée. La bouteille est fermée par un bouchon à deux ports, permettant d'une part la connexion à l'enceinte de culture et d'autre part la liaison à un filtre 0,22 µm. Le prélèvement s'effectue via l'actionnement d'une se-

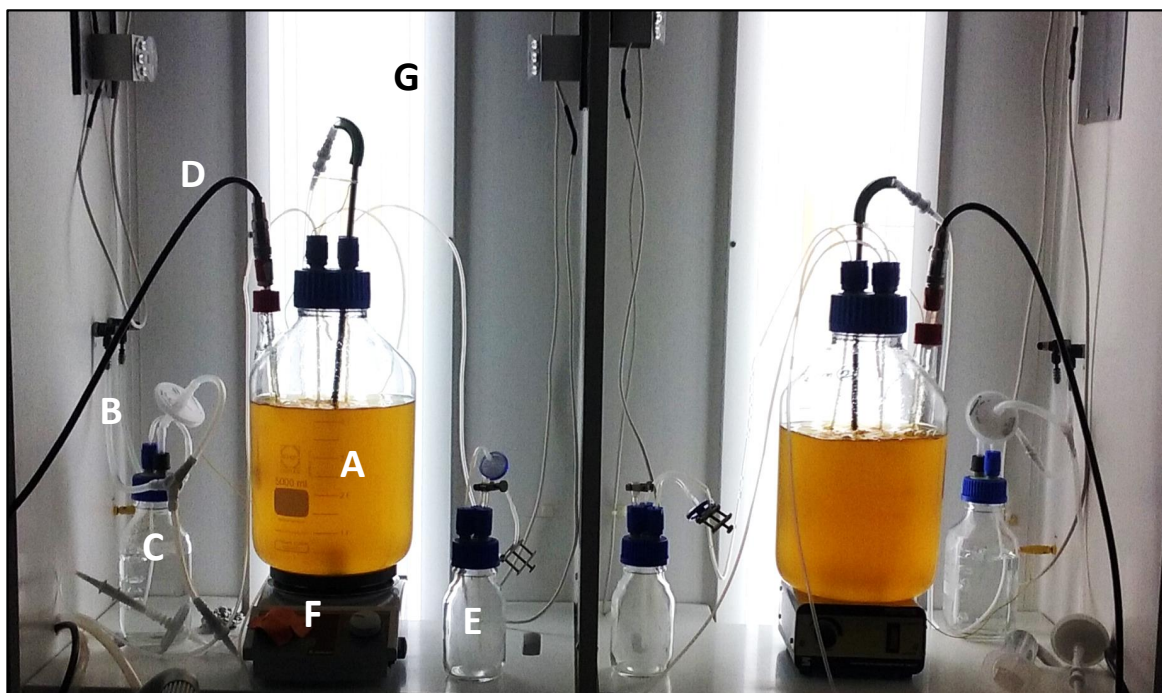


FIGURE 2.4 – Photographie de cultures de *T. lutea* cultivées en photobioréacteur de 5 L en mode chémostat limité à 40 ng/L de vitamine B₁₂. A) enceinte de culture disposant de quatre ports permettant l'évacuation du trop-plein à la surverse, B) un apport d'air filtré sur 0,22 µm, humidifié via le passage dans une bouteille d'eau distillée C). La valeur du pH est suivie par D) une sonde pH et sa régulation est assurée par l'ajout automatique de CO₂ via l'arrivée d'oxygène B). La sonde de prélèvement de la culture est reliée à E) un système de prélèvement stérile. Un agitateur magnétique F) avec barreau aimanté permet l'homogénéisation de la culture et une rampe de 6 tubes fluorescents G) permet de contrôler l'éclairage.

ringue insérée dans le filtre, jusqu'au volume voulu, puis la bouteille est remplacée par une nouvelle. L'ensemble des procédures s'effectue à la flamme après désinfection des supports à l'éthanol 70 %.

Un ajout discret du nutriment limitant, ou "spike", a été effectué pour perturber les équilibres et étudier les modifications physiologiques associées à une dynamique d'acquisition et de consommation de la vitamine B₁₂ (Figure 2.5). L'ajout de nitrates a également été effectué dans les chémostats limités en azote. La quantité de nutriments ajoutés lors du spike était équivalente à celle de l'alimentation, soit 40 ng/L B₁₂ et 25 mg/L NaNO₃. L'échantillonnage a été effectué dans les chémostats en trois points durant la phase d'équilibre (limitation) puis 1 heure (réplétion) et 24 heures (déplétion) après spike (Figure 2.5).

L'expérience a été prolongée après le premier ajout des nutriments limitants. Les ré-

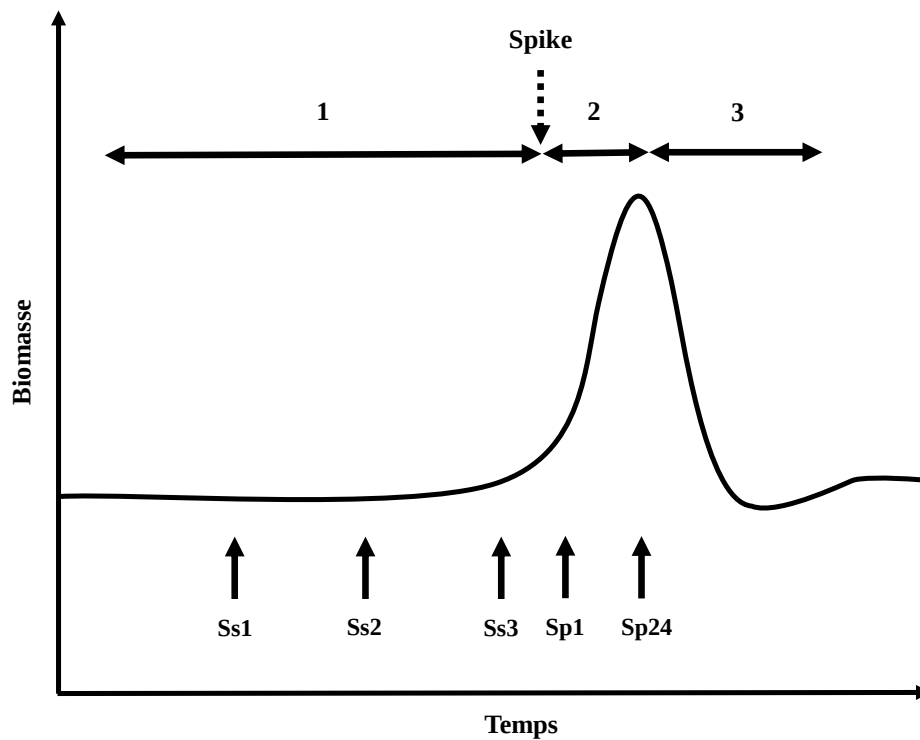


FIGURE 2.5 – Schéma représentant les points de prélèvement des cultures en mode chémo-stat. 1 : limitation ; 2 : réplétion ; 3 : déplétion ; Ss1 à 3 : points de prélèvement à l'équilibre en limitation ; Sp1 et Sp24 : points de prélèvement une heure et 24 heures après spike respectivement.

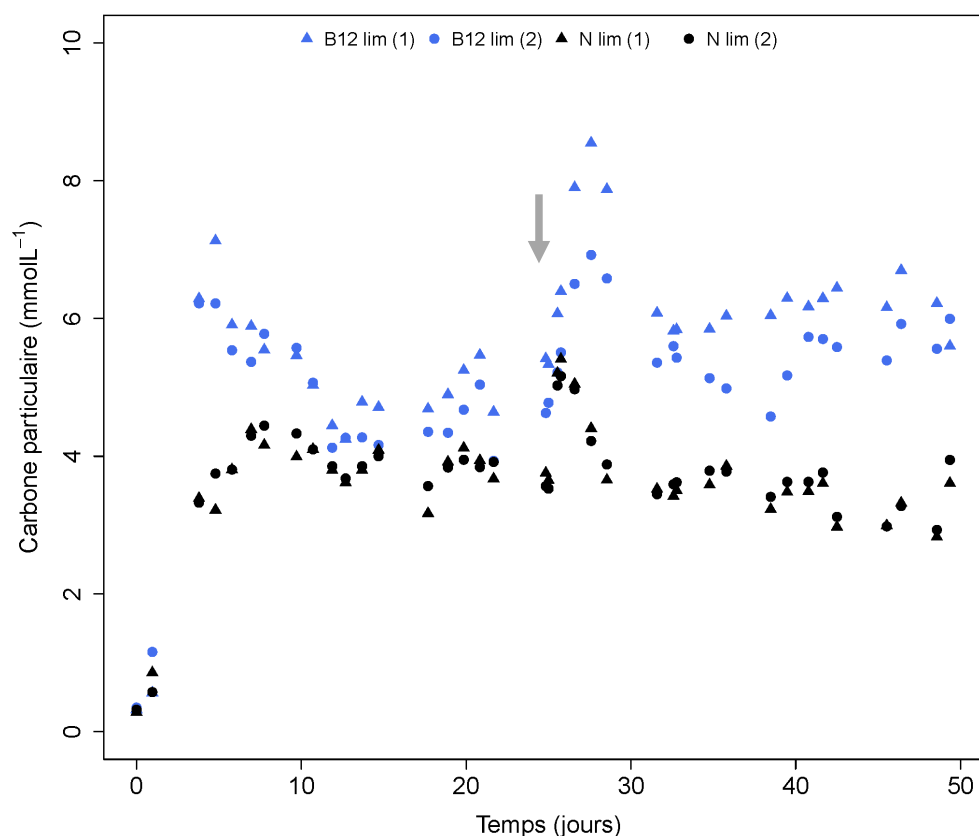


FIGURE 2.6 – Évolution du carbone particulaire en fonction du temps pour des cultures de *T. lutea* en mode chémostat limité en vitamine B₁₂ (bleu) et en azote (noir). Les séries de données représentent les deux répliquats biologiques pour chaque condition. La flèche grise symbolise l'ajout de vitamine B₁₂ ou d'azote dans les réacteurs limités en B₁₂ et en azote respectivement.

plicats biologiques des cultures limitées en cobalamine n'ont cependant pas montré un niveau de biomasse équivalent à l'équilibre (Figure 2.6), les points échantillonnés ont donc été écartés de la suite des analyses. Nous pouvons cependant noter que les répliquats en limitation azotée ont atteint un équilibre équivalent à celui avant spike (Figure 2.6). La différence observée pour les cultures en limitation B₁₂ pourrait être la conséquence d'une sélection d'une partie de la population microalgale. Au total, les cultures ont été suivies près de deux mois et maintenues en condition axénique.

2.2.4 Recherche de séquences homologues des gènes du métabolisme de la vitamine B₁₂ chez *T. lutea*

Nous avons ciblé l'étude des enzymes B₁₂-dépendantes, ainsi que de celles impliquées dans le transport intracellulaire et la conversion des différentes formes biologiquement actives de la B₁₂ (voir section et Figure 1.14). La recherche de séquences nucléiques et

protéiques a été effectuée par TBlastN et BlastP sur le génome et le protéome de *T. lutea* en utilisant les séquences requêtes suivantes, toutes validées sur Uniprot :

- MAT de *Escherichia coli* et *Arabidopsis thaliana*
- SAHH de *Homo sapiens* et *A. thaliana*
- CBLA de *Rattus norvegicus*
- CBLB et MMCM de *H. sapiens*.

Les détails des numéros d'accès sont disponibles dans le matériel et méthodes de l'article page 101. Les gènes homologues identifiés chez *T. lutea* ont été alignés de nouveau sur le génome de l'algue par TBlastX (e -value 1×10^{-1}) afin d'identifier d'éventuelles protéines isoformes. La présence des domaines fonctionnels caractéristiques des protéines ont par la suite été vérifiés par alignement des séquences nucléiques et protéiques sur la base de données CDD (*Conserved Domains Database*) de NCBI.

Six gènes de ménage potentiels ont été testés afin de procéder à des analyses d'expression de gènes par PCR quantitative (qPCR) : le gène codant l'ARNr 18S, l'actine, le facteur d'élongation 1 (EF1), la glycéraldéhyde phosphate déhydrogénase (GAPDH), la tubuline et l'ubiquitine. La GAPDH a montré une faible variabilité de Ct et des valeurs de Ct du même ordre de grandeur que nos gènes cibles et a donc été validée comme gène de ménage (voir page 107 pour la variabilité des Ct des gènes de ménage et les amorces utilisées). Nous avons par la suite analysé les niveaux d'expression des gènes cibles (encodant la METH, MAT, SAHH, CBLA, CBLB et MMCM) en fonction de la disponibilité en vitamine B₁₂ (non limitante, limitation et carence). En se référant aux gènes de ménage, dont le niveau de transcription est considéré comme constant, la qPCR permet d'obtenir la quantité relative d'un ARN cible et la variation de transcription du gène aux conditions testées. Les gènes encodant les enzymes permettant la conversion de la SAM en SAH n'ont pas été étudiés du fait de la grande diversité des réactions utilisant la SAM comme donneur de groupement méthyle (plus d'une centaine sur KEGG).

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 Répartition *in silico* de l'auxotrophie pour la vitamine B₁₂ chez les microalgues haptophytes

L'utilisation de données moléculaires disponibles publiquement a permis de décrire la répartition de la dépendance à la vitamine B₁₂ au sein du phylum des Haptophytes. La totalité des espèces investiguées possède uniquement la METH et ce indépendamment du lieu d'origine de l'espèce (Nef et al., 2019). Aucun pseudogène n'a été identifié, suggérant une absence de transfert horizontal des gènes. De plus, les deux méthionine synthase possèdent une séquence très conservée, ce qui limite les risques de ne pas les identifier du fait d'une faible homologie avec les séquences requêtes (Croft et al., 2005). Sur la base de l'absence de la METE chez les microalgues haptophytes échantillonnées, il semblerait que toutes les Haptophytes soient B₁₂-dépendantes. Des cultures de chacune des espèces étudiées en milieu carencé en cobalamine permettraient de valider la robustesse des résultats. Ces résultats n'excluent cependant pas la possibilité que des Haptophytes possédant la méthionine synthase B₁₂-indépendante existent. Ces espèces n'ont dans tous les cas pas été échantillonnées durant ces travaux.

Ces résultats sont particulièrement significatifs car ils remettent en question l'hypothèse communément admise que la dépendance à la vitamine B₁₂ est apparue tardivement au cours de l'évolution chez les microalgues, conduisant à une répartition de type mosaïque où chaque taxon de microalgues abrite des espèces B₁₂-dépendantes et d'autres B₁₂-indépendantes (Helliwell et al., 2013). D'un point de vue évolutif, les résultats de notre étude suggèrent que l'ancêtre commun des Haptophytes n'aurait pas eu de METE, formant un groupe original de microalgues.

2.3.2 Description d'une alternative à l'utilisation de la vitamine B₁₂ chez *T. lutea*

L'absence d'une source de vitamine B₁₂ dans l'environnement empêche le développement des microalgues auxotrophes pour ce cofacteur car cette vitamine est critique pour la synthèse de la méthionine. Les concentrations environnementales en méthionine sont difficiles à mesurer, possiblement parce que cet acide aminé est rapidement intégré dans

la matière organique bactérienne (Tripp et al., 2008). Les résultats des travaux de Suffridge et al. (2018) font état de concentrations en méthionine dissoute et particulaire de l'ordre de 2 ng/L en surface à 5 ng/L au DCM (*Deep Chlorophyll Maximum*). Dans la même veine, Sañudo-Wilhelmy et al. (2012) ont mesuré jusqu'à environ 30 ng/L de méthionine dans la baie de Santa-Monica (Californie, États-Unis) mais n'ont pu estimer les niveaux en milieu océanique, qui restaient indétectables.

La question de la capacité des microalgues à assimiler la méthionine se pose. En effet, en condition de limitation en vitamine B₁₂, l'assimilation de méthionine permettrait de s'affranchir de la réaction réalisée par la méthionine synthase B₁₂-dépendante. Croft et al. (2005) ont montré que l'ajout de 1,5 g/L de méthionine dans des cultures de *Lobomonas rostrata* (Chlorophycées) permettait de lever une partie de la limitation en vitamine B₁₂.

Nous avons testé ici l'ajout de méthionine dans des cultures de *T. lutea* sans ajout de B₁₂, à des concentrations de valeur intermédiaire à celles de la littérature. Deux concentrations de méthionine ont été testées : une à 500 ng/L et une seconde à 500 µg/L afin de vérifier si *T. lutea* se développait à partir d'une quantité seuil de l'acide aminé.

La condition à 500 ng/L de méthionine n'a pas montré de croissance différente du témoin sans cobalamine (Figure 2.7). Cet apport semble ainsi insuffisant pour soutenir *T. lutea*. Le traitement à une concentration de 500 µg/L de méthionine a cependant montré une concentration finale deux fois supérieure aux témoins sans vitamine et trois fois inférieure aux témoins cultivés à 40 ng/L de B₁₂ (Figure 2.7). En estimant une proportion massique moyenne de 2.4 % de méthionine dans une protéine (Baroukh et al., 2014), et une moyenne d'environ 6 pg/cell de protéines (données expérimentales du chapitre 3), un ajout de 500 µg/L de méthionine permettrait d'obtenir une biomasse approximative de 3,5 10⁶ cell/mL. La croissance observée correspond à cet ordre de grandeur, suggérant que la totalité de la méthionine a été consommée par la microalgue.

Nous avons observé un léger développement des cultures témoins carencées en cobalamine. Nos cultures ont été réalisées avec de l'eau de mer naturelle. Ce résultat indique donc que l'eau de mer naturelle contient une faible quantité de vitamine B₁₂. Des essais en eau de mer artificielle, pour s'affranchir de la cobalamine présente dans l'eau de mer, ont été réalisés mais n'ont pas permis de cultiver *T. lutea*. Au vu de la variation maximale de biomasse des témoins négatifs dix fois inférieure à celle des témoins positifs (40 ng/L de B₁₂), nous pouvons estimer la B₁₂ de l'eau de mer aux environs de 4 ng/L, ce qui est du même ordre de grandeur que les concentrations mesurées dans certaines zones littorales

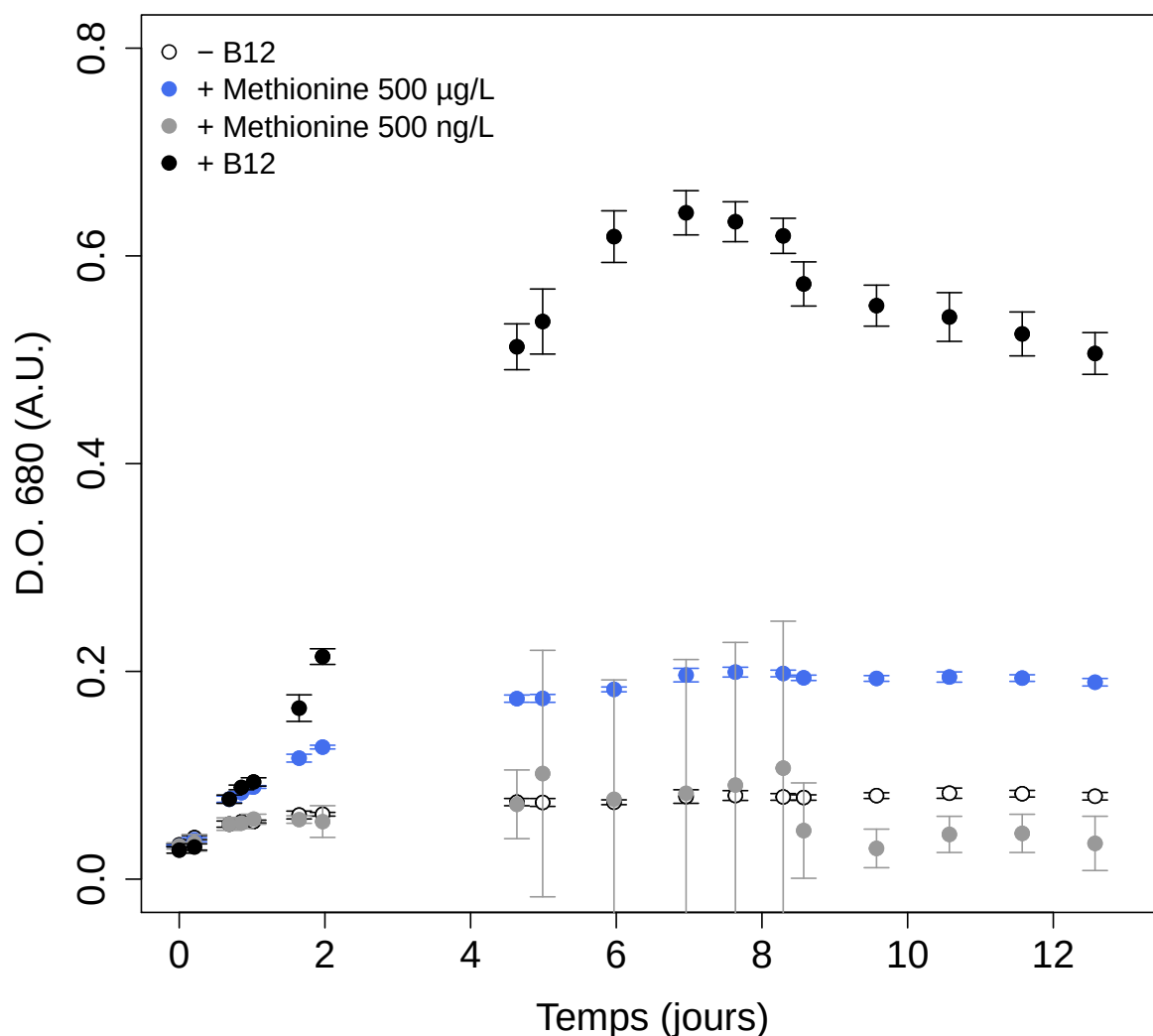


FIGURE 2.7 – Cinétique de croissance de cultures de *T. lutea* avec 40 ng/L cobalamine, ajout de 500 µg/L et 500 ng/L méthionine et sans cobalamine. Les valeurs sont des moyennes de D.O. 680 pour 6 réplicats biologiques et les barres d'erreur représentent les écarts-types.

de l'Océan Atlantique (Figure 1.6).

Nous avons par la suite testé si l'ajout de tétrahydrofolate, le second produit de l'activité des méthionine synthases, pouvait en conjonction avec la méthionine permettre de lever la limitation en B₁₂. Nous n'avons pas trouvé de tétrahydrofolate disponible chez les fournisseurs mais avons utilisé de l'acide folique, le précurseur du tétrahydrofolate. La solution mère d'acide folique a été préparée dans du Tris pH 7,8. Nous avons donc également testé une culture témoin méthionine + Tris base (pH 8,5-9) pour vérifier si ce tampon était toxique.

L'ajout d'acide folique dans les cultures carencées en B₁₂ n'a pas montré de différence

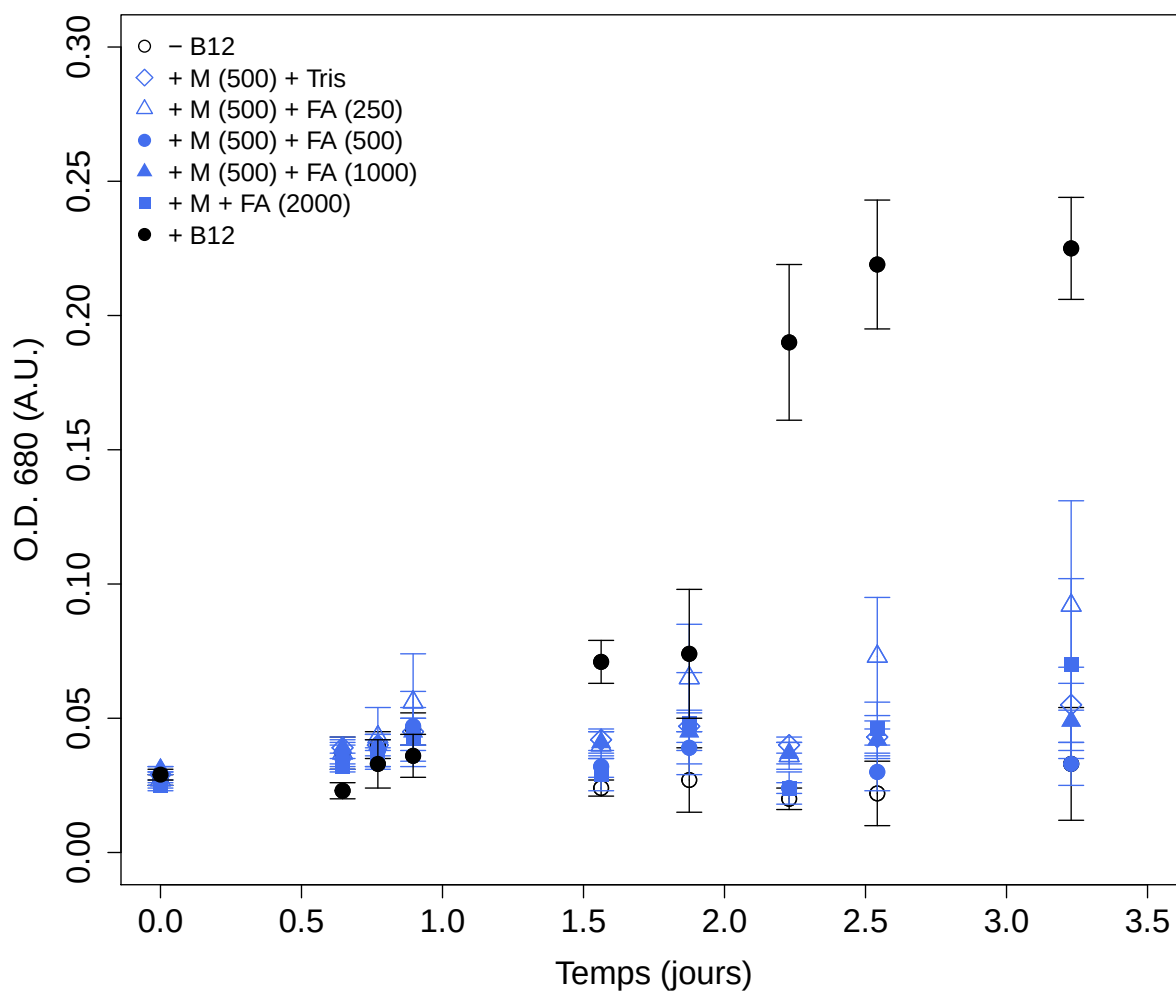


FIGURE 2.8 – Cinétique de croissance de cultures de *T. lutea* avec ajout de 500 µg/L de méthionine et différentes concentrations d'acide folique (FA) à 250, 500, 1000 et 2000 µg/L, ainsi que des témoins avec (40 ng/L) et sans cobalamine. Des cultures témoins méthionine + Tris ont également été réalisées. Les valeurs sont des moyennes de D.O. 680 pour 6 réplicats biologiques et les barres d'erreur représentent les écarts-types.

avec les témoins négatifs (Figure 2.8). Le développement de toutes ces cultures était inférieur d'au moins un facteur deux à celui obtenu avec la même concentration de méthionine seule pour un même pas de temps (par exemple à $T = 48$ h) (Figures 2.7 et 2.8). Au vu de l'absence de développement des cultures avec méthionine et Tris, le tampon de l'acide folique, il est possible que le Tris basique ait posé problème. Nous pouvons noter néanmoins une petite évolution des cultures méthionine + 250 $\mu\text{g/L}$ d'acide folique (Figure 2.8), qui pourrait indiquer que les concentrations d'acide folique testées seraient potentiellement toxiques pour *T. lutea*, car seules les cultures à plus faible concentration ont montré un léger développement.

Considérés dans leur ensemble, ces résultats prouvent que *T. lutea* est capable d'absorber et d'assimiler la méthionine dissoute dans l'eau de mer en condition de carence en vitamine B₁₂. La concentration de 500 ng/L était peut-être trop faible pour pouvoir mesurer une croissance significative. Il semble donc peu probable, au vu des mesures décrites dans la littérature comprises entre 2 et 30 ng/L, que la méthionine présente dans l'eau de mer permette un développement significatif des microalgues. L'accès à des quantités suffisantes de méthionine pourrait se faire après lyse phytoplanctonique et/ou bactérienne à la fin de blooms, et pourrait alors conduire au développement des microalgues capables d'absorber et d'assimiler la méthionine dissoute. Cette caractéristique pourrait favoriser des phénomènes de successions phytoplanctoniques.

2.3.3 Identification des gènes codant pour les protéines du cycle de la méthionine et les transporteurs de B₁₂

Le couplage de données de la littérature (Bertrand et al., 2012 ; Bertrand and Allen, 2012 ; Bertrand et al., 2013 ; Helliwell et al., 2014) et des informations de génomique et protéomique disponibles au laboratoire pour *T. lutea* ont permis de dresser un réseau théorique d'utilisation de la vitamine B₁₂ au sein du métabolisme de *T. lutea*. Deux gènes codant pour des protéines B₁₂-dépendantes ont été identifiés : la méthionine synthase (METH) et la méthylmalonyl-CoA mutase (MMCM). Les autres gènes codant pour des protéines du cycle de la méthionine, soient la méthionine adénosyl transférase (MAT) et la S-adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH), ont été identifiés. Les gènes encodant la protéine chaperone CBLA et la protéine permettant la conversion de la méthylcobalamine en adénosylcobalamine (CBLB) ont également été identifiés. Chaque gène a été retrouvé

en une copie unique.

2.3.4 Étude de la physiologie moléculaire de *T. lutea* à différents niveaux de limitation en vitamine B₁₂

Des suivis de niveau d'expression des gènes du cycle de la méthionine ainsi que des gènes *cblA*, *cblB* et *mmcm*, ont été réalisés par PCR quantitative en absence de limitation et en carence (phase stationnaire) en mode batch et en limitation à l'équilibre pour les chémostats (Figure 2.5). L'expression des gènes aux différents niveaux de limitation a été comparée à un état témoin de non limitation : en phase de croissance exponentielle pour le suivi en batch et une heure après spike lors de la réplétion dans les chémostats limités en vitamine B₁₂ et en azote (Nef et al., 2019).

Pour les expériences en batch, tous les gènes investigués hormis le gène *mmcm* étaient sous-exprimés en carence en B₁₂ comparé à un état non limité (Figure 5 de l'article page 98). Dans les cultures en chémostat à l'équilibre, les gènes du cycle de la méthionine étaient plus fortement exprimés en limitation en vitamine B₁₂ par rapport à une limitation azotée (Figure 2.9). À l'inverse, les gènes encodant les protéines accessoires CBLA et CBLB étaient réprimés en limitation en B₁₂ par rapport à la limitation azotée, suggérant une moindre allocation de la B₁₂ à la mitochondrie (Figure 2.9).

Les trois gènes du cycle de la méthionine ainsi que les gènes *cblA* et *cblB* sont tous surexprimés lors d'une limitation en vitamine B₁₂ et réprimés lors d'une réplétion en ce cofacteur (voir Figure 2.10 et Figure 7 de l'article page 101). La régulation de ces gènes est rapide et a lieu au maximum une heure après ajout de la vitamine dans les cultures limitées (Nef et al., 2019). Le gène *mmcm* ne présente pas de différence d'expression significative aux conditions testées en chémostat (Figures 2.9 et 2.10). Les deux approches en mode batch et en mode chémostat sont complémentaires. Les résultats en batch ont permis d'apporter une information sur les niveaux d'expression des gènes lors d'une carence en B₁₂. Les analyses en mode chémostat ont quant à elles permis d'étudier les dynamiques fines d'expression des gènes à différents niveaux de disponibilité de la vitamine. La conjonction de ces deux modes de culture permet d'obtenir une vision globale sur les différentes conditions environnementales auxquelles la microalgue pourrait être soumise.

Dans l'environnement, la régulation rapide et fine des gènes pourrait faire suite à un

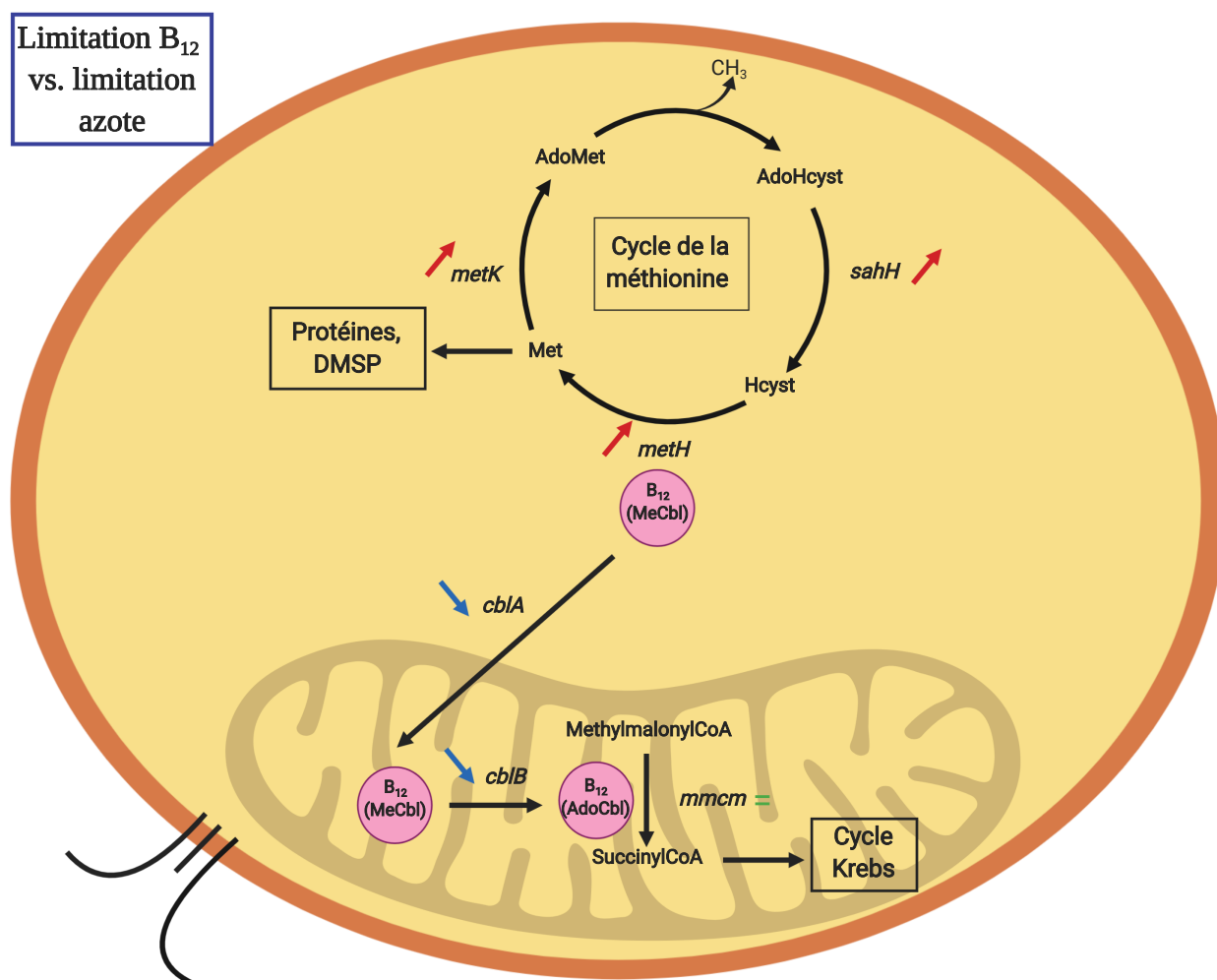


FIGURE 2.9 – Représentation schématisque de l'effet d'une limitation en cobalamine par rapport à une limitation azotée sur l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation, la conversion et le transport intracellulaire de la vitamine B₁₂ chez *T. lutea*. Le gène *metK* encode la protéine MAT. Les flèches rouges représentent les gènes surexprimés, les flèches bleues les gènes sous-exprimés. Le signe égal vert signifie que le gène ne présente pas de différence de niveau d'expression aux conditions testées.

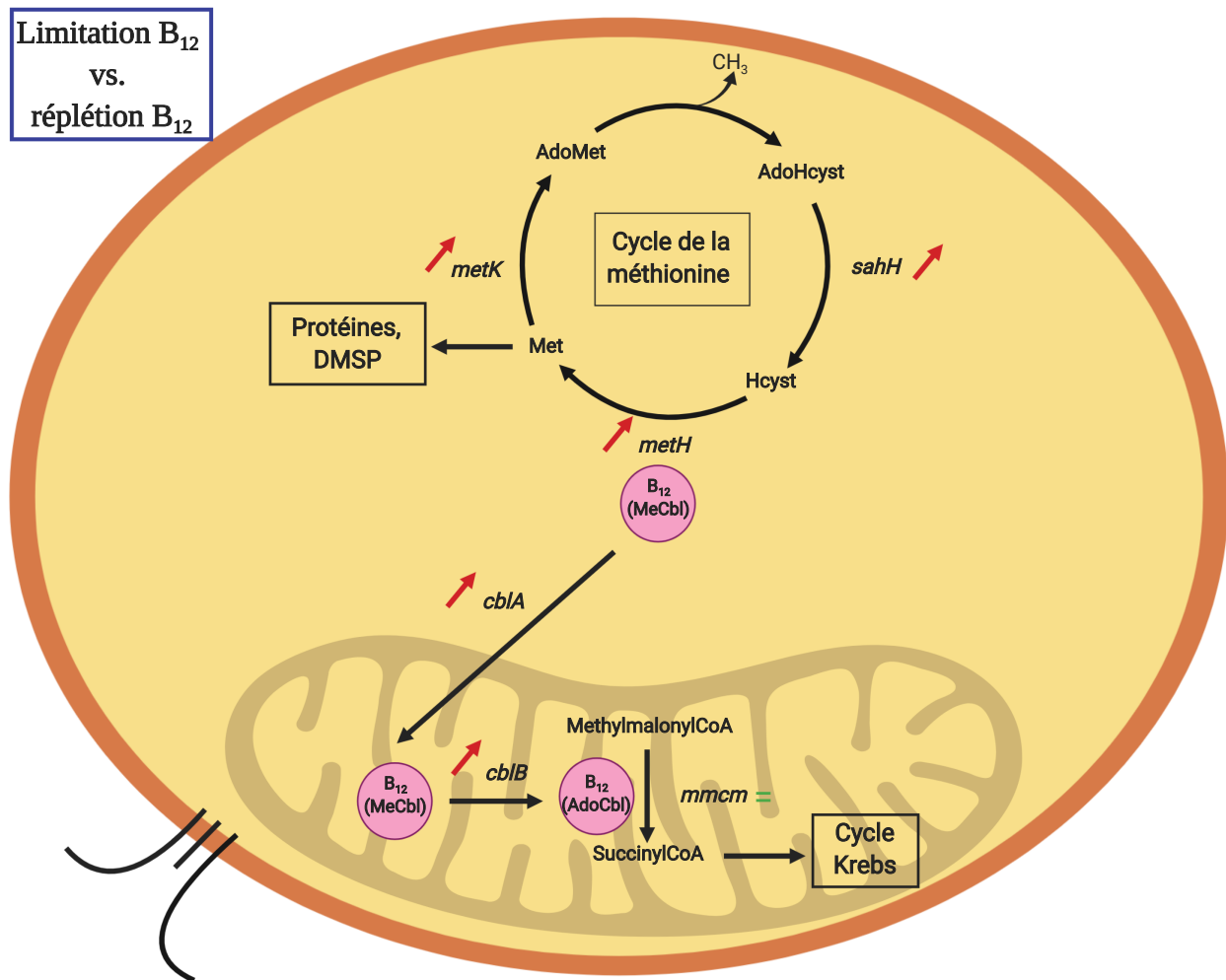


FIGURE 2.10 – Représentation schématique de l'effet d'une limitation en vitamine B₁₂ par rapport à une réplétion en vitamine B₁₂ sur l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation, la conversion et le transport intracellulaire de la vitamine B₁₂ chez *T. lutea*.

apport soudain de vitamine B₁₂ issue de la lyse bactérienne, de la lyse microalgale, ou de l'excrétion directe par des bactéries. Si les niveaux d'accumulation protéique présentent les mêmes tendances que les niveaux d'expression des gènes, cette régulation permettrait d'ajuster la quantité de protéines nécessaire pour optimiser l'activité biochimique de la cellule en cas de fluctuations de la concentration en vitamine dans le milieu.

2.3.5 Mécanismes de régulation potentiels des gènes du métabolisme central d'utilisation de la vitamine B₁₂

Les résultats de la section précédente ont montré que les trois gènes du cycle de la méthionine ainsi que les gènes *cblA* et *cblB* semblent être régulés de façon similaire en fonction du quota en vitamine B₁₂. Leurs patrons d'expression similaires pourraient être liés à des mécanismes communs de régulation.

Les travaux de [Thiriet-Rupert et al. \(2016\)](#) ont mis en évidence des facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression de certains gènes chez *T. lutea* en condition de limitation azotée. Dans cette étude, les gènes *cblA* et *cblB* semblaient appartenir à un groupe régulé par un même module de facteurs de transcription ([Thiriet-Rupert et al., 2018](#) ; [Nef et al., 2019](#)). En revanche, les gènes du cycle de la méthionine ne semblent pas appartenir à un même module ([Nef et al., 2019](#)). Cela n'écarte pas la possibilité qu'en condition de limitation en B₁₂ la régulation de ces gènes pourrait être effectuée par un même groupe de facteurs de transcription.

D'autres mécanismes de régulation, tels que les ARNi (ARN interférent) pourraient être la cause des patrons d'expression des gènes étudiés. Les ARNi sont des petites séquences d'ARN simple ou double brin qui interfèrent avec un ARNm spécifique, conduisant à sa dégradation et à la réduction de sa traduction en protéine ([Lenz, 2005](#)). Plus notablement, la régulation de l'expression des gènes via des riboswitches liant la vitamine B₁₂ a déjà été décrite et semble distribuée de façon ubiquiste chez les bactéries ([Vitreschak et al., 2003](#) ; [Nahvi et al., 2004](#) ; [Borovok et al., 2006](#) ; [Pérez et al., 2016](#) ; [Polaski et al., 2016](#)). Plus de 2000 riboswitches bactériens appartenant à la classe utilisant l'adénosylcobalamine comme ligand ont été recensés ([Breaker, 2012](#)). Il semblerait qu'il existe une grande spécificité de ces riboswitches, qui pourraient discriminer les différentes formes biologiquement actives de la cobalamine ([Polaski et al., 2017](#)). Dans le cas présent, il est possible que des riboswitches possédant des sites de fixation des formes biologiquement actives

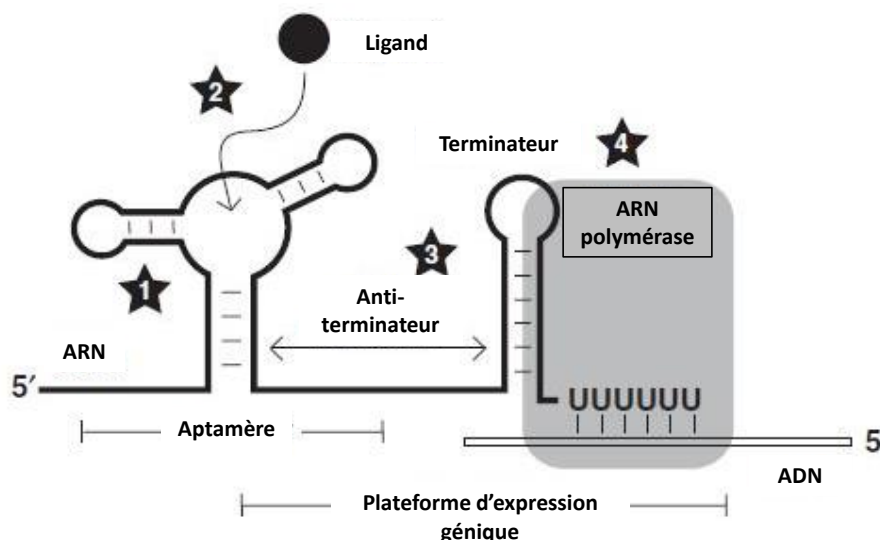


FIGURE 2.11 – Principe du fonctionnement d'un riboswitch en fin de transcription. À la fin de la transcription du gène par l'ARN polymérase, la liaison d'un ligand spécifique à l'aptamère (1 et 2) de l'ARN contrôle la formation d'une structure de terminaison en régulant la création d'une structure anti-terminateur (3 et 4). 1 : repli de l'aptamère, 2 : liaison du ligand dans l'aptamère, 3 : repli de la plateforme d'expression génique, 4 : ARN polymérase (modifié d'après Breaker (2012)).

de la cobalamine aient conduit à une modification de l'expression des gènes étudiés en fonction du quota en vitamine B₁₂. La recherche de riboswitches sur les gènes étudiés semble donc pertinente.

Les riboswitches sont des structures d'ARN situées le plus souvent dans la région 5' UTR des ARNm et forment des poches de liaison pour des ligands particuliers, induisant une modification de la structure du brin, qui engendre une modulation de la transcription de l'ADN (Figure 2.11) (Yarnell and Roberts, 1999 ; Gelfand, 2006 ; Naville and Gautheret, 2009 ; Breaker, 2012). La régulation traductionnelle peut s'effectuer quant à elle par la formation sur le motif Shine-Dalgarno de structures secondaires liées à l'exclusion mutuelle des bases ribonucléiques, empêchant la fixation du ribosome (Yarnell and Roberts, 1999 ; Gelfand, 2006 ; Breaker, 2012).

Chez les Haptophytes, des riboswitches ont été identifiés dans la régulation de la réponse à une carence en vitamine B₁ (McRose et al., 2014). La recherche de riboswitches a été entreprise pour les séquences des gènes du cycle de la méthionine ainsi que pour les gènes codant pour les transporteurs *cblA* et *cblB*. Quatre outils bioinformatiques ont été utilisés et sont résumés dans la Table 2.1.

TABLE 2.1 – Outils bioinformatiques utilisés pour l’identification de riboswitches chez *T. lutea*.

Outil bioinformatique	Référence	Résultat
Riboswitch Explorer	Abreu-Goodger and Merino (2005)	Riboswitch yybP-ykoY pour le gène <i>cblA</i>
Denison Riboswitch Detector	Havill et al. (2014)	Pas de structure identifiée
Riboswitch Finder	Bengert and Dandekar (2004)	Pas de structure identifiée
Riboswitch Scanner	Mukherjee and Sengupta (2016)	Structures d’atténuation traductionnelle pour les gènes <i>sahH</i> et <i>cblA</i>

Ces outils ont été développés pour la recherche de structures de régulation chez les procaryotes. Nous disposions d’une partie des régions 5’ UTR (taille exacte impossible à estimer du fait de l’incertitude due à l’annotation) pour les six gènes sauf le gène *metK*. Les longueurs des régions 5’ UTR avant le codon start étaient les suivantes pour les gènes étudiés : 102 nucléotides pour *metH*, 184 nucléotides pour *sahH*, 119 nucléotides pour *cblA*, 43 nucléotides pour *cblB* et 51 nucléotides pour *mmcM*. En absence d’un outil spécifique pour l’identification des riboswitches d’eucaryotes, cette solution a néanmoins permis d’identifier des structures régulatrices dans les séquences nucléiques des gènes *sahH* et *cblA* chez *T. lutea* (Table 2.1). L’application Riboswitch Explorer a conduit à l’identification d’une structure d’atténuation traductionnelle pour le gène *sahH* et de deux structures d’atténuation traductionnelle pour le gène *cblA* (Figures 2.12 et 2.13). Les outils Riboswitch Detector et Riboswitch Finder n’ont pas permis d’identifier de structure régulatrice dans les gènes investigués. L’application Riboswitch Scanner a quant à elle permis de caractériser un riboswitch de type yybP-ykoY dans la région 3’-5’ du gène *cblA* mais pas en 5’ UTR (Figure 2.13). Cet élément est apparemment très fréquent chez les bactéries et semble être relié aux niveaux de manganèse chez *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* ([Dambach et al., 2015](#) ; [Price et al., 2015](#)).

La structure de type riboswitch observée pourrait donc être soit une structure présentant des similitudes avec le riboswitch yybP-ykoY bactérien, soit bel et bien un riboswitch d’origine bactérienne présent chez *T. lutea* et en-dehors de la zone 5’ UTR. Le lien entre cette structure et la régulation d’expression du gène en fonction du quota de vitamine B₁₂ reste cependant à démontrer. La combinaison de structures d’atténuation de la traduction

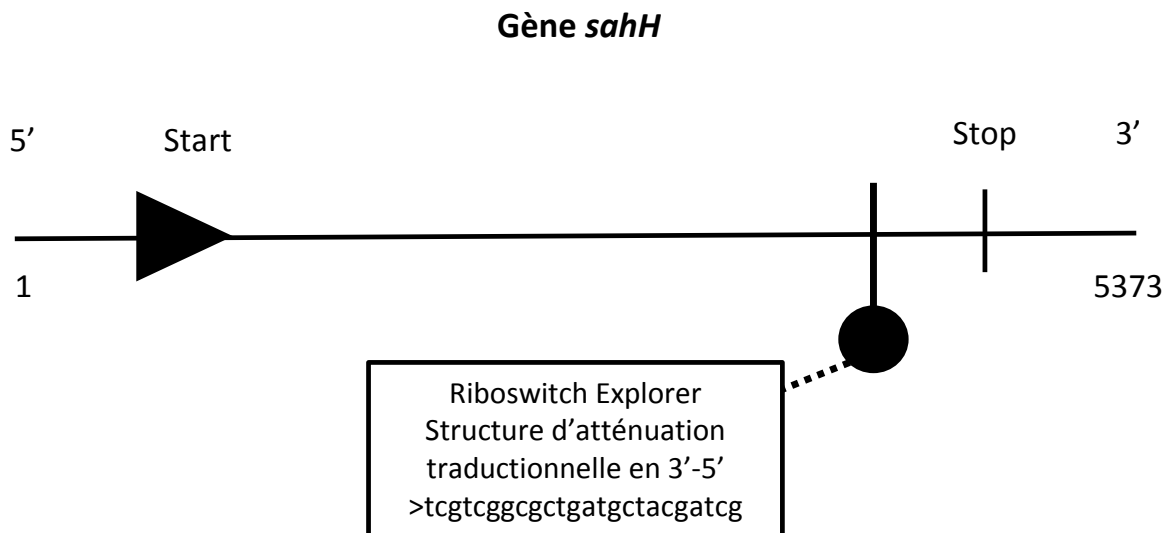


FIGURE 2.12 – Structure d'atténuation identifiée à l'aide de l'outil Riboswitch Explorer pour le gène *sahH* de *T. lutea*.

sur le gène *cblA* et d'un potentiel riboswitch *yybP-ykoY* confirme néanmoins la possibilité de phénomènes de régulation via un riboswitch pour ce gène. Ces résultats n'expliquent cependant pas le phénomène de régulation transcriptionnelle que nous avons observé. La caractérisation de la régulation transcriptionnelle des gènes du cycle de la méthionine et des gènes *cblA* et *cblB* méritera d'être approfondie dans de futurs travaux et avec des outils spécifiquement développés pour les eucaryotes.

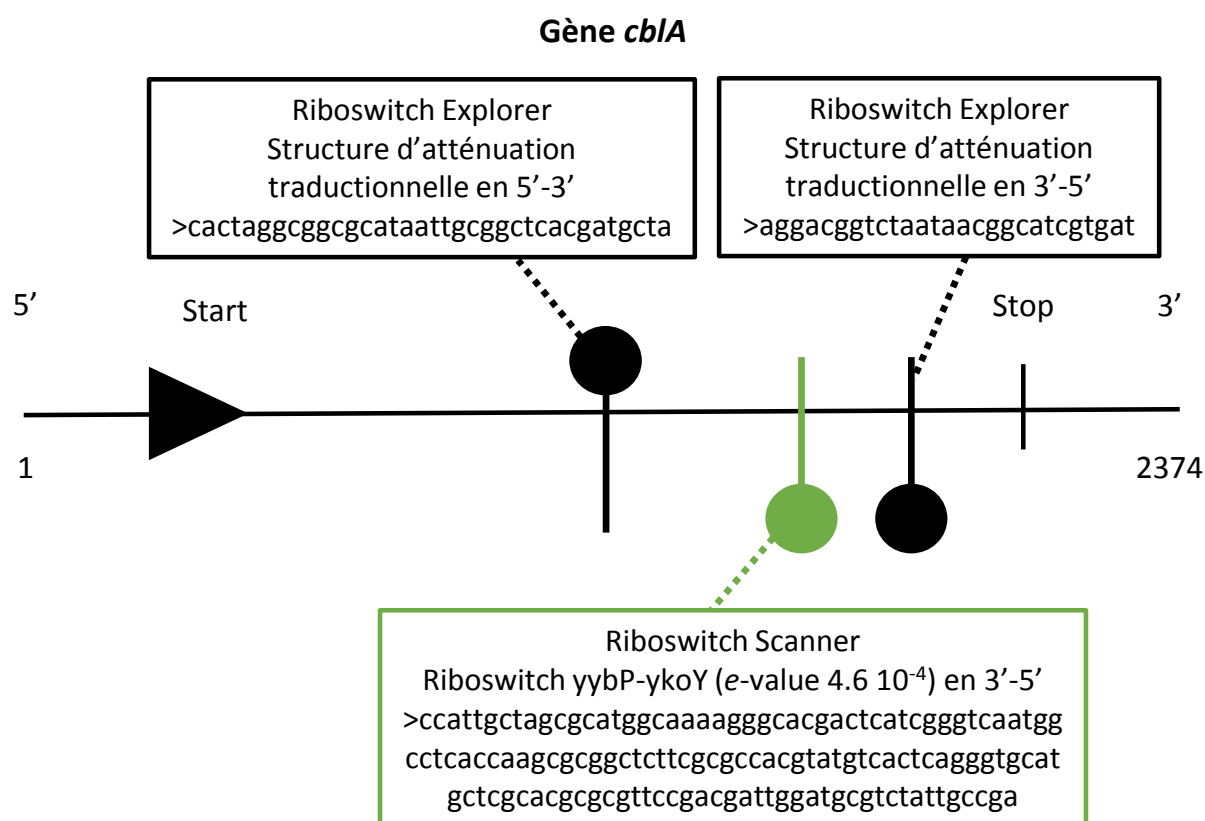


FIGURE 2.13 – Structures d'atténuation et riboswitch identifiés à l'aide des outils Riboswitch Explorer et Riboswitch Scanner pour le gène *cbIA* de *T. lutea*.

2.4 Conclusion

Pour conclure, les travaux rassemblés dans cette partie nous permettent de proposer pour la première fois que la division taxonomique des Haptophytes serait constituée uniquement d'espèces auxotrophes pour la vitamine B₁₂. Ces résultats invitent à la prudence concernant la répartition de l'auxotrophie pour la vitamine B₁₂ chez les autres taxons de microalgues. Rassembler un grand nombre de données transcriptomiques et génomiques de microalgues appartenant à diverses divisions taxonomiques, telles que les Diatomées et les Dinoflagellés, permettrait de vérifier la présence (ou l'absence) des gènes *metH* et/ou *metE*. Combinées avec des vérifications expérimentales, ces informations permettraient de pouvoir quantifier de façon non ambiguë, sous réserve d'un échantillonnage exhaustif, la proportion d'espèces auxotrophes pour la B₁₂ dans chaque division taxonomique. Dans ce cas, peut-être que la division des Haptophytes ne serait pas la seule qui rassemblerait uniquement des espèces auxotrophes pour la vitamine B₁₂. Les informations ainsi obtenues présenteraient un grand intérêt écologique et permettraient d'effectuer un pas en avant dans la compréhension de l'apparition de l'auxotrophie pour la vitamine B₁₂ au cours de l'évolution des microalgues.

Considérés dans leur ensemble, les résultats de ce chapitre suggèrent donc que l'espèce modèle *T. lutea* utilise trois stratégies pour pallier le manque de vitamine B₁₂ qui sont 1) l'assimilation de méthionine extracellulaire, 2) la régulation fine des gènes impliqués dans le transport et l'utilisation de la B₁₂ ainsi que 3) la réduction du transport de la B₁₂ dans la mitochondrie, possiblement en faveur d'une utilisation pour l'activité de la méthionine synthase (METH) dont les produits de réaction sont critiques pour la croissance microalgale (Nef et al., 2019). En l'absence d'informations supplémentaires pour d'autres espèces, nous proposons que ces caractéristiques pourraient s'étendre plus généralement à la division taxonomique des haptophytes. Ces résultats sont les premiers à apporter des informations quant à la réponse physiologique des microalgues haptophytes dans les environnements limités en vitamine B₁₂. Le chapitre suivant étudiera l'effet d'une limitation en vitamine B₁₂ sur le métabolisme général de la microalgue.

2.5 Article 1 : How haptophytes microalgae mitigate vitamin B₁₂ limitation

Charlotte Nef¹, Sébastien Jung¹, Francis Mairé¹, Raymond Kaas¹, Dominique Grizeau²
et Matthieu Garnier¹

¹IFREMER, Laboratoire de Physiologie et biotechnologie des Algues, rue de l'île d'Yeu,
44311 Nantes, France.

²Université de Nantes, CNRS, GEPEA, 44602 Saint-Nazaire, France.

Scientific Reports – mai 2019 – DOI : [10.1038/s41598-019-44797-w](https://doi.org/10.1038/s41598-019-44797-w)

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

How haptophytes microalgae mitigate vitamin B₁₂ limitation

Charlotte Nef¹, Sébastien Jung¹, Francis Mairé¹, Raymond Kaas¹, Dominique Grizeau² & Matthieu Garnier¹

Received: 11 November 2018

Accepted: 13 May 2019

Published online: 10 June 2019

Vitamin B₁₂ (cobalamin) can control phytoplankton development and community composition, with around half of microalgal species requiring this vitamin for growth. B₁₂ dependency is determined by the absence of cobalamin-independent methionine synthase and is unrelated across lineages. Despite their important role in carbon and sulphur biogeochemistry, little is known about haptophytes utilization of vitamin B₁₂ and their ability to cope with its limitation. Here we report the first evaluation of B₁₂ auxotrophy among this lineage based on molecular data of 19 species from 9 families. We assume that all species encode only a B₁₂-dependent methionine synthase, suggesting ubiquitous B₁₂ auxotrophy in this phylum. We further address the effect of different B₁₂ limitations on the molecular physiology of the model haptophyte *Tisochrysis lutea*. By coupling growth assays in batch and chemostat to cobalamin quantification and expression analyses, we propose that haptophytes use three strategies to cope with B₁₂ limitation. Haptophytes may assimilate dissolved methionine, finely regulate genes involved in methionine cycle and B₁₂ transport and/or limit B₁₂ transport to the mitochondrion. Taken together, these results provide better understanding of B₁₂ metabolism in haptophytes and represent valuable data for deciphering how B₁₂-producing bacteria shape the structure and dynamics of this important phytoplankton community.

Vitamin B₁₂, or cobalamin, can control phytoplankton growth¹ and community composition in Polar Regions^{2–4} including the Southern Ocean^{5,6}, and in some temperate coastal waters⁷. This organometallic cobalt-containing cofactor is only produced by certain species of archaea and bacteria. Cobalamin biosynthesis involves 30 enzymatic steps^{8–10} and eukaryotes, including algae, do not have the complete genetic equipment^{11,12}. The metabolic need for cobalamin is relatively common among microalgae, with around 50% species being B₁₂-auxotrophic^{11–13}. Therefore, either through direct interactions^{11,14} or by cell lysis and release¹⁵, prokaryotes are the ultimate source of vitamin B₁₂ for auxotrophic primary producers. Among phytoplankton species, haptophytes, whose origin has been dated around 830 million years ago¹⁶, are important contributors to global marine primary production, representing significant carbon sink in oceans^{17,18}. These widespread eukaryotic microalgae are also one of the main producers of dimethylsulfoniopropionate (DMSP), the precursor of dimethyl sulfide (DMS), an important component of sulphur cycle that acts as a cloud condensation nuclei^{19,20}. Thus, understanding how haptophytes acclimate to cobalamin limitation appears relevant for elucidating primary production and nutrient cycling processes in oceans.

Within eukaryotes, vitamin B₁₂ enables the activity of a relatively few number of enzymes: methionine synthase, class II ribonucleotide reductase (RNR II) and methylmalonyl-CoA-mutase (MMCM). Cobalamin has two active forms, methylcobalamin (MeCbl) and adenosylcobalamin (AdoCbl), permitting the activity of different enzymes. Methionine synthases are key enzymes for the production of proteins as they allow the conversion of 5-methyltetrahydrofolate and homocysteine into tetrahydrofolate and methionine. Whereas the first isoform of methionine synthase (METH, gene *metH*) needs MeCbl as cofactor and is encoded in all microalgae, the second isoform (METE, gene *metE*) does not need cobalamin, has a lower catalytic rate²¹ and is found in B₁₂-independent species^{11,12,22}. RNR II converts ribonucleotides into deoxyribonucleotides for DNA synthesis using MeCbl⁹ and MMCM (gene *mmcm*) is involved in the citric acid (TCA) cycle in the mitochondrion, where it converts methylmalonyl-CoA into succinyl-CoA with AdoCbl¹³. Nonetheless, species with these B₁₂-dependent enzymes can grow without the vitamin if they possess the cobalamin-independent METE isoform. This suggests that B₁₂-dependent reactions other than methionine synthesis are less critical for their development in

¹IFREMER, Physiology and Biotechnology of Algae Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, 44311, Nantes, France. ²Université de Nantes, CNRS, GEPEA, 44602, Saint-Nazaire, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.N. (email: nefcharlotte@yahoo.fr)

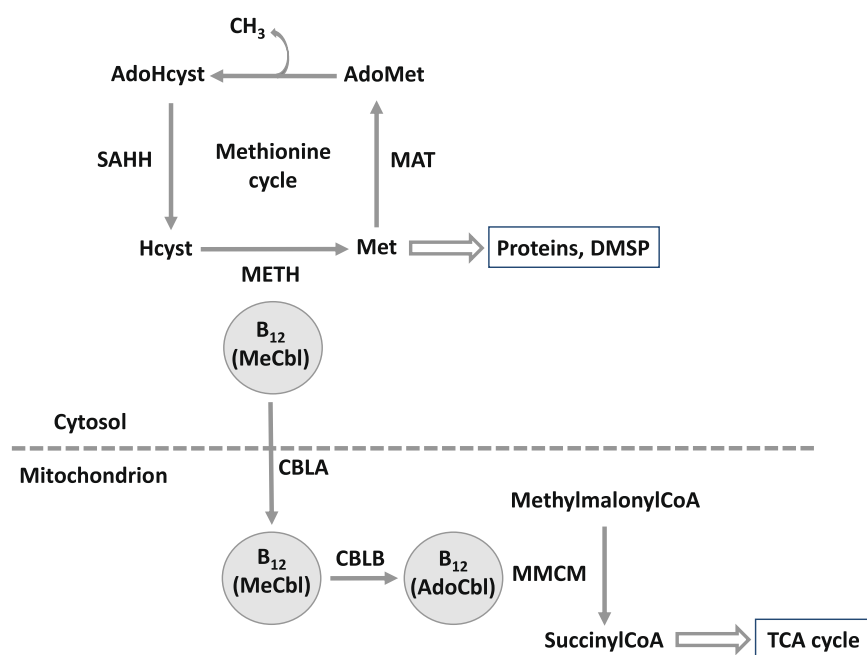


Figure 1. Schematic diagram of B₁₂ utilization in eukaryotic C1 metabolism. B₁₂ active forms methylcobalamine (MeCbl) and adenosylcobalamine (AdoCbl) catalyze different enzymatic reactions. B₁₂-dependent METH uses MeCbl in the cytosol and B₁₂-requiring MMCM needs AdoCbl in the mitochondrion. AdoHcyst, S-adenosylhomocysteine; AdoMet, S-adenosylmethionine; Hcyst, homocysteine; Met, methionine; TCA cycle, tricarboxylic acid cycle.

cobalamin-deprived environments. In addition, accessory proteins CBLA and CBLB allow B₁₂ transport of MeCbl and conversion into AdoCbl in the mitochondrion for MMCM activity²³ (Fig. 1).

It has been proposed that loss of B₁₂-independent methionine synthase arose multiple times in evolution^{12,13,24}. A reason advanced would be that microalgae provided with a non-limiting supply of cobalamin would lose selective pressure on the energy-expensive²⁵ METE and retain only METH. As an example, a recent work on *Chlamydomonas reinhardtii* grown with a source of B₁₂ revealed a shift from cobalamin-independence to auxotrophy²⁴. The conversion of methionine from homocysteine is essential in one-carbon metabolism as methionine undergoes several ways of use²⁶. It is either assimilated into proteins, or converted by the enzyme methionine adenosyltransferase (MAT, gene *metK*) into S-adenosylmethionine (SAM), an important methyl donor and radical source^{22,27} (Fig. 1). There are many reactions involving SAM demethylation, such as DNA methylation, synthesis of vitamin B₁ (thiamine)^{22,28} and DMSP biosynthesis²⁹. SAM demethylation leads to the formation of S-adenosylhomocysteine (SAH) which is finally hydrolyzed to regenerate homocysteine by the S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH, gene *sahH*). All these reactions from methionine production to homocysteine regeneration are described as the methionine cycle (Fig. 1).

Interestingly, the only way known for marine microalgae to produce DMSP implies both SAM demethylation and methionine transamination, which suggests that DMSP synthesis is an important sink of methionine²⁹. The majority of DMSP production in the ocean is due to haptophytes and dinoflagellates and, as this molecule does not contain nitrogen, it is suggested that it acts in microalgae as a dissipating excess energy agent when sulphur assimilation exceeds nitrogen incorporation²⁹. Numerous species from these lineages are considered to be cobalamin-dependent^{11,13}. Therefore, vitamin B₁₂ may be particularly important in haptophytes and dinoflagellates cellular processes, especially in nitrogen-limited environments.

Previous studies based on culture assays showed that on the 22 haptophytes species tested, 8 were able to grow without B₁₂ addition and were considered as B₁₂-independent^{11,13}. In absence of culture assay in truthful axenic condition and of molecular evidence for the presence of METE in these species, the cobalamin dependence of haptophytes lineage stays unclear. Moreover, the question of how haptophytes acclimate and regulate key metabolic enzymes in B₁₂ limitation stays poorly documented. Considering that haptophytes are major contributors to nano and pico-plankton communities^{17,30} and play a significant role in organic matter cycling, deciphering B₁₂ dependence and B₁₂-associated metabolism of this lineage is of global importance.

Here, our analysis of genes *metH* and *metE* of 19 genome-sequenced or transcriptome-sequenced haptophyte species suggest that the auxotrophy for B₁₂ is ubiquitous in the haptophyte lineage. In a second part, by using batch and continuous cultures in controlled photobioreactors, we investigated the effect of different levels of B₁₂ limitation on the molecular physiology of the model haptophyte *Tisochrysis lutea*. Genes expression analyses showed that methionine cycle is finely regulated by B₁₂ availability in the environment.

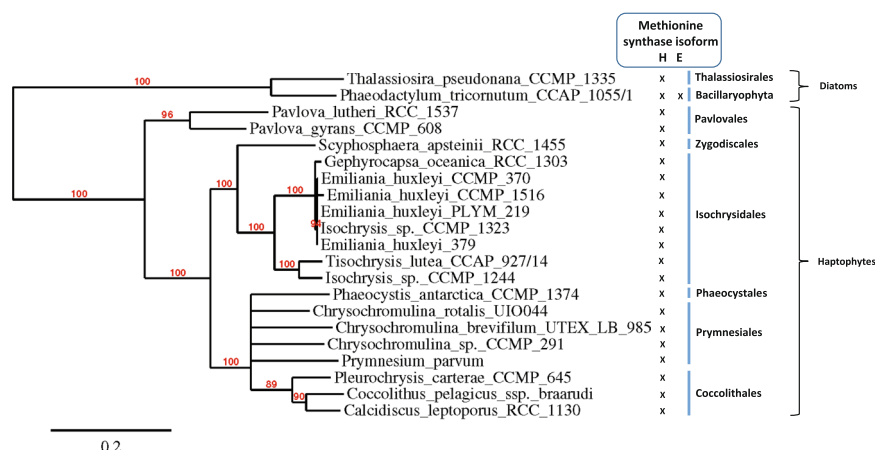


Figure 2. Phylogenetic tree of haptophytes inferred from B₁₂-dependent methionine synthase (METH) using maximum likelihood. Bootstraps values are indicated at the nodes with values above 80% shown. Crosses indicate presence of either METH or METE in the dataset. Haptophyte and diatoms orders are indicated.

Results

Phylogenetic analysis of methionine synthase in haptophytes.

A survey of methionine synthase isoforms in 19 haptophyte species based on transcriptomic and genomic datasets has been conducted (see Supplementary Table 1 on Supplementary Information for sequences details). All samples investigated contained the B₁₂-dependent *metH*. The phylogeny of this phylum was reconstructed from this gene, with species from orders Coccolithales, Isochrysidales and Prymniales relevantly gathered (Fig. 2). This reconstruction was consistent with what is usually found for 18S sequence³¹, suggesting an absence of horizontal gene transfer. The cobalamin-independent isoform *metE* was not found in any of the samples, indicating that all 19 species are B₁₂-auxotrophic (Fig. 2). The Marine Atlas of Tara Ocean Unigenes (MATOU) for eukaryotic data³² was also investigated by searching similar genomic and proteomic sequences of METE from *Phaeodactylum tricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii*. The MATOU database gather large-scale environmental metatranscriptomic and metagenomic information. Since no haptophyte sequence was retrieved in these large datasets, this reinforces the hypothesis of absence of B₁₂-independent methionine synthase in the haptophyte lineage.

Considering that comprehensive genomic and transcriptomic data of *Tisochrysis lutea* (Isochrysidaceae) were available, it was taken as model species for molecular physiology analyses depending on cobalamin quotas. *In silico* searches in *T. lutea* (strain CCAP 927/14) genome^{31,33} allowed to identify several genes involved in vitamin B₁₂ metabolism, conversion and transport. Gene *metH* coding for cobalamin-dependent methionine synthase was found and the presence of the related protein was confirmed in our proteomic dataset. The B₁₂-independent methionine synthase was not found in our proteomic nor genomic data, suggesting B₁₂ auxotrophy. Translated sequences of METH protein from other haptophytes were compared with the one of *T. lutea* when possible (see Supplementary Table 1 of Supplementary Information).

Assessment of B₁₂ requirement of *Tisochrysis lutea*. In order to validate biological dependency of *T. lutea* to vitamin B₁₂, a growth assay was performed. The axenic microalgae were grown either in cobalamin-deprived medium, methionine adding or in complete medium. Cells grown with 40 ng L⁻¹ cobalamin exhibited a maximal growth rate (μ_{max}) of 0.35 ± 0.04 d⁻¹ and a maximal biomass increase (ΔC_{max}) of 0.48 ± 0.02 arbitrary units (A.U.) (Fig. 3). Cobalamin-free cultures showed a growth rate five times lower and statistically significant ($p = 8.11 \times 10^{-8}$; two-tailed Student's *t* test) with $\mu_{max} = 0.07 \pm 0.03$ d⁻¹ and $\Delta C_{max} = 0.05 \pm 0.01$ A.U. (Fig. 3). This was consistent with *in silico* analysis and clearly demonstrated *T. lutea* auxotrophy. The low growth observed for cobalamin-free cultures was due to the use of natural seawater which provided the cells with little naturally-present vitamin B₁₂. Interestingly, microalgae grown with 0.50 mg L⁻¹ methionine showed twice the growth of the negative control that was statistically significant ($p = 4.04 \times 10^{-4}$; two-tailed Student's *t* test) with $\mu_{max} = 0.17 \pm 0.04$ d⁻¹ and $\Delta C_{max} = 0.16 \pm 0.04$ A.U. (Fig. 3), meaning that *T. lutea* is able to uptake and assimilate dissolved methionine and use it instead of cobalamin. The assimilation of dissolved free amino acids by marine microalgae is not well documented. This result confirmed that cobalamin is vital for methionine synthesis and that a lack of B₁₂ may induce a lack of methionine.

B₁₂-limited batch experiment. Cobalamin-limited batch culture in triplicate was set up to analyze expression of genes involved in vitamin B₁₂ utilization, conversion and transport, and to compare their expression depending on cobalamin quota. Figure 4A presents the evolution of the average cell concentration against time and two sampling points for B₁₂ and qPCR measurements. Figure 4B presents results for intracellular B₁₂ measures, ranging from 20 ± 7 pg mg C⁻¹ in early exponential phase to 8 ± 2 pg mg C⁻¹ in late exponential phase, with a statistically significant two-fold decrease in intracellular cobalamin concentration due to vitamin starvation ($p = 0.02$; two-tailed Student's *t* test). In their cobalamin-limited batch experiment, Cruz-Lopez *et al.*³⁴ showed a two-fold decrease of B₁₂ quota for the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*³⁴, which is consistent with our result.

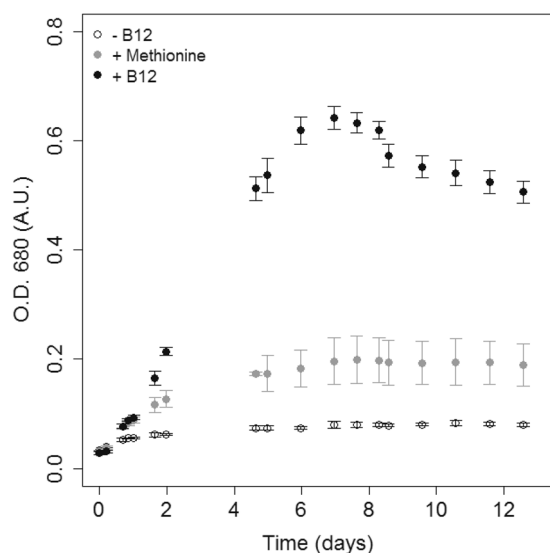


Figure 3. Growth curves of *Tisochrysis lutea* cultivated with either 40 ng L⁻¹ vitamin B₁₂, no vitamin B₁₂ adding or 0.5 mg L⁻¹ methionine. Values represent means of six biological replicates $\pm$ one standard deviation.

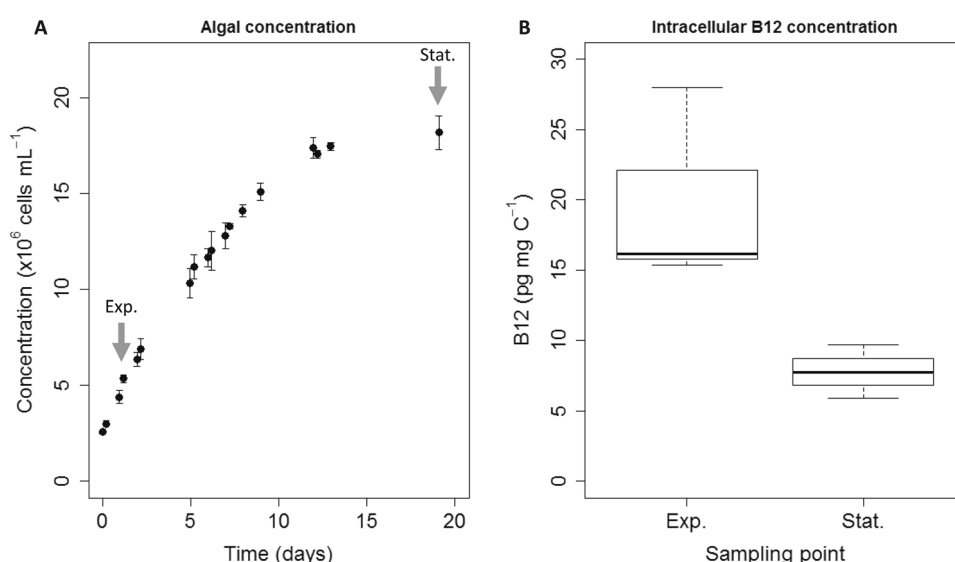


Figure 4. Batch cultures of *T. lutea* in B₁₂-limited medium. (A) Growth curve of *T. lutea* (means of three biological replicates $\pm$ one standard deviation), with gray arrows indicating sampling points for vitamin B₁₂ content and qPCR analysis. (B) Boxplot of intracellular cobalamin content at two sampling points during exponential (Exp.) and stationary (Stat.) phase with bold line indicating median (n = 3 replicates).

The expression of genes *metH*, *metK* and *sahH*, involved in the methionine cycle, *cblA*, *cblB* and *mmcm*, involved in cobalamin transport, conversion and utilization in the mitochondrion was followed during high cobalamin availability (early exponential phase) and cobalamin starvation (stationary phase). The expression of methionine cycle genes and *mmcm* did not show a clear trend (Fig. 5A–C,F; Supplementary Dataset 1; Supplementary Fig. 2 in Supplementary Information). In comparison, genes *cblA* and *cblB* were significantly repressed ($p = 0.02$ and $p = 0.04$; two-tailed Student's *t* test) by 72-fold and 11-fold respectively (Supplementary Dataset 1; Supplementary Fig. 2). This finding suggests that B₁₂ starvation decreases expression of genes involved in cobalamin transport and conversion. It must be pointed out that growth rate decrease at the end of the batch culture may lead to cellular processes influencing many biochemical pools. Therefore, the expression of genes analyzed here may be the result of a global physiological state not specifically related to B₁₂ starvation. A more accurate approach using cobalamin-limited chemostat was thus undertaken to confirm the effect of different vitamin B₁₂ status on genes expression.

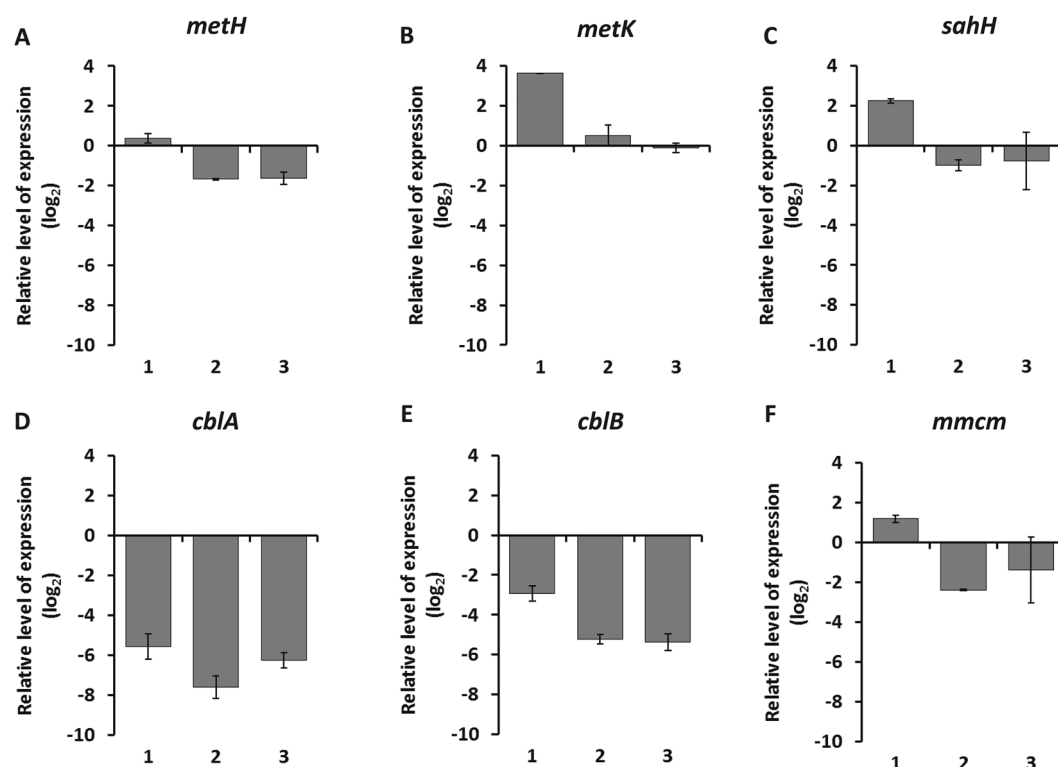


Figure 5. Genes expression in batch cultures of *T. lutea*. Relative levels of expression of (A) *METH*, (B) *METK*, (C) *SAHH*, (D) *CBLA*, (E) *CBLB* and (F) *MMCM* genes. Values represent expression level at stationary phase divided by expression level at early exponential phase. Data are log₂ normalized. Values are shown for each biological triplicate (1, 2 and 3). Bars indicate means of technical triplicate measurements and error bars represent one standard deviation (see Table 2 on Supplementary Information for primers).

Chemostat experiment in B₁₂ limitation. *Populations analysis.* To accurately describe the effect of vitamin B₁₂ status on the expression of genes involved in cobalamin use, a B₁₂-limited chemostat experiment was implemented in controlled photobioreactors. Nitrogen-limited (N-limited) chemostats with the same dilution rate were taken as controls to verify whether the observed results were specific to B₁₂ limitation or rather related to a more general physiological status. Effort was made to prevent any bacterial contamination throughout the duration of the experiments. Particulate carbon and nitrogen and cellular concentration (see Supplementary Fig. 3 in Supplementary Information) were monitored at high frequency and allowed to accurately describe culture phases. Biological duplicates exhibited similar trends during all the duration of the experiment (Fig. 6A,B). Based on stability of carbon and microalgal concentration, steady-state was reached in both chemostats at day 12 (Fig. 6A,B; Supplementary Fig. 3). At day 25, a spike of limiting nutrient (vitamin B₁₂ or nitrates) resulted in an increase in carbon biomass in all cultures, confirming nutrient limitation during the steady-state phase (Fig. 6A,B). Samples were collected on days 14, 21, 25, 26 and 27 for B₁₂ content and qPCR analyses. For a same dilution rate, carbon content was slightly higher in B₁₂ limitation than in N-limited control chemostats. Based on N/C results, physiological status of N-limited chemostats were described: nitrogen limitation at steady-state; nutrient repletion one hour after nitrogen input during N/C increase and nutrient depletion 24 hours after nitrogen input, at N/C decrease.

Intracellular B₁₂ content. Intracellular cobalamin content was measured at different times in B₁₂-limited chemostats and nitrogen-limited cultures. Three samples were collected during steady-state. Mean cobalamin quota in B₁₂-limited cultures prior to the cobalamin spike was 0.03 ± 0.02 pg $\mu\text{g C}^{-1}$ (Fig. 6C). In comparison, B₁₂ quota in N-limited chemostats was 1.73 ± 0.02 pg $\mu\text{g C}^{-1}$, value 50 times greater than the one observed in B₁₂-limited cultures (Fig. 6D). One hour after cobalamin spike, mean quota of B₁₂-limited chemostats was multiplied by 8, reaching 0.24 ± 0.14 pg $\mu\text{g C}^{-1}$, indicating an ability to quickly assimilate cobalamin (Fig. 6C). In N-limited cultures, B₁₂ quota was on average nine times higher one hour after a cobalamin pulse (Fig. 6D). One day after nutrient spike, mean B₁₂-limited chemostats quota dropped below steady-state value of 0.02 ± 0.01 pg $\mu\text{g C}^{-1}$, suggesting rapid vitamin depletion (Fig. 6C), while after the nitrogen pulse the cobalamin quotas of the N-limited control cultures fell to 0.72 ± 0.17 pg $\mu\text{g C}^{-1}$ (Fig. 6D), nearly 50 times higher than those of B₁₂-limited cultures. This was likely attributable to the increase in cellular division, which was probably faster than vitamin acquisition. By combining B₁₂ quotas and N/C ratio, physiological states for B₁₂-limited chemostats were described: nutrient limitation at steady-state; nutrient repletion 1 hour after B₁₂ input during N/C increase and nutrient depletion 24 hours after B₁₂ input, at the end of N/C increase.

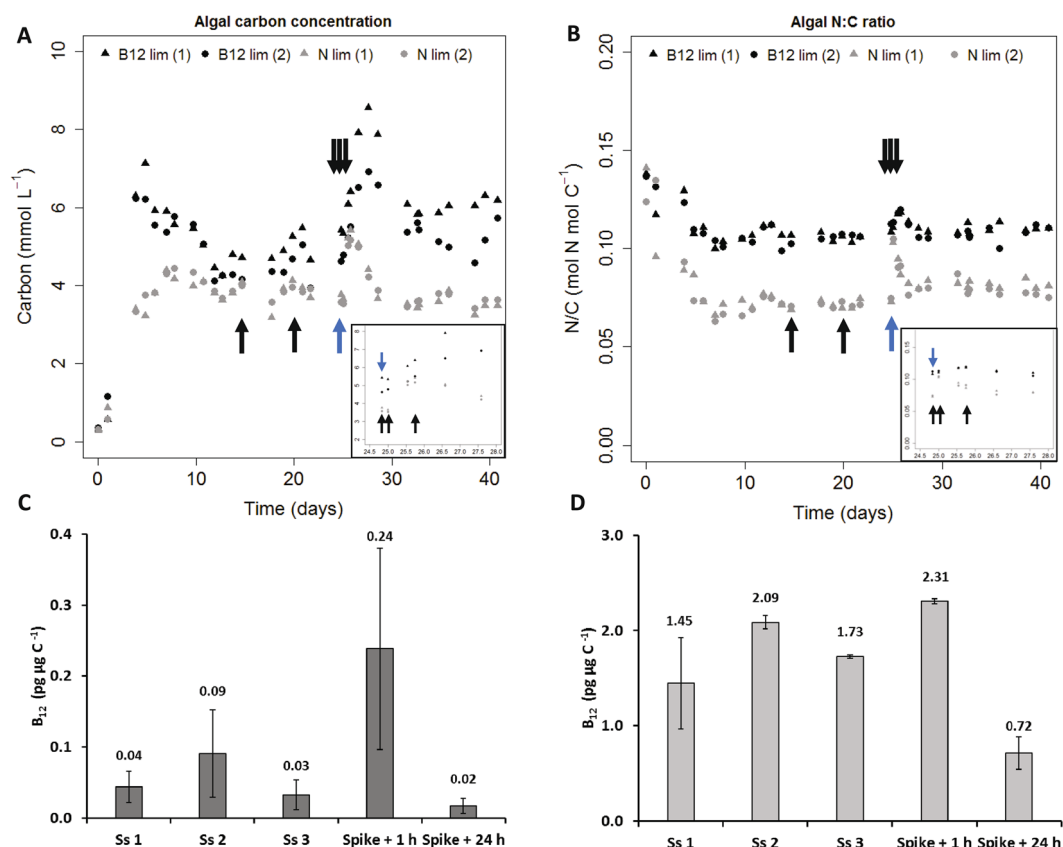


Figure 6. Chemostat cultures of *T. lutea*. (A) Algal carbon concentration and (B) algal N:C ratio. Blue arrows represent nutrient spike, black arrows indicate sampling points (Ss 1, 2, 3, spike + 1 h and spike + 24 h). (C,D) Intracellular cobalamin content at three sampling points during steady-state (Ss 1, 2, 3), 1 and 24 hours after nutrient input. Bars indicate values for the two biological replicates, with error bars representing the range. Data are for B₁₂-limited (black) and nitrogen-limited (gray) chemostats.

Molecular analyses. Genes expression analyses were carried out on samples collected at each physiological state to relate genes expression patterns to nutrient quotas. Genes for which expression was followed were the same as those of the batch experiment. Results presented for steady-state correspond to the third sample collected, just before nutrient spike.

As can be seen in Fig. 7G, at steady-state all genes involved in methionine cycle were more expressed in B₁₂ limitation than in nitrogen limitation by 4-fold (*metH*) and 8-fold (*metK* and *sahH*) (Fig. 7G; Supplementary Dataset 2 and Supplementary Fig. 4 in Supplementary Information). Genes *cblA* and *cblB* were around 2-fold less expressed in cobalamin limitation than in nitrogen limitation, whereas *mmcm* was expressed almost at the same level (Fig. 7G).

One hour after vitamin B₁₂ adding in cobalamin-limited reactors, during repletion phase, the expression of methionine cycle genes decreased by a factor 2 to 4 (Fig. 7A–C) and that of *cblA* and *cblB* by a factor 2 (Fig. 7D,E). During subsequent nutrient depletion, their expression returned to that at steady-state (Fig. 7A–E; Supplementary Fig. 4). This pattern of expression reflects noticeably intracellular cobalamin rate contents (Fig. 6C), with methionine cycle genes overexpressed in B₁₂-limited cells and repressed in B₁₂-replete cells. Expression of *mmcm* seemed not to be affected by vitamin B₁₂ spike (Fig. 7F; Supplementary Fig. 4).

One hour after nitrate spike in nitrogen-limited reactors, the expression of *sahH* showed a slight increase while the expression of *metH*, *metK*, *cblA*, *cblB* and *mmcm* did not seemed to be affected by nitrogen addition (see Supplementary Fig. 4 in Supplementary Information). These genes did not show clear changes of expression in the depletion phase (Supplementary Fig. 4 in Supplementary Information). A decoupling between nitrogen status and the decrease in gene expression could explain the absence of regulation 24 hours after nitrogen spike. Overall, methionine cycle genes showed a clear trend directly related to vitamin B₁₂ quota, and did not respond in an evident way to nitrates spike. Genes encoding accessory proteins CBLA and CBLB also showed an explicit pattern of expression induced by cobalamin quota but were not influenced by nitrogen status. Gene *mmcm* did not show any clear regulation of expression during the experiment with its expression level being almost the same for all chemostats independently of the cultures physiological state.

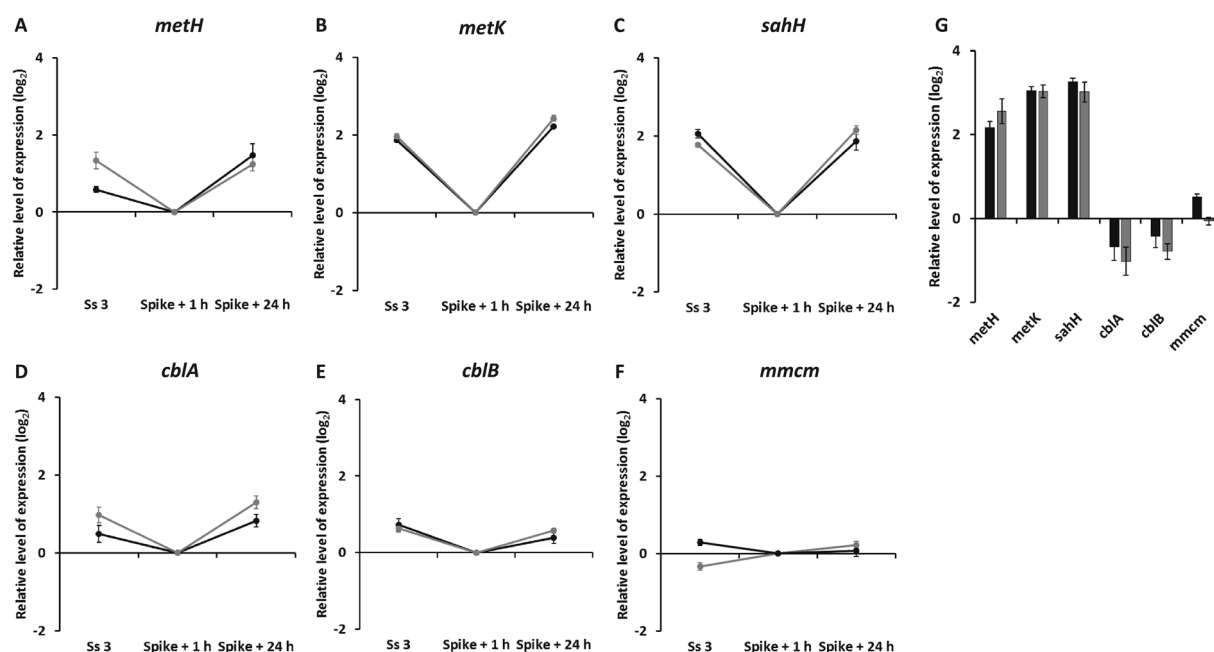


Figure 7. Genes expression in chemostat cultures of *T. lutea* during steady-state (Ss 3), 1 and 24 hours after nutrient spike: relative expression level of (A) *METH*, (B) *METK*, (C) *SAHH*, (D) *CBLA*, (E) *CBLB* and (F) *MMCM* genes normalized by mean expression level of cobalamin-limited chemostats at repletion, one hour after nutrient input; (G) barplot representing genes expression levels at Ss 3 in cobalamin-limited cultures normalized by their mean expression level in N-limited cultures at Ss 3. Data are log₂ normalized. Points and bars indicate means of technical triplicates for each biological duplicate (represented in black and grey) and error bars represent one standard deviation (see Table 2 on Supplementary Information for primers).

Discussion

Haptophytes microalgae play an important role in carbon^{17,18} and sulphur cycling²⁰ but their ability to respond to cobalamin variations is poorly known, despite the previously described impact of B₁₂ limitation on phytoplankton growth and community composition^{2,3,35}. The aim of this work was to (1) analyze B₁₂ dependency of haptophytes based on molecular data and (2) provide insights into cobalamin molecular physiology of haptophytes by studying the model marine microalgae *Tisochrysis lutea*. This work combined bioinformatic searches, growth tests in batch and chemostat at different levels of B₁₂ availability with the analyses of cobalamin quotas and expression of genes involved in B₁₂ metabolism.

Nineteen haptophyte species across six orders and nine families were assessed for the presence of methionine synthase isoforms. All species investigated encoded the B₁₂-dependent *methH* only. It has been observed that cobalamin auxotrophy is determined by the presence of *methH* and the absence of the cobalamin-independent methionine synthase *metE*^{11,12}. Our results, mainly based on transcriptomic datasets, suggest that all of these haptophytes are cobalamin auxotrophs. No *metE* sequence of haptophytes was retrieved from the MATOU database, supporting the idea that species of this phylum are B₁₂-requiring for growth. On the other hand, Croft *et al.*¹¹ reported the occurrence of 8 haptophyte species among the 22 analyzed that did not require cobalamin¹¹. It must be pointed out that 2 species over 22 were grown in their study and the remaining 20 were compiled from literature without any information about bacterial contamination. Recently, Helliwell *et al.* (2011) demonstrated the role of some bacteria so tightly attached to calcifying and non calcifying cells of *E. huxleyi* that they could not be disrupted with antibiotics, potentially providing the microalgae with vitamin B₁₂¹². Among 8 species considered as B₁₂-independent 6 belong to Coccolithales. Strongly-attached, antibiotic-resilient bacteria may have been a B₁₂ source for these species. The present paper is the first attempt to compile existing information based on molecular analyses for this phylum and, as no study found a species of Haptophyta phylum encoding *metE* nor a pseudogene, we assume that haptophytes are in majority cobalamin-dependent. This would be the first microalgae phylum gathering exclusively cobalamin auxotrophs, suggesting that their common ancestor did not encode *metE*, while in other phyla only certain species would have lost the B₁₂-independent methionine synthase.

In order to explain the B₁₂ molecular physiology of haptophytes, we selected the model species *T. lutea* for which comprehensive genomic and transcriptomic data were made available. Growth assays in natural seawater without cobalamin enrichment confirmed results of *in silico* approach as *T. lutea* was B₁₂-limited two days after inoculation. Moreover, the absence of calcified coccoliths on the cells prevented presence of non detectable bacteria after strain purification. Adding methionine instead of B₁₂ allowed *T. lutea* to develop, showing its ability to uptake and assimilate dissolved methionine to make up for cobalamin deprivation. This is consistent with another study¹¹ demonstrating that the B₁₂-dependent freshwater chlorophyte *Lobomonas rostrata* could be grown for several subcultures with METH products (*i.e.* methionine and folic acid). Our control without B₁₂ exhibited 10 times lower maximal biomass compared with the control grown with 40 ng L⁻¹ (24 pmol L⁻¹) B₁₂,

suggesting around 4 ng L^{-1} (2.4 pmol L^{-1}) cobalamin concentration in seawater. This is consistent with what was observed by Panzeca *et al.*³⁶ and Suffridge *et al.*³⁵ who estimated cobalamin concentrations ranging from 0.2 to 4 pmol L^{-1} in open oceans and 11 to 15 pmol L^{-1} in coastal ecosystems^{35,36} and indicating that vitamin B₁₂ in natural seawater is limiting for this species. The maximal biomass obtained when *T. lutea* was grown with 500 g L^{-1} methionine was almost 3 times higher than the negative control but the concentration tested here was 625 times the maximal concentration found in seawater, that ranged from 0.27 ng L^{-1} offshore to 790 ng L^{-1} near the coast³⁷. Recently, Suffridge *et al.*³⁵ reported particulate methionine concentrations in seawater along a Mediterranean transect ranging from 0.30 to 3 ng L^{-1} ³⁵. These findings mean that methionine concentrations in natural environment are likely to be limiting for *T. lutea* development and support the idea that auxotrophic microalgae need to be supplemented with a readily available cobalamin source such as vitamin-producing bacteria¹⁴, cell lysate or B₁₂-remodeling algae, that are able to convert the less bioavailable pseudocobalamin into a readily accessible vitamin B₁₂ form³⁸.

We investigated the molecular physiology of *T. lutea* in batch and chemostat by focusing on the expression dynamics of genes involved in vitamin B₁₂ use, transport and conversion. Genes *cblA* and *cblB*, encoding proteins transporting cobalamin to the mitochondrion, were down-regulated under B₁₂ starvation in batch and B₁₂ limitation in chemostat compared with the N-limited controls. This suggests that when B₁₂ is limiting, cobalamin-dependent activities in the mitochondrion are reduced, possibly in favor of other cellular processes. Methionine cycle genes *metH*, *metK* and *sahH* and B₁₂-dependent *mmcm* were not clearly affected by cobalamin starvation in batch. This differs from the results of Bertrand *et al.*^{25,27} for the B₁₂-requiring diatom *Thalassiosira pseudonana*, which exhibited an overexpression of methionine cycle genes in cobalamin starvation with respect to replete conditions^{25,27}. As expression pattern in batch experiments could be the result of numerous cellular processes related to the absence of cell division, these results must be viewed with caution. To bypass this, we implemented cultures in chemostat.

In this experiment, methionine cycle genes, *cblA* and *cblB* exhibited dynamics remarkably mirroring cobalamin quotas, with an overexpression in B₁₂ limitation and downregulation in B₁₂ repletion. These results could mean that upregulation of *metH*, *metK* and *sahH* is needed in cobalamin-limited environments to maintain optimal biochemical kinetics for methionine production and SAM cycling. Interestingly, expression of *mmcm*, that catalyzes the conversion of succinyl-CoA to methylmalonyl-CoA in the mitochondrion with cobalamin as cofactor, remained identical independently of vitamin limitation in batch and chemostat. It has been suggested that B₁₂-dependent MMCM is not vital for growth as not all cobalamin-requiring microalgae possess it¹². Also, the reaction of MMCM is one of many entries in TCA cycle and there could be other mechanisms of regulation at this metabolic level which could explain the lack of modifications in *mmcm* expression. In the proteomic dataset from the N-limited chemostat described by Garnier *et al.*³⁹, methionine cycle proteins and MMCM belonged to the top 400 highest accumulated proteins over the 4330 identified during steady-state. Proteins CBLA and CBLB were not detected in their experiment³⁹. In general, our expression analysis trends are in accordance with their proteomic results, as genes *cblA* and *cblB* were the lowest expressed.

To our knowledge, this is the first time that an analysis of B₁₂ molecular physiology of a microalgae has been conducted in chemostat with accurately described nutrient states. More notably, this is the first time that expression dynamics of methionine cycle genes and B₁₂ transporters to the mitochondrion are correlated to slight changes in vitamin B₁₂ status in a marine microalgae, with rapid response no later than one hour after nutrient amendment. This fast regulation has been reported for *T. lutea* genes coding for nitrate and nitrite transporters (*TlNrt2.1* and *TlNrt2.3*) after addition of different nitrogen substrates⁴⁰. This suggests that haptophytes hold quick acclimation mechanisms to nutrient availability that might explain their ecological success. The fact that these three methionine cycle genes, although not all coding for B₁₂-dependent enzymes, are regulated in the same way raises the question of a common regulation system. Transcription factors are among major players in regulating gene expression, and some of them have already been described for *T. lutea* and related to oxidative stress response, triacylglycerol synthesis and photosynthesis⁴¹. Genes *cblA* and *cblB* were found to belong to a same group regulated by a shared transcription factor but methionine cycle genes were not gathered in a same module⁴¹. McRose *et al.*⁴² identified riboswitches affiliated with genes overexpressed in thiamine (vitamin B₁) starvation in haptophytes microalgae⁴². Therefore, it is likely that such regulation mechanism would play a role in regulating, directly or not, cobalamin-related genes.

In conclusion, this is the first time that B₁₂ dependency of haptophytes has been investigated. Based on 19 species surveyed, and since no haptophyte from the MATOU database was found encoding cobalamin-independent methionine synthase, we propose that haptophytes are cobalamin auxotrophs. Independence from vitamin B₁₂ has been described as a mosaic pattern across evolution^{11–13} where Haptophyta would be the first microalgae phylum to gather only cobalamin-dependent species. The analysis of B₁₂ molecular physiology of the model haptophyte species *T. lutea* has been undertaken. A controlled approach using chemostat cultures was performed to define precisely ecophysiological states, demonstrating the common assertion that this type of approach is of great interest when analyzing fine and rapid molecular changes in microorganisms^{43,44}. Based on these results, we propose that haptophytes use different strategies to make up for cobalamin deprivation that include methionine assimilation, short-term regulation mechanisms in case of sudden B₁₂ supply, such as cobalamin-producing bacteria excretion or cell lysis, and a preferential B₁₂ allocation in the methionine cycle for METH activity. These results point out the importance of this cofactor in haptophytes cellular processes and represent a first attempt to understand the response of these ecologically important communities in vitamin B₁₂-limited environments.

Methods

Sequence similarity search and validation. *In silico* analyses were realized by TBlastN and BlastP sequence similarity searches of the proteins on the new *T. lutea* genome^{31,33} with following entries (Uniprot): *Chlamydomonas reinhardtii* METH (A8HYR2) and METE (A8JH37), *E. huxleyi* METH (R1CGJ7), MAT from *Escherichia coli* (P0A817) and *Arabidopsis thaliana* (Q9SJL8), *Homo sapiens* and *A. thaliana* SAHH

(P23526; O23255), *Rattus norvegicus* CBLA (D3ZNY3), *Homo sapiens* CBLB (Q96EY8) and MMCM (P22033), *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* MMCM (P11653). Homologous genes identified this way were searched again in *T. lutea* genome using TBlastX (expected threshold 1E-1). Conserved functional domains were identified by alignment of nucleic and proteic sequences in NCBI (METH: PFAM02574; METK: PFAM02773; SAHH: PFAM05221; CBLB: PFAM01923; MMCM: PFAM01642, PFAM02310 and PFAM08497).

Searches for methionine synthase isoforms in other haptophytes were firstly realized by BlastX of *T. lutea* METH on NCBI database, allowing to retrieve METH from *Chrysochromulina* sp. CCMP 291, *Thalassiosira pseudonana* CCMP 1335 and *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1055/1. The iMicrobe database was then queried, yielding sixteen haptophyte transcriptomes samples corresponding to 9 haptophyte families (see Table 1 in Supplementary Material for sequence references). TblastN of METE from *C. reinhardtii* (XP_001702934.1, NCBI) and *P. tricornutum* (B7G1X4, Uniprot); and METH from *T. lutea* were realized on the transcriptomes. Transcripts were translated into proteins using NCBI ORFfinder. Protein sequences were then aligned with METH from *T. lutea* and *T. pseudonana* and METE of *P. tricornutum*. Protein sequences were also verified by sequences alignments and conserved domains analyses. Identity and similarity with *T. lutea* sequences were estimated with LALIGN tool. Sequences alignment was conducted with MUSCLE (full mode) on the 21 METH sequences with *T. pseudonana* and *P. tricornutum* taken as outgroup. On total, 1206 positions were conserved on the 1508 initial (80%). Curation step was done with Gblocks tool, allowing gap positions within the final blocks and phylogenetic tree was realized with PhyML (100 bootstraps). Sequences homologous to genomic and proteic METE from *P. tricornutum* and *C. reinhardtii* were searched in the Marine Atlas of Tara Ocean Unigenes (MATOU) for eukaryotic data³² using BlastP and TBlastN (expected threshold 1E-1).

Algal strain and purification. To limit bacterial contamination, a purification step was carried out on *Tisochrysis lutea* CCAP 927/14 strain with an antibiotic treatment mix prepared following the method described by Cho *et al.*⁴⁵. For the following experiments, an inoculum from purified *T. lutea* culture was transferred three times every 10 days. Ten percent volume were transferred each time in new Erlenmeyer flasks containing Conway medium enriched sterile seawater⁴⁶ with B₁₂ omitted in order for the cells to progressively run out their B₁₂ quota. Axenicity was verified in all the experiments by epifluorescence microscopy and cytometric analysis using SYBRTM Green staining (Lonza, USA) and by plating on Marine Agar (BD DifcoTM, Becton Dickinson Company, USA). Petri dishes were then incubated 3 days at 25 °C before further observation. When no bacteria or colony were observed, strains were considered axenic.

Microalgal cultures. *Microtiter plate growth assay.* A growth assay was carried out to assess *T. lutea*'s cobalamin requirement and to investigate whether the microalgae can be grown with methionine, end product of METH activity. Two milliliters inoculum from the last cobalamin-limited batch were dispatched in test tubes (final concentration 1 10⁶ cells mL⁻¹) and enriched with Conway medium either containing 40 ng L⁻¹ B₁₂, or cobalamin free or cobalamin free enriched with 0.5 mg L⁻¹ L-methionine (HPLC grade Sigma; >99% purity). Six replicates were inoculated for each condition in a microtiter plate that was incubated at 26 ± 1 °C and 90 μmol m⁻² s⁻¹. O.D.680 was monitored by spectrophotometry (Quant, BIO-TEK Instruments inc, USA).

Batch experiment. To identify modifications in *T. lutea*'s molecular physiology during vitamin B₁₂ consumption, a cobalamin-limited batch experiment was first performed. Three 1-liter autoclaved glass bottles were inoculated at 2.5 10⁶ cells mL⁻¹ and enriched with Conway medium with 40 ng L⁻¹ B₁₂. Cultures were homogenized by filtered air bubbling (Midisart 0.2 m, Sartorius) and were placed at 27 ± 1 °C with a continuous irradiance of 180 μmol m⁻² s⁻¹ photons. Cellular concentration was followed by counting Lugol stained cells with Malassez haemocytometer. Samples for quantitative analysis of B₁₂ and qPCR were taken at days 2 (early exponential phase) and 20 (stationary phase).

Chemostat experiment. Two inoculi were acclimatized at 27 ± 1 °C under a continuous irradiance of 180 μmol m⁻² s⁻¹ photons. After 10 days, they were divided into four autoclaved glass bottles filled with 4.5 L sterile seawater enriched with modified Conway medium, with a final concentration of either 40 ng L⁻¹ B₁₂ or 25 mg L⁻¹ NaNO₃ to ensure limitation in B₁₂ or nitrogen (N) respectively. Bottles were set up in chemostat supplied with a continuous input of the media described above. The experiment was carried out in duplicate for each condition at 27 ± 1 °C with a continuous irradiance of 400 μmol m⁻² s⁻¹ photons and pH maintained at 8.2 by CO₂ enrichment. Cultures were homogenized properly with a constant input of filtered air and a magnetic stirrer. Dilution rate (D) was adjusted at 0.5 d⁻¹ and monitored daily by weighing system output. Populations were monitored by particulate carbon and nitrogen measurement and cell counting in Malassez haemocytometer. To confirm adequate nutrient limitation and to study physiological modifications after nutrient adding, discrete nutrient input was done at day 25 either with 25 g L⁻¹ NaNO₃ or 40 ng L⁻¹ B₁₂ for the N-limited and B₁₂-limited chemostats respectively.

Biochemical analyses. *Particulate carbon and nitrogen.* Particulate organic nitrogen and carbon were measured by filtering 20 10⁶ cells on 25 mm precombusted GF/F microfibers filters (0.7 m, Whatman, UK). Filters were then dried at 65 °C for at least 12 hours. Particulate organic nitrogen and carbon were analyzed with a CN elemental analyzer (Flash 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

B₁₂ measurements. Intracellular B₁₂ quantification was assessed with an ELISA test kit (Immunolab, Germany) with a sensitivity of 0.3 ng mL⁻¹. Zhu *et al.* showed that neither salinity nor dissolved organic matter do interfere with test quality⁴⁷. This procedure allowed to measure the different chemical forms of vitamin B₁₂ (cyanocobalamin, methylcobalamin, adenosylcobalamin and hydroxycobalamin) with a cross-reactivity of 98–100%

among the chemical variants⁴⁷. Cell pellets (80–150 10^6 cells) were resuspended in 100 μ L PBS buffer (provided in the kit) and extraction was undertaken by boiling 15 minutes at 99 °C as previously described for microalgae⁴⁸. Supernatant was collected after centrifugation (16 000 g, 5 minutes, 4 °C). Extracts were assayed following the method given in the kit, which provided cyanocobalamin solutions as standards. Absorbences at 450 and 620 nm (three technical replicates) were measured with a spectrophotometer (μ Quant, BIO-TEK Instruments inc, USA). Standards and samples absorbency was defined as follows: O.D.450–O.D.620. Cobalamin concentration of samples was calculated using the calibration curve equation.

RNA extraction and RT-qPCR. Cell lysis was obtained by adding 1 ml Trizol (Life Technologies) and 200 μ L chloroform to cell pellets of 300 10^6 cells. Samples were then purified with RNeasy™ kit (Qiagen) following the provided protocol. RNA purity and concentration were verified using a spectrophotometer (Infinite 200 PRO) at 260 and 280 nm. Diluted samples of 250 ng μ L⁻¹ were treated with DNase (Promega) 1 hour at 37 °C. Reverse transcription was performed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) according to the provided protocol. Primer efficiency was quantified following protocol of Schmittgen *et al.*⁴⁹ (see Table 2 on Supplementary Information for primers sequences). Primer specificity was estimated with a denaturation cycle at PCR end. PowerUp™ SYBR™ Green mix (Applied Biosystems) was used for RT-qPCR. Thermocycler (Mx3000P, Agilent) parameters were set as follows: 1 cycle of 15 minutes at 95 °C, 40 cycles of 30 seconds at 95 °C and 30 seconds at 60 °C. Six genes coding for 18S, actin, EF1, GAPDH, tubulin and ubiquitin were tested as house-keeping genes. As GAPDH exhibited low cycle threshold (Ct) variations with the same order of magnitude than target genes it has been selected as reference gene (see Fig. 1 of Supplementary Information). Gene expression was calculated by raising negative cycle threshold values of each pair of primers and dividing it by mean expression of reference gene. Raw data of genes expression is available in Supplementary Datasets 1 and 2 for the batch and chemostat experiments respectively.

References

1. Droop, M. R. A pelagic marine diatom requiring cobalamin. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **34**, 229–231 (1955).
2. Bertrand, E. M. *et al.* Vitamin B₁₂ and iron colimitation of phytoplankton growth in the Ross Sea. *Limnology and Oceanography* **52**, 1079–1093 (2007).
3. Koch, F. *et al.* The effect of vitamin B₁₂ on phytoplankton growth and community structure in the Gulf of Alaska. *Limnology and Oceanography* **56**, 1023–1034 (2011).
4. Moore, C. *et al.* Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geosciences* **6**, 701–710 (2013).
5. Panzeca, C. *et al.* B vitamins as regulators of phytoplankton dynamics. *Eos Transactions American Geophysical Union* **49**, 594–596 (2006).
6. Gobler, C. J., Norman, C., Panzeca, C., Taylor, G. T. & Sañudo-Wilhelmy, S. A. Effect of B-vitamins (B₁, B₁₂) and inorganic nutrients on algal bloom dynamics in a coastal ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology* **49**, 181–194 (2007).
7. Sañudo-Wilhelmy, S. A., Gobler, C. J., Obkamichael, M. & Taylor, G. T. Regulation of phytoplankton dynamics by vitamin B₁₂. *Geophysical Research Letter* **33**, 1–4 (2006).
8. Raux, E., Schubert, H. L. & Warren, M. J. Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂): a bacterial conundrum. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 1880–1893 (2000).
9. Martens, J.-H., Barg, H., Warren, M. J. & Jahn, D. Microbial production of vitamin B₁₂. *Applied Microbial Biotechnology* (2002).
10. Warren, M. J., Raux, E., Schubert, H. L. & Escalante-Semeran, J. C. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). *Nature Product Reports* **19**, 390–412 (2002).
11. Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J. & Smith, A. G. Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* **483**, 90–93 (2005).
12. Helliwell, E. K., Wheeler, G. L., Leptos, K. C., Goldstein, R. E. & Smith, A. G. Insights into the evolution of vitamin B₁₂ auxotrophy from sequenced algal genomes. *Trends in Genetics* **29**, 469–478 (2011).
13. Helliwell, E. K., Wheeler, G. L. & Smith, A. G. Widespread decay of vitamin-related pathways: coincidence or consequence? *Trends in Genetics* **29**, 469–478 (2013).
14. Kazamia, E. *et al.* Mutualistic interactions between vitamin B₁₂-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environmental Microbiology* **14**, 1466–1476 (2012).
15. Droop, M. R. Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging? *Journal of Plankton Research* **29**, 107–113 (2007).
16. Liu, H., Aris-Brosou, S., Probert, I. & de Vargas, C. A time line of the environmental genetics of the haptophytes. *Molecular Biology and Evolution* **27**, 161–176 (2010).
17. Liu, H. *et al.* Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains major pigment paradox in open oceans. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **31**, 1–6 (2009).
18. Jardillier, L., Zubkov, M. V., Pearman, J. & Scanlan, D. J. Significant CO₂ fixation by small prymnesiophytes in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean. *The ISME Journal* **4**, 1180–1192 (2010).
19. Charlson, R. J., Lovelock, J. E., Andreae, M. O. & Warren, S. G. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature* **326**, 655–661 (1987).
20. Malin, G. & Steinke, M. Dimethyl sulfide production: what is the contribution of the coccolithophores? In *Coccolithophores: from molecular processes to global impact*, 127–164 (Thierstein, H. R. & Young, J. R., 2004).
21. González, J. C., Banerjee, R. V., Huang, S., Sumner, J. S. & Matthews, R. G. Comparison of cobalamin-independent and cobalamin-dependent methionine synthases from *Escherichia coli*: two solutions to the same chemical problem. *Biochemistry* **31**, 6045–6056 (1992).
22. Bertrand, E. M. & Allen, A. E. Influence of vitamin B auxotrophy on nitrogen metabolism in eukaryotic phytoplankton. *Frontiers in Microbiology* **3**, 1–16 (2012).
23. Dobson, C. M. *et al.* Identification of the gene responsible for the *cblA* complementation group of vitamin B₁₂-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 15554–15559 (2002).
24. Helliwell, K. E., Collins, S., Kazamia, E., Wheeler, G. L. & Smith, A. G. Fundamental shift in vitamin B₁₂ eco-physiology of a model alga demonstrated by experimental evolution. *The ISME Journal* **9**, 1446–1455 (2015).
25. Bertrand, E. M. *et al.* Methionine synthase interreplacement in diatom cultures and communities: Implications for the persistence of B₁₂ use by eukaryotic phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **58**, 1431–1450 (2013).
26. Banerjee, R. V. & Matthews, R. G. Cobalamin-dependent methionine synthase. *The FASEB Journal* **5**, 1450–1459 (1990).

27. Bertrand, E. M. *et al.* Influence of cobalamin scarcity on diatom molecular physiology and identification of a cobalamin acquisition protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1762–1771 (2012).
28. Goyer, A. Thiamine in plants: aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry* 71, 1615–1624 (2010).
29. Stefels, J. Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *Journal of Sea Research* 43, 183–197 (2000).
30. Thomsen, H., Buck, K. R. & Chavez, F. P. Haptophytes as components of marine phytoplankton. In *The Haptophyte Algae*, 187–208 (Clarendon Press, Oxford, 1994).
31. Carrier, G. C. *et al.* Draft genome and phenotypic characterization of *Tisochrysis lutea* strains. toward the production of domesticated strains with high added value. *Algal Research* 29, 1–11 (2018).
32. Villar, E. *et al.* The ocean gene atlas: exploring the biogeography of plankton genes online. *Nucleic Acid Research* 46, W289–W295 (2018).
33. Berthelot, J. *et al.* A transposable element annotation pipeline and expression analysis reveal potentially active elements in the microalgae *Tisochrysis lutea*. *BMC Genomics* 19 (2018).
34. Cruz-López, R., Maske, H., Yárimizu, K. & Holland, N. A. The B-vitamin mutualism between the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* and the bacterium *Dinoroseobacter shibae*. *Frontiers in Marine Science* 5, 1–12 (2018).
35. Suffridge, C. P. *et al.* B vitamins and their congeners as potential drivers of microbial community composition in an oligotrophic marine ecosystem. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 123, 2890–2907 (2018).
36. Panzeca, C. *et al.* Distributions of dissolved vitamin B₁₂ and Co in coastal and open-ocean environments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85, 223–230 (2009).
37. Sañudo-Wilhelmy, S. A. *et al.* Multiple B-vitamin depletion in large areas of the coastal ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 14041–14045 (2010).
38. Helliwell, K. E. *et al.* Cyanobacteria and Eukaryotic Algae Use Different Chemical Variants of Vitamin B₁₂. *Current Biology* 26, 999–1008 (2016).
39. Garnier, M. *et al.* Comparative proteomics reveals proteins impacted by nitrogen deprivation in wild-type and high lipid-accumulating mutant strains of *Tisochrysis lutea*. *Journal of Proteomics* 105, 107–120 (2014).
40. Charrier, A. *et al.* High-affinity nitrate/nitrite transporter genes (*Nrt2*) in *Tisochrysis lutea*: identification and expression analyses reveal some interesting specificities of haptophyta microalgae. *Physiologia Plantarum* 154, 572–590 (2015).
41. Thiriet-Rupert, S. *et al.* Identification of transcription factors involved in the phenotype of a domesticated oleaginous microalgae strain of *Tisochrysis lutea*. *Algal Research* 30, 59–72 (2018).
42. McRose, M. *et al.* Alternatives to vitamin B₁ uptake revealed with discovery of riboswitches in multiple marine eukaryotic lineages. *The ISME Journal* 8, 2517–2529 (2014).
43. Hoskisson, P. A. & Hobbs, G. Continuous culture - making a comeback? *Microbiology* 151, 3153–3159 (2005).
44. Bull, A. T. The renaissance of continuous culture in the post-genomics age. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37, 993–1021 (2010).
45. Cho, J.-Y. *et al.* A procedure for axenic isolation of the marine microalga *Isochrysis galbana* from heavily contaminated mass cultures. *Journal of Applied Phycology* 14 (2002).
46. Walne, P. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. In *Fishery Investigations*, vol. 26, 62 (1970).
47. Zhu, Q., Aller, R. C. & Kaushik, A. Analysis of vitamin B₁₂ in seawater and marine sediment porewater using ELISA. *Limnology and Oceanography: Methods* 9, 515–523 (2011).
48. Grant, M. A., Kazamia, E., Cicunta, P. & G., S. A. Direct exchange of vitamin B₁₂ is demonstrated by modelling the growth dynamics of algal-bacterial cocultures. *The ISME Journal* 8, 1418–1427 (2014).
49. Schmittgen, T. D., Jiang, J. M., Liu, Q. & Yang, L. Q. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Research* 32, 1–10 (2004).

Acknowledgements

This work was supported by the Atlantic Microalgae program consortium funded by Région Pays de la Loire. The authors wish to thank Ewa Lukomska for dedicated assistance for carbon and nitrogen measurements, Jean-Baptiste Bérard for kind help and support during the chemostat experiment, Bruno Saint-Jean and Gaël Bougaran for kind assistance and helpful comments on the results.

Author Contributions

C.N., S.J., F.M., R.K., D.G. and M.G. conceived the experiments. C.N. and S.J. conducted the experiments. C.N., S.J., F.M., R.K. and M.G. analyzed the results. C.N. wrote the manuscript and prepared the figures. All authors reviewed and accepted the final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44797-w>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Supplementary Information

How haptophytes microalgae mitigate vitamin B₁₂ limitation

Charlotte Nef*, Sébastien Jung, Francis Mairet, Raymond Kaas, Dominique Grizeau and Matthieu Garnier

*Corresponding author

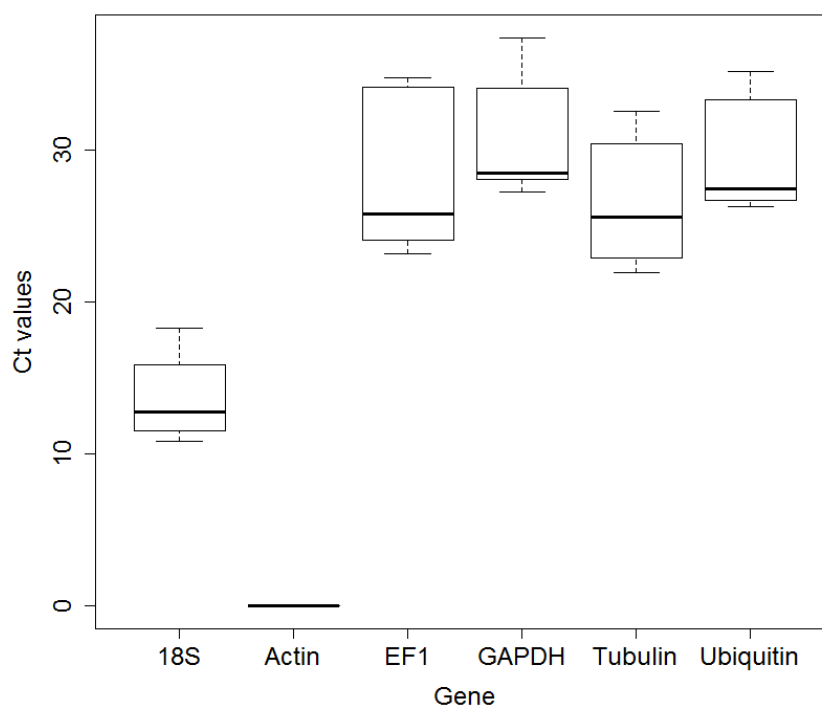
Supplementary Table 1. Reference of cobalamin-dependent methionine synthase (*metH*) sequences compiled for phylogenetic analysis. Identity and similarity percentages with *T. lutea* sequence are provided.

Data	Family	Species	Strain	iMicrobe sample reference	iMicrobe sample collection site	Sequence name	Evalue	Score	Identity/Similarity (%)
Genomic	Isochrysidaceae	<i>Tisochrysis lutea</i> *	CCAP 927/14			1602	-	-	-
Transcriptomic	Isochrysidaceae	<i>Isochrysis</i> sp.	CCMP 1244	MMETSP1090	North Atlantic	CAMNT_0042019453	0	2407	86.8/95.8
Transcriptomic	Isochrysidaceae	<i>Isochrysis</i> sp.	CCMP 1323	MMETSP0944	Irish Sea	CAMNT_0021684687	0	3001	92.7/97.9
Transcriptomic	Prymnesiaceae	<i>Chrysochromulina rotalis</i>	UIO 044	MMETSP0287	North Sea	CAMNT_0003299591	0	2098	76.2/88.9
Transcriptomic	Prymnesiaceae	<i>Chrysochromulina brevifilum</i>	UTEX LB 985	MMETSP1094	English Channel	CAMNT_0015937587	0	2052	74.9/89.5
Transcriptomic	Prymnesiaceae	<i>Prymnesium parvum</i>	Texoma1	MMETSP0006	Lake Texoma, Oklahoma	CAMNT_0024934099	10 ⁻¹⁰³	379	77.7/91.0
Transcriptomic	Pavlovophyceae	<i>Pavlova gyraus</i>	CCMP 608	MMETSP1466	Helford river, Falmouth, UK	CAMNT_0053406913	0	1917	70.9/87.2
Transcriptomic	Pavlovophyceae	<i>Pavlova lutheri</i>	RCC 1537	MMETSP1463	North Sea	CAMNT_0053336917	0	1897	71.8/86.6
Transcriptomic	Phaeocystaceae	<i>Phaeocystis antarctica</i>	CCMP 1374	MMETSP1444	Ross Sea	CAMNT_0043842521	10 ⁻¹¹⁸	424	77.1/89.4
Transcriptomic	Noëlarhabdaceae	<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	RCC 1303	MMETSP1364	-	CAMNT_0027971079	0	2387	86.7/95.7
Transcriptomic	Noëlarhabdaceae	<i>Emiliana huxleyi</i>	379	MMETSP0994	English Channel	CAMNT_0041613577	0	2407	86.8/95.8
Transcriptomic	Noëlarhabdaceae	<i>Emiliana huxleyi</i>	PLY M219	MMETSP1150	-	CAMNT_0023937657	0	2409	86.8/95.7
Transcriptomic	Noëlarhabdaceae	<i>Emiliana huxleyi</i>	CCMP 370	MMETSP1154	-	CAMNT_0024259279	0	2408	86.8/95.7
Transcriptomic	Calcidiscaceae	<i>Calcidiscus leptoporus</i>	RCC 1130	MMETSP1334	South Atlantic	CAMNT_0007365605	2*10 ⁻⁹⁸	361	77.4/90.9
Transcriptomic	Pontosphaeraceae	<i>Scyphosphaera apsteinii</i>	RCC 1455	MMETSP1333	Spanish coast, Mediterranean Sea	CAMNT_0007313019	6*10 ⁻⁸⁶	319	79.6/91.8
Transcriptomic	Pleurochrysidaceae	<i>Pleurochrysis carterae</i>	CCMP 645	MMETSP1136	-	CAMNT_0010116929	10 ⁻¹⁴⁵	517	78.9/91.0
Transcriptomic	Coccolithaceae	<i>Coccolithus pelagicus</i> ssp. <i>braarudi</i>	PLY 182g	MMETSP0164	English Channel	CAMNT_0025532985	3*10 ⁻⁹⁰	333	76.5/89.5
Proteomic	Prymnesiaceae	<i>Chrysochromulina</i> sp.	CCMP 291	-		KOO28302.1	0	2006	74.9/88.4
Proteomic	Noëlarhabdaceae	<i>Emiliana huxleyi</i>	CCMP 1516	-		XP_005791493.1	0	2228	82.0/91.4
Proteomic	Thalassiosiraceae	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CCMP 1335	-		XP_002293120.1	0	1352	55.8/79.9
Proteomic	Phaeodactylaceae	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	CCAP 1055/1	-		XP_002184461.1	0	1320	56.3/78.7

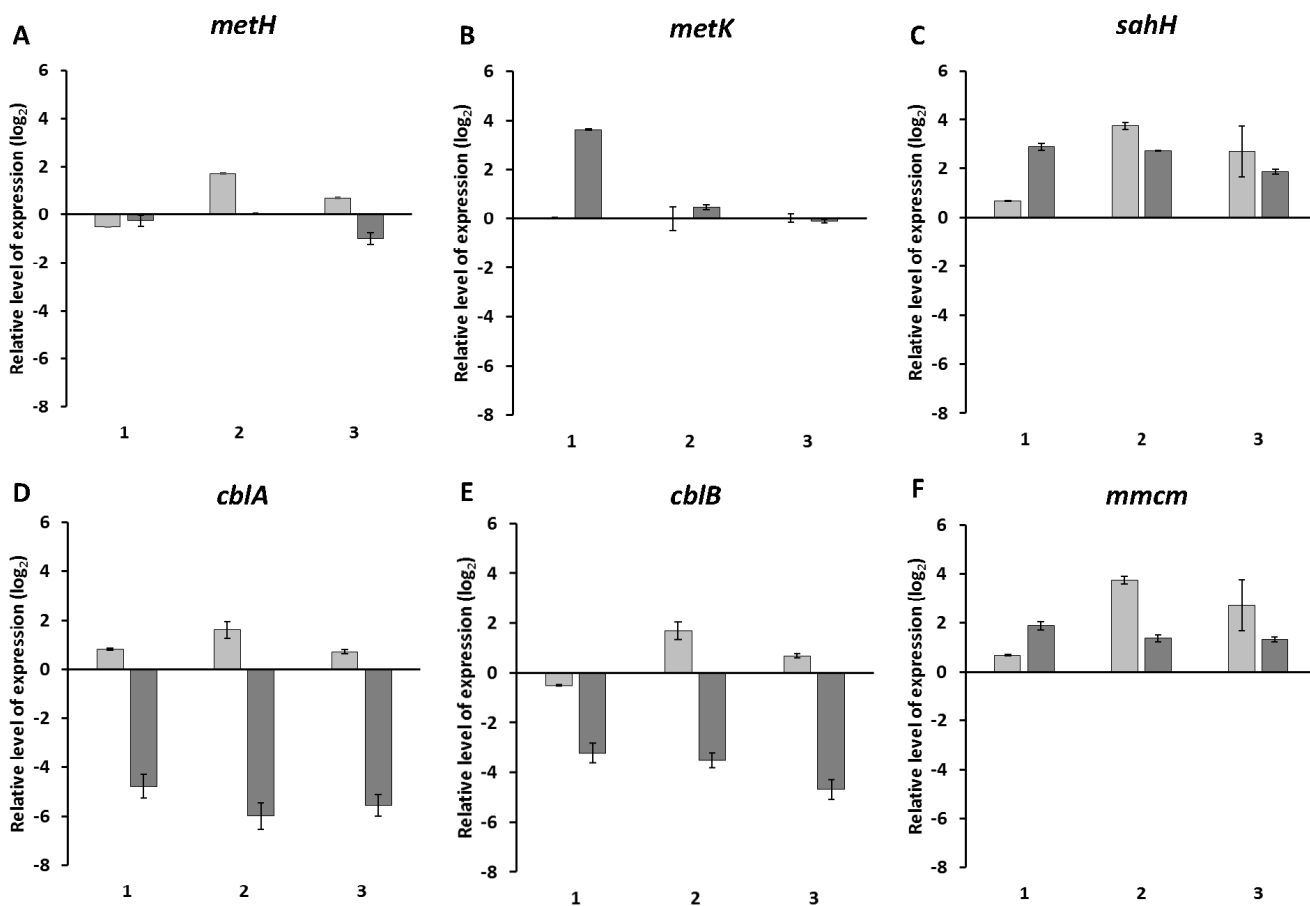
*See Carrier et al. (2018) and Bertheliet et al. (2018) for *T. lutea* genome.

Supplementary Table 2. Primer sequences used for RT-qPCR analyses.

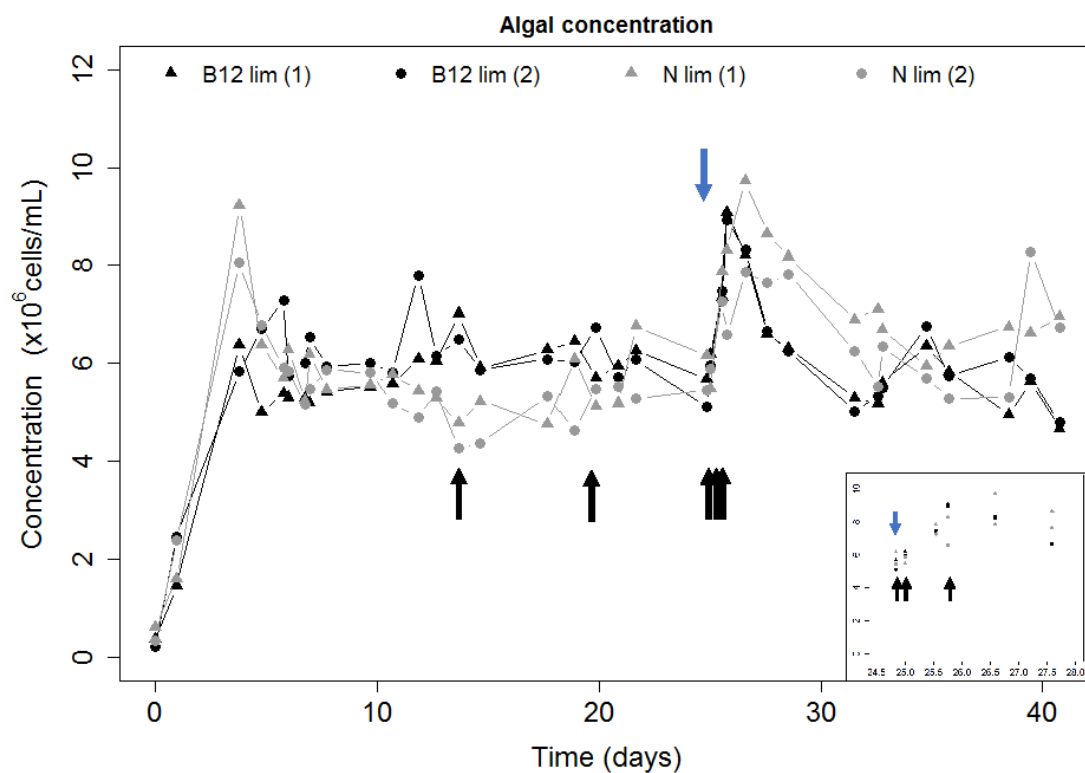
Gene	Primer name	Primer sequence (5' → 3')
<i>metH</i>	METH-F	CGAACTGCTCCATCACAAGA
	METH-R	GACGGATGCCTTGGTACTTG
<i>metK</i>	METK-F	TATTGCCGTTCTTCAGCTTG
	METK-R	AAGTACACTGGCCCGGAGAT
<i>sahH</i>	SAHH-F	GCTGGAGGAGTACTGGTGGT
	SAHH-R	CTCATGGAGGAGGAGGGTTG
<i>cblA</i>	CBLA-F	GTGCAGCTTGTCCAGCACT
	CBLA-R	CTCAGTCATGTGACCCAACG
<i>cblB</i>	CBLB-F	CGTCGATCCATCCACCAC
	CBLB-R	TGAGCCAACATCAAGTAGTCG
<i>mmcm</i>	MMCM-F	CACGCAGTCTGTGCGCAAG
	MMCM-R	CGAGAAGACCAAGGGGAGACT



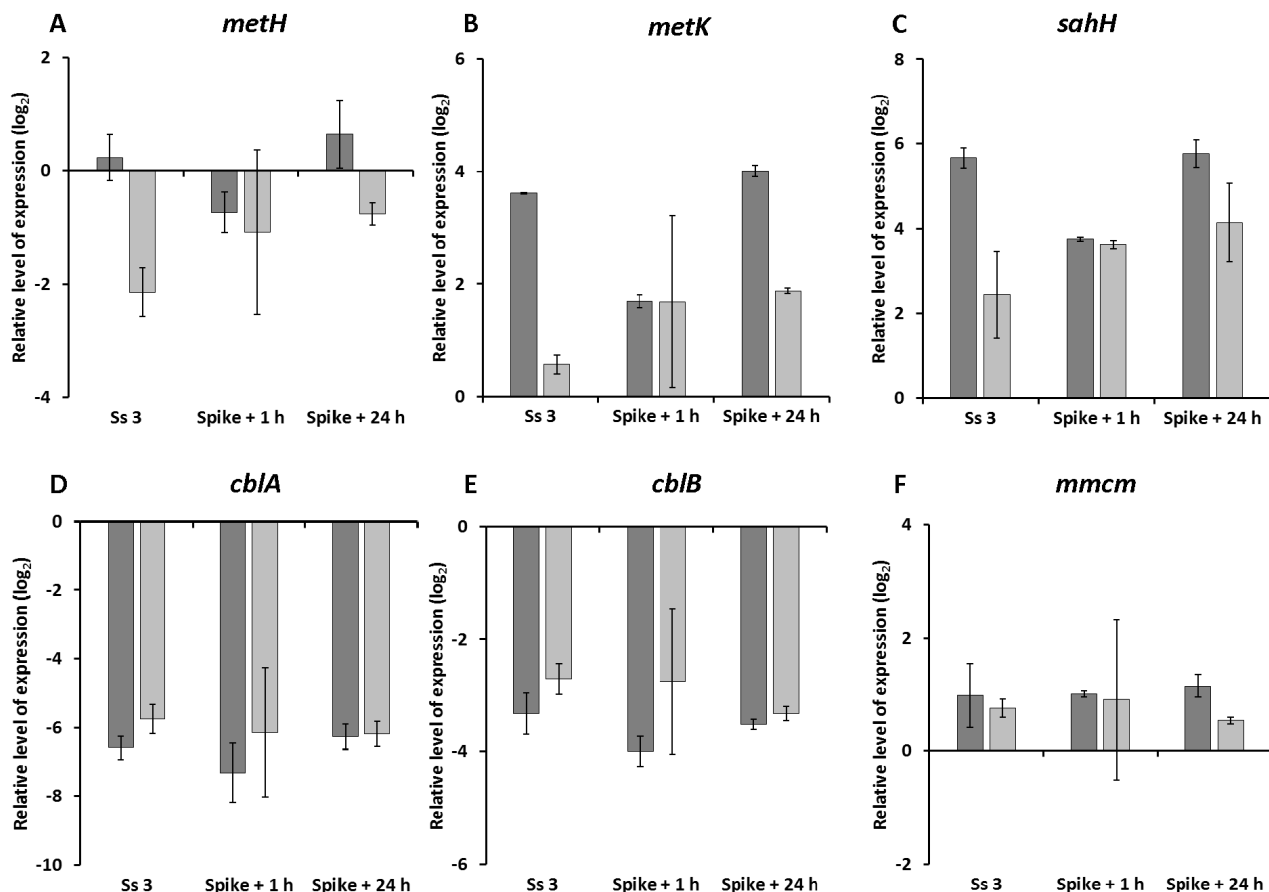
Supplementary Figure 1. Boxplot of Ct variation for reference genes tested with bold line indicating median (n = 18).



Supplementary Figure 2. Genes expression in B₁₂-limited batch cultures of *T. lutea*. Relative levels of expression of (A) *METH*, (B) *METK*, (C) *SAHH*, (D) *CBLA*, (E) *CBLB* and (F) *MMCM* genes. Values represent mean expression level at exponential phase (gray) and stationary phase (black) quantified and normalized using *GAPDH* as reference gene. Data are log₂ normalized. Values are shown for each biological replicate (1, 2 and 3). Bars indicate means of technical triplicate measurements and error bars represent one standard deviation.



Supplementary Figure 3. Algal concentration for chemostat cultures of *Tisochrysis lutea*. Blue arrows represent nutrient spike, black arrows indicate sampling points (Ss 1, 2, 3, spike + 1 h and spike + 24 h). Data are for B₁₂-limited (black) and nitrogen-limited (gray) chemostats.



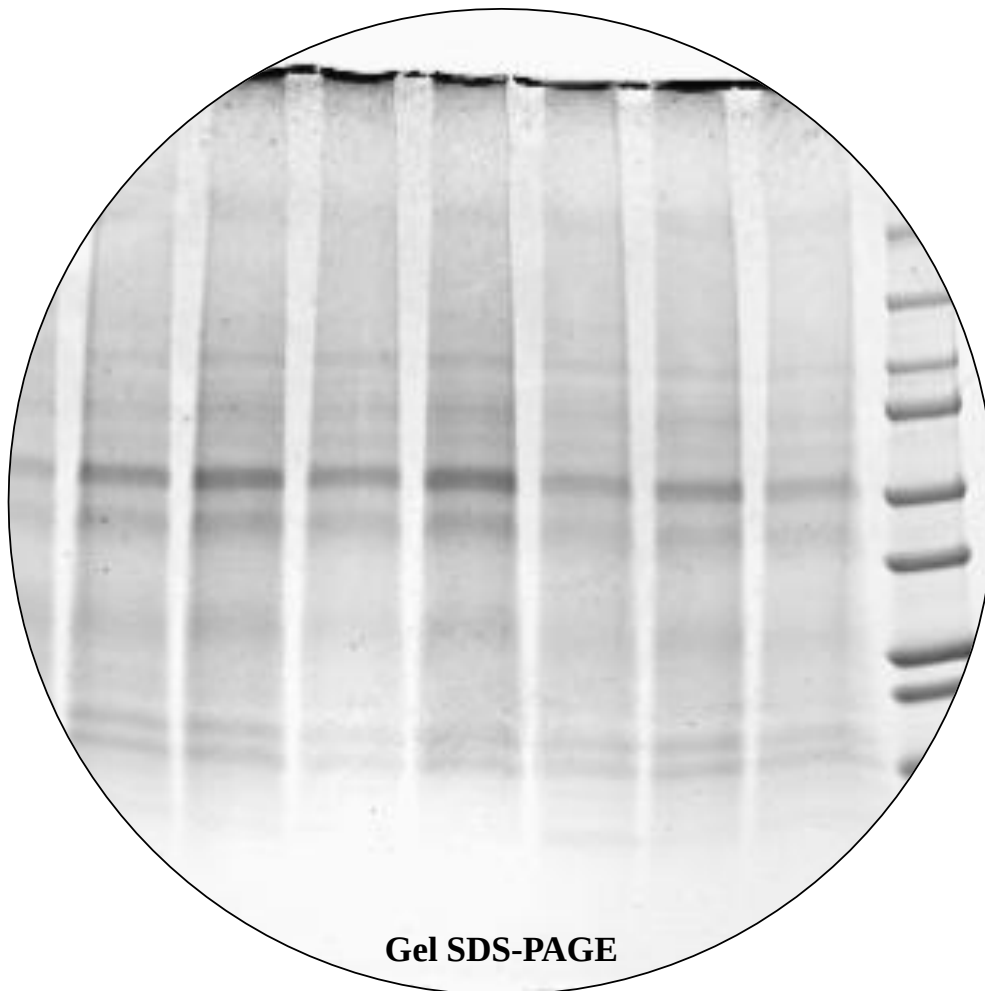
Supplementary Figure 4. Genes expression in chemostat cultures of *T. lutea* during steady-state (Ss), 1 and 24 hours after nutrient spike for (A) *METH*, (B) *METK*, (C) *SAHH*, (D) *CBLA*, (E) *CBLB* and (F) *MMCM* genes. Data are for B₁₂-limited (black) and nitrogen-limited (gray) chemostats and are log₂ normalized. Values represent mean expression level quantified and normalized using *GAPDH* as reference gene. Bars indicate means of biological duplicates and error bars represent the range.

References

- Carrier, G. C. *et al.* Draft genome and phenotypic characterization of *Tisochrysis lutea* strains. Toward the production of domesticated strains with high added value. *Algal Res.* **29**, 1–11 (2018).
- Berthelie, J. *et al.* A transposable element annotation pipeline and expression analysis reveal potentially active elements in the microalgae *Tisochrysis lutea*. *BMC Genomics* **19** (2018).

Chapitre 3

Analyse intégrée de l'effet d'une limitation en vitamine B₁₂ sur le métabolisme global de *T. lutea*



Gel SDS-PAGE

Sommaire

3.1	Introduction.	113
3.2	Matériel et méthodes	114
3.2.1	Dosage des principaux métabolites	114
3.2.2	Analyses de protéomique comparative	115
3.3	Résultats et discussion	123
3.3.1	La limitation en vitamine B ₁₂ conduit a un réarrangement rela- tivement faible du protéome de <i>T. lutea</i>	123
3.3.2	Recherche d'une protéine d'acquisition de la cobalamine.	125
3.3.3	La synthèse de S-adenosyl méthionine semble importante pour la régulation physiologique en limitation en vitamine B ₁₂	128
3.3.4	Le catabolisme des protéines et acides aminés est réduit en limi- tation en B ₁₂	129
3.3.5	Une limitation en vitamine B ₁₂ conduit à la sous-accumulation des protéines liées à la remobilisation des squelettes carbonés	130
3.3.6	La vitamine B ₁₂ est potentiellement impliquée dans la régula- tion de la photosynthèse chez <i>T. lutea</i>	131
3.3.7	La limitation en vitamine B ₁₂ contraint fortement la synthèse de DMSP qui est remplacé par d'autres osmolytes azotés	132
3.4	Conclusion	138
3.5	Article 2 : B ₁₂ limitation affects global metabolism and DMSP produc- tion in the model haptophyte microalgae <i>Tisochrysis lutea</i>	141

3.1 Introduction

Les résultats présentés dans le chapitre précédent ont permis d'émettre la proposition que le groupe des Haptophytes est formé uniquement d'espèces auxotrophes pour la vitamine B₁₂. C'est le premier taxon de microalgues identifié à présenter cette caractéristique. Les approches culturales, moléculaire et biochimique ont permis de caractériser de façon ciblée l'effet d'une limitation en B₁₂ sur l'expression des gènes liés au cycle de la méthionine et au transport de la B₁₂ chez l'espèce haptophyte *T. lutea*. Nous avons proposé des mécanismes physiologiques potentiellement mis en place par les Haptophytes pour pallier le manque de vitamine B₁₂.

Les microalgues haptophytes contribuent de façon importante au cycle du carbone par leur capacité photosynthétique et la séquestration des carbonates par les Coccolithophores (Milliman, 1993 ; Liu et al., 2009 ; Jardillier et al., 2010). Ces microalgues sont aussi parmi les principaux producteurs du diméthylsulfoniopropionate (DMSP), un précurseur essentiel du cycle du soufre (Keller, 1989 ; Matrai and Keller, 1994 ; Keller et al., 1999 ; Malin and Steinke, 2004 ; Franklin et al., 2010). Comme les concentrations en cobalamine dans l'environnement sont régulièrement limitantes pour le développement des microalgues (Sañudo-Wilhelmy et al., 2006 ; Gobler et al., 2007 ; Koch et al., 2011), comprendre les processus métaboliques liés à un manque de B₁₂ chez ces algues présente donc un intérêt écologique majeur. À notre connaissance, il n'y a pas d'étude analysant de façon intégrée l'effet d'un manque de vitamine B₁₂ sur le métabolisme d'une microalgue auxotrophe pour ce cofacteur. Le présent chapitre a donc pour ambition de répondre à la question suivante :

- Quelles sont les modifications métaboliques globales associées à une limitation en vitamine B₁₂ chez la microalgue haptophyte *T. lutea* ?

Le matériel biologique utilisé dans ce chapitre provient des cultures en mode chémostat du chapitre 2 aux mêmes points de prélèvement soient limitation, réplétion et déplétion en vitamine B₁₂ en considérant les cultures limitées en azote en témoins (voir Figure 2.5). Des analyses biochimiques ont été réalisées afin de quantifier les proportions de métabolites d'intérêt dans la cellule. Nous nous sommes également basés sur une approche de protéomique comparative pour analyser les différences relatives d'accumulation des enzymes aux conditions écophysiologiques testées. La méthode employée permet d'émettre des hypothèses sur l'influence des conditions écophysiologiques sur les

voies métaboliques pour lesquelles l’accumulation d’enzymes est impactée. Nous avons choisi cette approche du fait de sa complémentarité (à plus grande échelle, non ciblée et au niveau protéique) avec les analyses d’expression de gènes réalisées dans le chapitre 2.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Dosage des principaux métabolites

Différents dosages ont été réalisés afin de caractériser les phénotypes aux différentes conditions de culture. Les principaux métabolites cellulaires ont été quantifiés : soit les protéines, glucides et lipides totaux ainsi que les acides aminés libres et les principaux pigments (chlorophylles et caroténoïdes dont xanthophylles). Les osmolytes majeurs retrouvés chez les Haptophytes (DMSP, proline, méthionine et glycine bêtaïne) ([Gebser and Ponhert, 2013](#)) ont également été dosés. La Table 3.1 présente les méthodes utilisées. Les détails des méthodes sont présentés dans l’article page 143.

TABLE 3.1 – Métabolites quantifiés et méthodes de dosage associées. Les détails des points méthodologiques sont développés dans le matériel et méthodes de l’article en fin de chapitre.

Métabolite	Méthode de quantification
Protéines	Kit de mesure colorimétrique à l’acide bi-cinchronique Pierce™
Glucides	Dubois et al. (1956)
Lipides	Gravimétrie
Acides aminés libres	HPLC
Pigments	HPLC-UV/DAD
Osmolytes	HPLC-MS

Les quantités de carbone et d’azote particulières ont aussi été mesurées pour estimer l’allocation du carbone et de l’azote entre les différents métabolites pour chaque condition environnementale. Des mesures de carbone organique dissous ont été réalisées sur les filtrats de cultures en chémostat de *T. lutea* lors des équilibres limités en B₁₂ et en azote. Le carbone organique total a été mesuré avec un COT-mètre (Shimadzu). Les valeurs de

carbone organique mesurées dans la poche contenant le milieu de culture du chémostat ont été soustraites de celles mesurées dans le filtrat de la culture pour quantifier la matière organique excrétée par *T. lutea*. Les valeurs obtenues correspondent à environ 18 % du carbone particulaire (une moyenne de $8,24 \pm 1,83$ mg C/L) pour les cultures limitées en cobalamine et à 13 % du carbone particulaire ($6,38 \pm 1,50$ mg C/L) pour celles limitées en azote.

3.2.2 Analyses de protéomique comparative

Définition de la protéomique Le protéome fait référence à l'ensemble des protéines exprimées par un génome. La protéomique désigne la caractérisation du protéome d'un échantillon à des conditions données. Ces analyses rassemblent principalement l'identification et la quantification des protéines et peuvent aussi inclure la localisation cellulaire, l'analyse structurelle, l'analyse fonctionnelle et les éventuelles modifications post-traductionnelles (glycosylation ou phosphorylation par exemple) ainsi que les interactions protéine-protéine ou protéine-ligand. L'intérêt majeur de cette approche est la catégorisation fonctionnelle des protéines, qui permet de relier une protéine donnée à une fonction particulière.

L'objectif de la protéomique comparative est d'étudier les changements du protéome (par exemple les différences d'accumulation en protéines ou les niveaux de phosphorylation des protéines) entre plusieurs échantillons obtenus dans des conditions ou environnements différents, ici dans des conditions écophysiologiques différentes.

Objectifs de l'étude Dans notre étude, nous avons souhaité identifier les voies métaboliques différenciellement affectées par la limitation en B₁₂ chez *T. lutea* et tenté de les associer à d'éventuelles modifications phénotypiques. C'est pourquoi nous avons utilisé une approche de protéomique comparative. Nous souhaitons comparer l'état d'équilibre limité en B₁₂ par rapport à l'équilibre limité en azote. Les limitations en vitamine B₁₂ et en azote touchent directement la synthèse des acides aminés et des protéines. La comparaison de l'effet de ces deux limitations devrait permettre d'identifier des différences métaboliques fines et spécifiques de chaque élément nutritif. Nous avons analysé les 3 points à l'équilibre pour chaque condition (Figure 2.5).

D'autre part nous souhaitons étudier l'effet des dynamiques d'acquisition et de déplétion en vitamine B₁₂ pour identifier les protéines répondant rapidement aux variations

du quota en ce cofacteur. Les points une heure et 24 heures après ajout discret de la vitamine dans les cultures ont donc été analysés (Figure 2.5). Il en a été de même pour les chémostats limités en azote.

Déroulement des analyses Les étapes suivies pour l'analyse des échantillons sont synthétisées dans la Figure 3.1. Premièrement, les protéines totales ont été extraites des échantillons prélevés aux différents points d'intérêt dans les cultures, puis dosées via l'utilisation d'un kit de dosage des protéines pour Qubit™. Ensuite, vingt microgrammes de protéines de chaque échantillon ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 10 % pour les séparer en fonction de leur masse (Figure 3.1). La Figure 3.2 présente un exemple de migration sur gel SDS-PAGE. Après migration, les gels ont été envoyés à la plateforme d'analyse protéomique Paris Sud-Ouest (PAPPSO) de l'INRA (MICALIS, Jouy-en-Josas). Les différents gels y ont été découpés en trois bandes et ont subi une digestion à la trypsine pour découper les protéines. Les échantillons ont été extraits et séparés par chromatographie en phase liquide (LC) puis injectés dans le spectromètre de masse couplé à la LC (Figure 3.1).

En entrée du spectromètre de masse (MS), les échantillons sont ionisés sous forme gazeuse et un spectre de masse (pic), ayant un temps de rétention, un rapport masse/charge (m/z) et une intensité spécifiques est généré pour chaque composé analysé. Le bruit de fond en -MS simple peut être important du fait de la présence des autres composés dans les échantillons. Une fragmentation des composés cibles en MS2 permet d'augmenter la spécificité et donc la sensibilité de détection des métabolites, et apportent une information structurale sur la protéine initiale. Les échantillons envoyés à PAPPSO ont été analysés par un couplage LC-MS/MS.

Les analyses par spectrométrie de masse utilisées ici sont basées sur le principe de *peptide mass fingerprint*. Le principe est le suivant : la connaissance de l'origine d'une protéine par le biais du génome de l'organisme étudié permet d'attribuer une séquence en acides aminés théorique à la protéine. Après digestion de la protéine, les rapports m/z des peptides sont obtenus, correspondant à l'empreinte de la protéine avec les sites de coupure spécifiques (dûs ici à la trypsine) (Figure 3.3). En comparant une base de données expérimentale de peptides (masses mesurées) à une base de données *in silico* (masses théoriques) il est alors possible d'identifier les protéines présentes dans les échantillons analysés (Figure 3.3). Dans notre étude, une première base de données protéique *in silico*

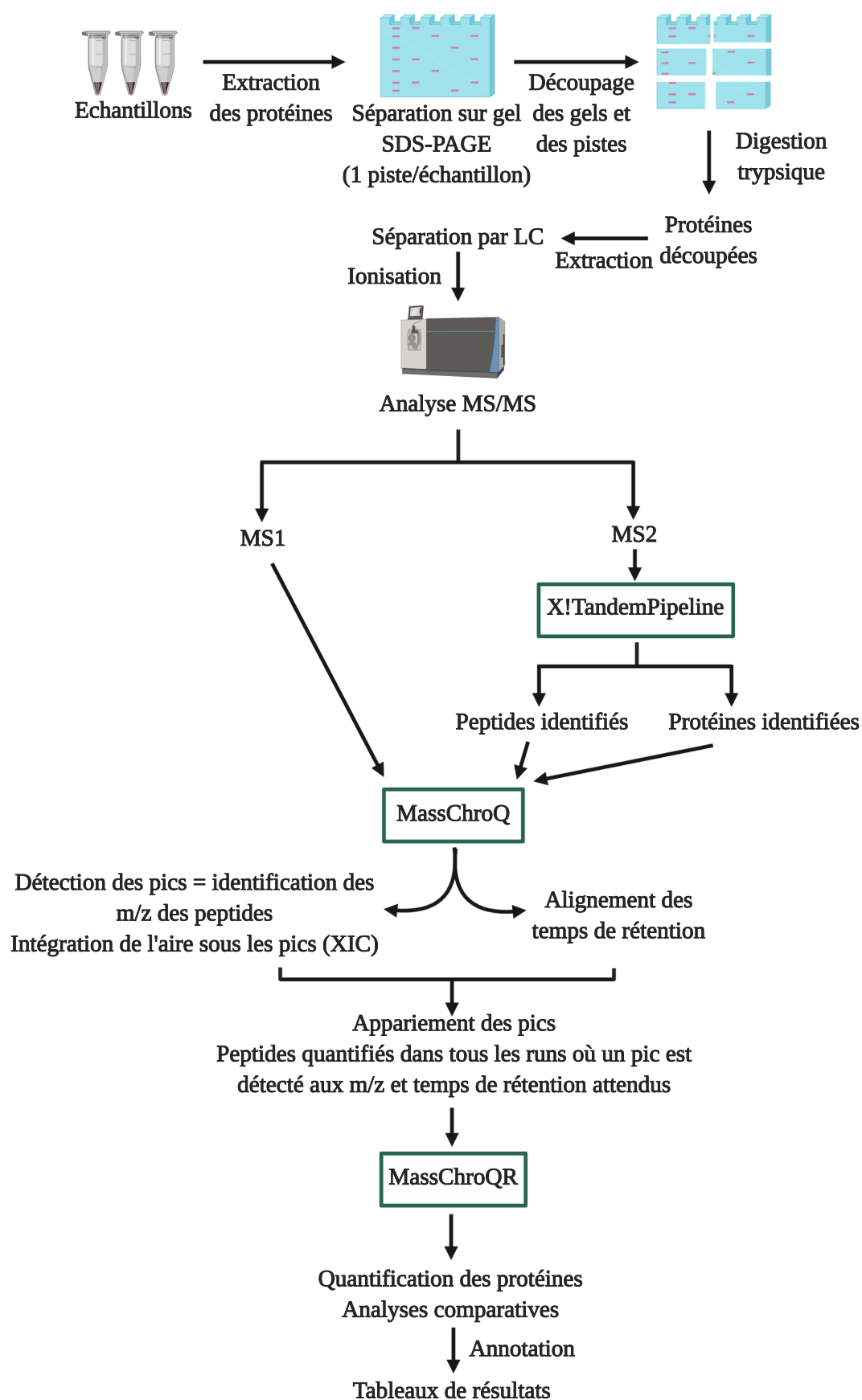


FIGURE 3.1 – Méthodologie des analyses de protéomique comparative. Les encadrés verts représentent les logiciels utilisés. LC : chromatographie en phase liquide ; MS : spectrométrie de masse.

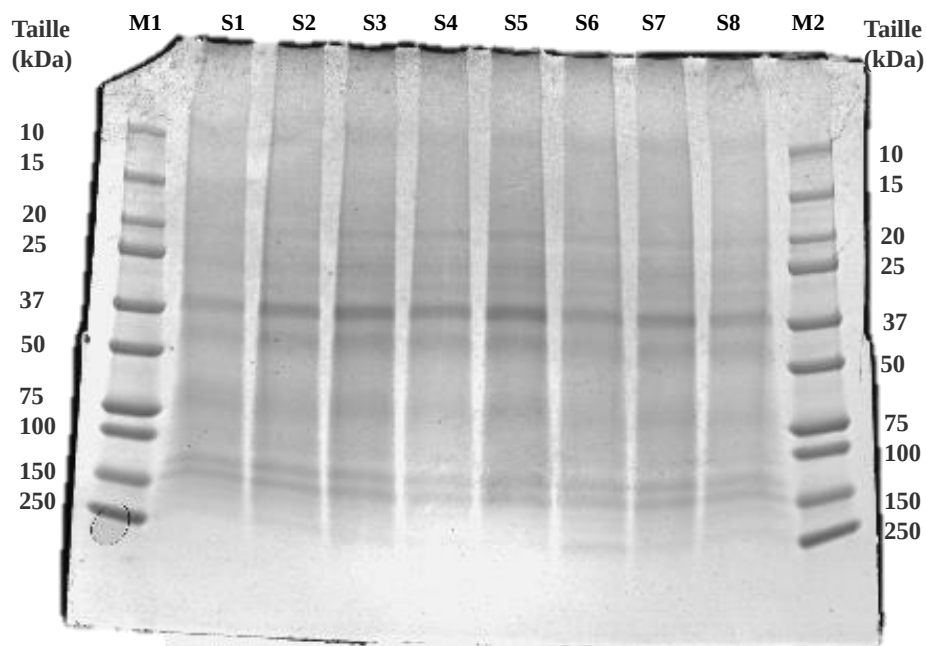


FIGURE 3.2 – Photographie d'une migration sur gel SDS-PAGE 10 % pour les analyses de protéomique comparative. Les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie. M1 et M2 : marqueurs de taille (Bio-Rad 161-0373, les tailles de bandes en kDa sont affichées); S1-S8 : pistes des échantillons.

a été générée à PBA à partir de données génomiques et transcriptomiques de *T. lutea*. Une seconde base de données peptidique *in silico* a été créée par l'INRA à partir de la première. La base de données peptidique a ainsi été utilisée pour l'identification des protéines et les relier au génome de la microalgue.

Identification des protéines J'ai suivi une formation de l'INRA visant à apprendre à exploiter et à analyser statistiquement les données brutes obtenues en sortie du spectromètre de masse. Ici, nous avons utilisé le logiciel open source X!TandemPipeline (version 0.2.21), développé par PAPPISO afin d'identifier les peptides présents dans les échantillons (Figure 3.1). Les algorithmes de ce logiciel permettent de calculer le score de probabilité en fonction de la couverture protéique par les peptides. Chaque peptide issu d'une protéine fragmentée a été assigné à la protéine correspondante, permettant d'identifier les protéines présentes. Les contaminants tels que les kératines ont été pris en compte. Les résultats ont été filtrés en considérant un minimum de deux peptides nécessaires pour identifier une protéine, une *e*-value peptidique inférieure à 0.01 ainsi qu'une *e*-value protéique inférieure à 10^{-4} . Une base de données inverse a été utilisée pour calculer des faux positifs (false discovery rates, FDR). Au final un FDR de 0.05 % a été obtenu pour le

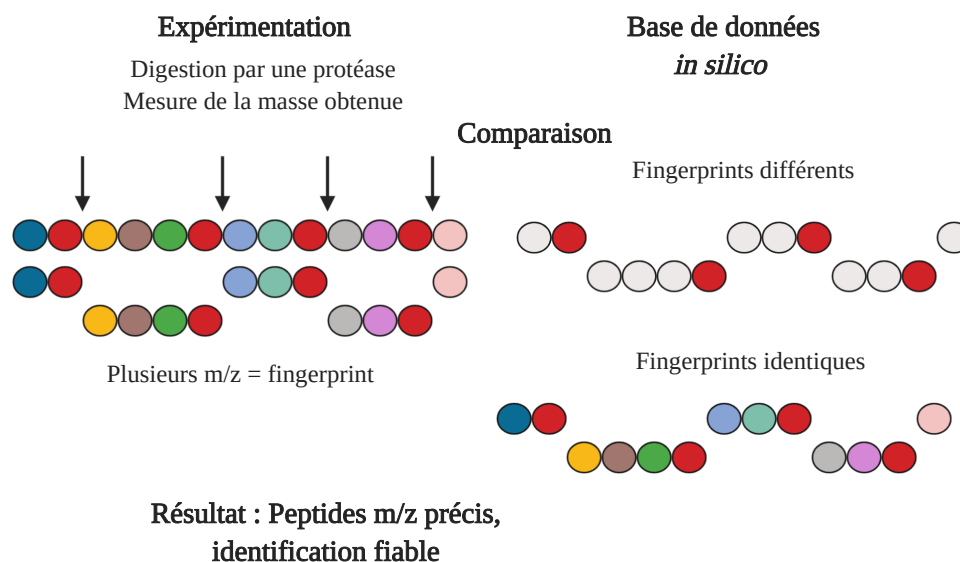


FIGURE 3.3 – Principe du *peptide mass fingerprint* pour l'identification des protéines. Les protéines découpées sont séparées et ionisées par LC-MS. L'identification de la protéine entière sur la base du rapport m/z est impossible du fait d'autres protéines de séquences différentes pouvant partager le même m/z. Le découpage des protéines et leur passage en MS/MS permet d'obtenir des m/z précis avec empreinte d'une coupure spécifique de chaque séquence protéique. L'identification de la protéine est beaucoup plus fiable.

niveau peptidique et de 0 % au niveau protéique.

Quantification des peptides L'étape précédente a permis d'identifier les peptides et protéines présents dans les échantillons en se référant à la base de données *in silico* de *T. lutea*. L'étape suivante a consisté en la quantification des peptides puis des protéines correspondantes. Pour cela, le logiciel MassChroQ, également open source et développé par l'INRA (Valot et al., 2011), a été utilisé (Figure 3.1). Tout d'abord, les temps de rétention de l'appareil pouvant beaucoup varier entre les injections, il a été nécessaire d'aligner les différents runs d'échantillons. L'alignement a été effectué en prenant les peptides communs d'un échantillon en milieu de passage comme point d'ancrage entre les échantillons. Ensuite, les aires sous les pics ont été intégrées.

À partir de là, trois méthodes complémentaires et plus ou moins quantitatives sont couramment appliquées pour quantifier les peptides (Figure 3.4) :

- *Peak counting* (PC) : Compte le nombre de fois où un pic a été identifié à la position attendue en MS1 (avant fragmentation), caractérisée par un rapport masse/charge (m/z) et un temps de rétention spécifiques. Le PC ne compte qu'une fois un pic quelle que soit sa taille et est moins dynamique que le SC. Cette méthode est semi-quantitative (Figure 3.4).

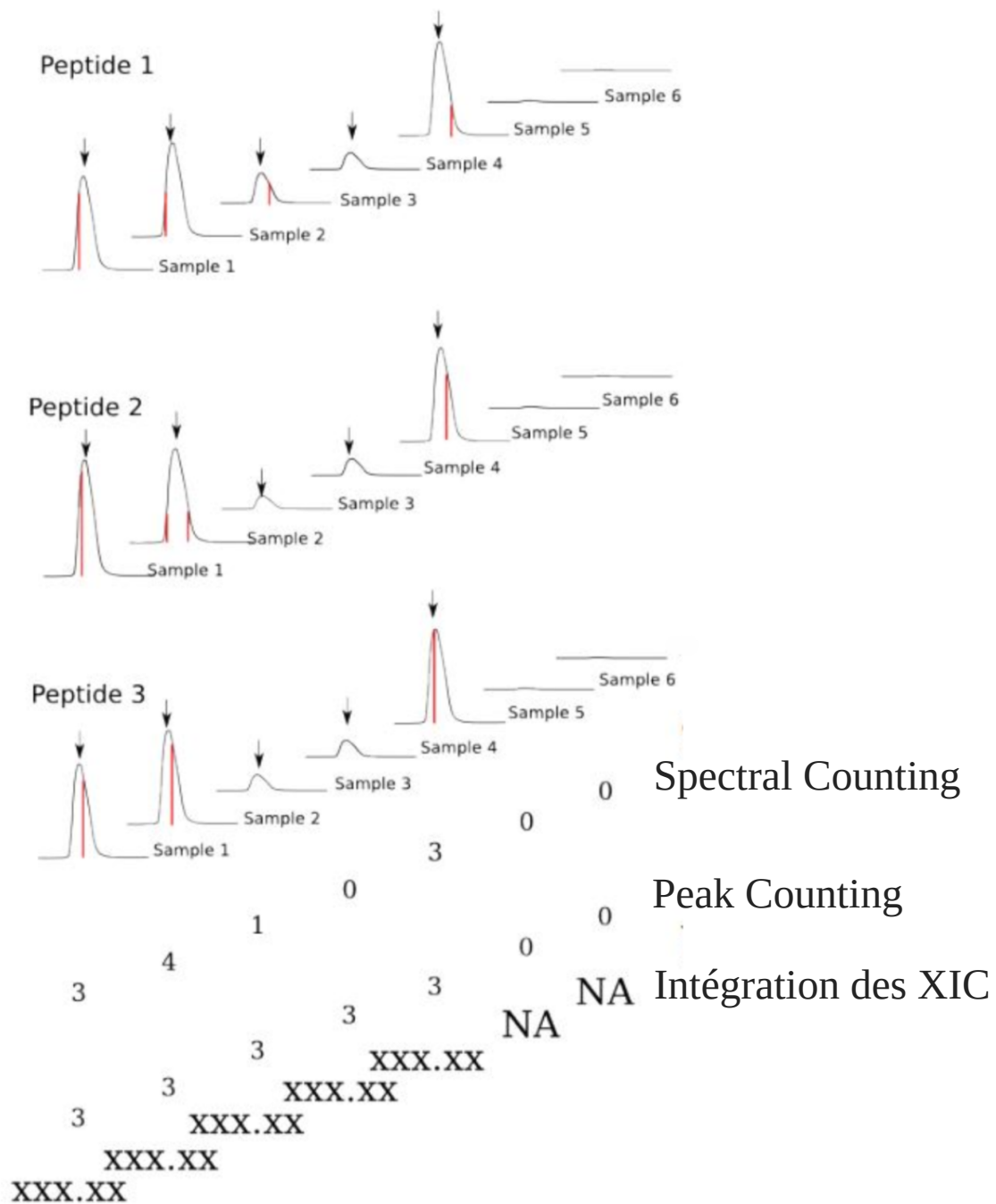


FIGURE 3.4 – Exemple de la quantification de 3 peptides de la même protéine dans six échantillons par Spectral Counting, Peak Counting et intégration des aires sous les pics (XIC) (source formation protéomique INRA)

- *Spectral counting* (SC) : Compte le nombre de spectres de fragmentation en MS2 associés aux peptides d'une protéine en MS1. Le nombre de peptides est corrélé à l'abondance d'une protéine. La somme de ces événements est donc un proxy de l'abondance protéique. Une des limites de cette méthode est la saturation du signal de SC pour les protéines en forte abondance, qui masquent les signaux des protéines peu abondantes (Figure 3.4). Cette méthode est semi-quantitative. Il y a plus de "trous" que dans le PC et le SC ne tient pas compte des peptides partagés par plusieurs protéines.
- *Extracted ion current* (XIC) : Les aires sous les spectres sont extraites et intégrées pour les positions m/z attendues en fonction du temps de rétention. La largeur du pic est proportionnelle à l'abondance de la protéine. Cette méthode est plus précise et quantitative que les deux autres car elle intègre le peptide et la protéine en se référant aux peptides en LC. La limite de cette méthode est qu'elle ne permet pas de mesurer les variations en présence/absence car les valeurs manquantes sont remplacées durant le traitement des données (Figure 3.4).

Ici, les abondances de peptides ont été analysées par XIC afin d'avoir des données les plus quantitatives possible.

Traitement et analyse statistique des données Les données en sortie de MassChroQ ont été importées sous MassChroQR pour R 3.5.1 afin de procéder au contrôle qualité et au traitement statistique des données. L'abondance des protéines a été calculée comme étant la somme des intensités des peptides (Blein-Nicolas and Zivy, 2016). Des données manquantes sont cependant fréquentes dans ce genre d'analyse. Cela peut être dû au hasard (efficacité d'ionisation des protéines), aux performances de l'appareil ou aux bases de données utilisées. Comme les données manquantes ne peuvent pas être analysées statistiquement, les abondances des peptides manquant dans un échantillon ont été remplacées par la plus petite valeur mesurée.

Les peptides partagés peuvent également poser problème. En effet, les peptides partagés par plusieurs protéines sont plus abondants que les peptides protéotypiques. Les peptides présents dans les mêmes quantités peuvent ne pas donner une information d'intensité équivalente (efficacité de digestion, potentiel d'ionisation). Les peptides partagés ont donc été écartés de l'analyse quantitative

Les protéines caractérisées par moins de trois peptides n'ont pas été prises en compte

afin d'avoir des données les plus robustes possible. Une étape de normalisation a été appliquée du fait de la variabilité de profondeur d'analyse (nombre de spectres par échantillon) entre les échantillons. Les données ont été normalisées de la façon suivante : les valeurs d'aire sous les pics des peptides de chaque injection ont été divisées par la somme de toutes les valeurs d'intensité m/z pour chaque peptide de l'injection. Le résultat a ensuite été multiplié par l'intensité moyenne du peptide pour toutes les injections. Une analyse de variance (ANOVA) a été appliquée pour déterminer la significativité des variations. L'effet du facteur "nutriment" (B₁₂ ou azote) sur l'accumulation des protéines a été considéré significatif pour une valeur *p* inférieure à 0.05 ainsi qu'une accumulation différentielle supérieure à 2 ou inférieure à -2.

Les protéines différentiellement accumulées ont été annotées en se référant aux travaux précédents sur *T. lutea* (Garnier et al., 2016). Lorsque les protéines n'avaient pas été identifiées, un complément d'annotation fonctionnelle a été réalisé par identification des domaines fonctionnels via le logiciel Blast2GO, basé sur l'algorithme BLAST. Une annotation experte a été réalisée sur les protéines différentiellement accumulées à l'aide des bases de données d'InterProScan, d'Uniprot et du CDD de NCBI.

Choix du jeu de données final Lors de l'analyse du nombre de peptides quantifiés pour chaque échantillon, un point de déplétion en vitamine B₁₂ et un autre de réplétion en azote (24 heures et une heure après spike) montraient une profondeur d'analyse deux fois moindre. Ces conditions n'ont donc pas été retenues pour les analyses. Au total, 6 réplicats biologiques en limitation en B₁₂ ont été conservés, 4 sur les 6 en limitation azotée ainsi que les deux échantillons en réplétion en vitamine B₁₂. Les analyses de protéomique comparative peuvent donc être résumées en deux jeux de données :

1. Limitation en vitamine B₁₂ vs limitation en azote
2. Limitation en vitamine B₁₂ vs réplétion en B₁₂

3.3 Résultats et discussion

3.3.1 La limitation en vitamine B₁₂ conduit a un réarrangement relativement faible du protéome de *T. lutea*

Un total de 19 442 peptides uniques, correspondant à 2636 protéines, ont été identifiés dans le jeu de données. Pour l'analyse comparative de la limitation B₁₂ vs limitation en azote, 1726 protéines ont été prises en compte et 108 d'entre elles ont été différenciellement accumulées, correspondant à 6.26 % du protéome détecté (Figure 3.5 A). Un total de 1765 protéines ont été considérées pour l'analyse comparative de la limitation B₁₂ vs réplétion en B₁₂ et 84 d'entre elles ont été différenciellement accumulées après analyses statistiques, soit 4.25 % du protéome mesuré (Figure 3.5 B). Les différences d'accumulation protéique sont majoritairement comprises entre un facteur 2 à 5 (Figure 3.5 A et B). Pour l'analyse comparative limitation en B₁₂ vs réplétion, seules les modifications physiologiques à court terme ont été observées du fait du pas de temps d'analyse court (une heure après ajout de la vitamine). L'annotation fonctionnelle a permis d'identifier 70 % des protéines différenciellement accumulées.

Nous avons recherché les variations de protéome décrites dans la littérature pour d'autres microalgues cobalamine-dépendantes. Bertrand et al. (2012) ont étudié les réarrangements du protéome de deux Diatomées, l'espèce cobalamine-dépendante *Thalassiosira pseudonana* et l'espèce cobalamine-indépendante *Phaeodactylum tricornutum*, lors de variations de la disponibilité en B₁₂. Leur quantification a été réalisée par *Spectral Count*. Par comparaison, les auteurs ont observé que 19 % du protéome était différent pour *T. pseudonana* en condition avec peu de B₁₂ vs réplétion. Ces résultats sont supérieurs d'un facteur trois à ceux que nous avons observés pour les jeux de données B₁₂ limitante vs azote limitant, et sont supérieurs de près d'un facteur cinq à ceux obtenus pour B₁₂ limitante vs réplétion B₁₂, suggérant qu'un manque de vitamine conduit à un faible réarrangement du protéome de *T. lutea*. Pour *P. tricornutum*, 5 % du protéome était significativement différent, indiquant un effet moindre du manque de cobalamine sur sa physiologie. Les auteurs ont également comparé les réarrangements protéomiques entre une condition avec peu de fer comparée à une réplétion en fer en contrôle et ont observé une variation de 30 % du protéome de *T. pseudonana* et de 20 % du protéome de *P. tricornutum* (Bertrand et al., 2012), ce qui indique que les niveaux de disponibilité en fer induisent une plus

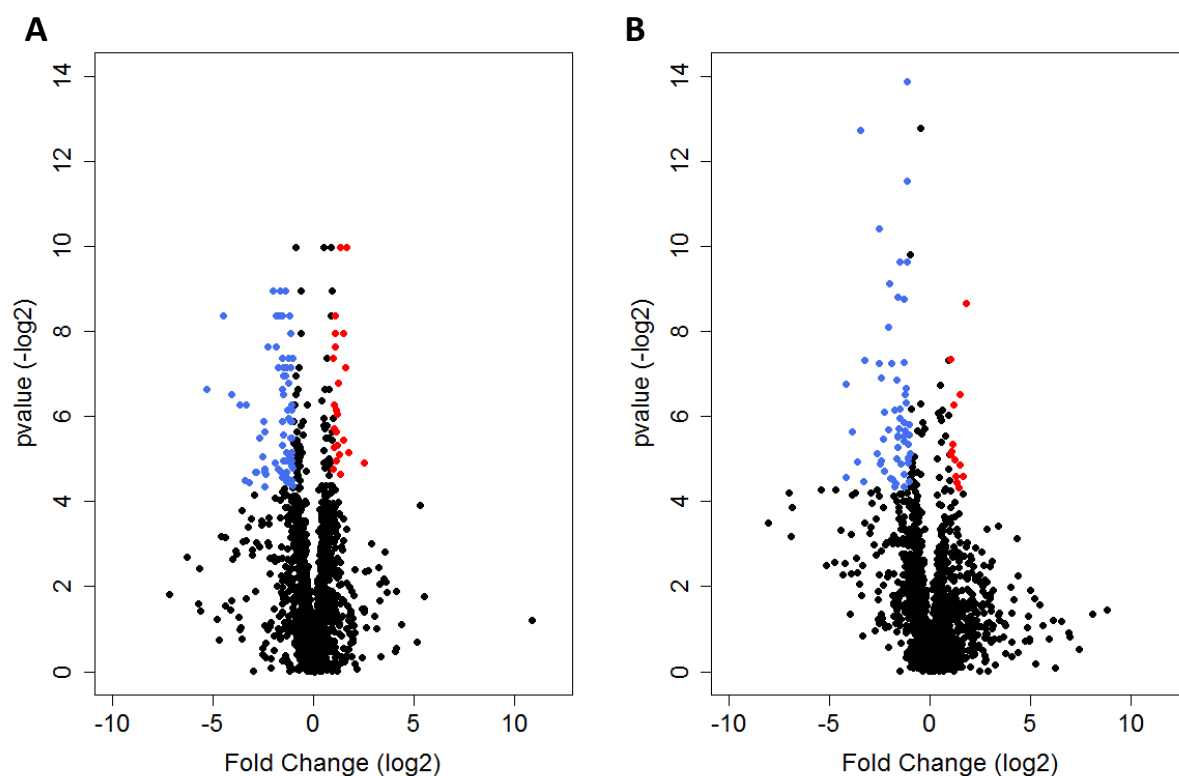


FIGURE 3.5 – Volcano plot représentant les protéines différentiellement accumulées pour (A) la condition limitation en vitamine B₁₂ vs limitation en azote ; (B) la condition limitation en B₁₂ vs réplétion en B₁₂. Les protéines sur-accumulées ($p < 0.05$ et fold > 2.0) sont représentées en rouge et les protéines sous-accumulées ($p < 0.05$ et fold < -2.0) sont représentées en bleu.

grande réorientation du métabolisme par rapport à une limitation en cobalamine chez ces Diatomées.

Il faut tenir compte du fait que les travaux de [Bertrand et al. \(2012\)](#) ont été réalisés sur des cultures de microalgues en mode batch. Les cultures en mode chimostat que nous avons réalisées permettent de mieux contrôler les paramètres abiotiques et de cibler spécifiquement l'analyse de l'effet de l'élément limitant sur la physiologie de l'algue. Les différences de réarrangements du protéome observées entre les deux algues B₁₂-dépendantes *T. lutea* et *T. pseudonana* peuvent donc être en partie liées au contrôle exercé sur les paramètres de culture (température, pH, lumière, taux de croissance). Aussi, des différences entre les études sur les analyses protéomiques et les traitements statistiques peuvent également amener des biais.

Considérés dans leur ensemble, ces résultats indiquent que :

1. Les cultures contrôlées mises en place dans nos travaux permettent d'étudier des variations physiologiques fines.
2. Les variations de protéome observées sont relativement faibles par rapport à d'autres études et suggèrent que les modifications métaboliques observées sont spécifiquement liées aux variations de traits phénotypiques.

La recherche d'une protéine d'acquisition de la cobalamine, les métabolismes impactés par la limitation en B₁₂ et leurs interconnexions possibles sont discutés dans les sections suivantes.

3.3.2 Recherche d'une protéine d'acquisition de la cobalamine

L'hypothèse de l'excrétion par certaines microalgues d'une protéine de haute affinité avec la vitamine B₁₂ afin d'améliorer son acquisition a été questionnée dans la littérature par [Droop \(1968\)](#). Lors de son étude, Droop a observé que le taux de croissance de *Diatrypa* (*Monochrysis*) *lutheri* ne dépendait pas directement de la concentration de vitamine dans le milieu à la manière des dynamiques décrites par les modèles de [Monod \(1942\)](#). Cela a conduit Droop à proposer qu'une protéine liant la cobalamine était excrétée par l'algue, rendant la vitamine inaccessible. Des protéines excrétées à forte affinité avec la cobalamine ont été identifiées dans des cultures de *T. pseudonana* ([Sahni et al., 2001](#)) et de l'Euglène *Euglena gracilis* ([Watanabe et al., 1988](#)), mais leur rôle exact dans l'acquisition de la vitamine reste inconnu. À ce jour, une seule protéine permettant l'importation de

la vitamine B₁₂ dans la cellule a été décrite chez les microalgues. Cette protéine, appelée CBA1 (*cobalamin acquisition protein 1*) n'a été identifiée que chez les Straménopiles (Bertrand et al., 2012). Lors de cultures en batch limité en vitamine B₁₂ de *T. pseudonana* et *P. tricornutum*, la CBA1 a été 160 fois et 10 fois plus accumulée en phase stationnaire qu'en phase exponentielle chez les deux Diatomées respectivement. Les auteurs ont par la suite observé que le taux d'acquisition de la cobalamine chez des mutants de *P. tricornutum* surexprimant la CBA1 étaient accrus, confirmant son rôle dans l'internalisation de la B₁₂. La CBA1 est caractérisée par un peptide signal N-terminal, un domaine de faible homologie avec un transporteur bactérien de type ABC (*ATP-binding cassette*) et n'a pas de domaine transmembranaire.

Ainsi, nous avons tout d'abord tenté d'identifier une protéine homologue à la CBA1 dans le protéome *in silico* de *T. lutea* et dans notre jeu de données protéomiques en alignant les séquences de CBA1 décrites avec les protéomes. Dix protéines présentant une identité moyenne (environ 25 % avec une *e*-value entre $7,0 \cdot 10^{-3}$ et $1,3 \cdot 10^{-2}$) ont été identifiées. Sur la base des différences d'accumulation protéique aux deux conditions d'analyse, 3 protéines ont finalement été conservées : la P311.01, la P1048.01 et la P1076.01 (Table 3.2). La présence de domaines particuliers dans ces protéines a été recherchée à l'aide d'Interproscan et du CDD de NCBI, chacune possède un peptide signal N-terminal, et la P1048.01 et la P1076.01 possèdent en plus des domaines transmembranaires. Au vu d'une identité moyenne et de *p*-value peu significatives pour les protéines candidates avec la CBA1 ne permettant pas de statuer sur des différences d'accumulation, nous n'avons pas pu aller plus loin dans nos interprétations sur le rôle de ces protéines.

Nous avons par la suite tenté d'identifier des protéines candidates présentant des domaines de type transporteur ABC, qui caractérisent la CBA1. Pour cela, nous avons utilisé comme séquences requêtes un transporteur ABC décrit chez *E. huxleyi* (référence UNIPROT EOD16726.1). Deux protéines à identité plus élevée que précédemment (29-38 %) et présentant des différences d'abondance importantes ont été identifiées : la P2052.01 et la P420.01, encore une fois avec des *p*-value peu significatives (Table 3.3).

Au vu de ces différents résultats, il nous semble important de noter que la faible significativité statistique (*p*-value supérieure à 0,05 la plupart du temps) des variations ob-

TABLE 3.2 – Protéines candidates de *T. lutea* présentant une faible identité avec la CBA1 de *P. tricornutum* (MI078987, seule séquence disponible dans les bases de données) et des différences d'accumulation cohérentes avec la limitation en cobalamine.

Code	E-value avec CBA1	Ratio abondance B ₁₂ lim vs N lim	Identité (%)	Ratio abondance B ₁₂ lim vs réplé-tion	p-value
P311.01	27.0	3,96	0,42	2,83	0,62
P1048.01	25.0	1,23	0,67	2,28	0,13
P1076.01	24.0	1,15	0,67	30,91	0,59

TABLE 3.3 – Protéines candidates de *T. lutea* potentiellement homologues d'un transporteur ABC de *E. huxleyi* (EOD16726.1) et présentant des différences d'accumulation cohérentes avec la limitation en cobalamine.

Code	E-value avec ABC	Ratio abondance B ₁₂ lim vs N lim	Identité (%)	Ratio abondance B ₁₂ lim vs réplé-tion	p-value
P420.01	38.0	-2,10	0,227	16,84	0,38
P2052.01	29.0	1,37	0,048	267,39	0,39

servées sont possiblement dues au peu de réplicats biologiques obtenus en réplétion en B₁₂. Aucune des protéines candidates n'était sur-accumulée en limitation en cobalamine. L'identification des protéines d'acquisition de la cobalamine est une étape limitante dans la suite des études sur l'acquisition de ce cofacteur par *T. lutea*. Des analyses d'expression des gènes encodant ces protéines dans des cultures à différents niveaux de disponibilité en cobalamine pourraient permettre de mieux caractériser le rôle de ces protéines. L'étape suivante pour confirmer le rôle putatif des protéines sélectionnées pourrait être de réaliser des mutants surexprimant ou sous-exprimant les gènes de ces protéines, ce qui permettrait de voir si *T. lutea* peut toujours acquérir la vitamine B₁₂. L'analyse du sécrétome de cultures de *T. lutea* limitées et carencées en cobalamine permettrait également d'identifier si une protéine d'acquisition de la vitamine B₁₂ pourrait être excrétée par l'algue, de la même manière que Droop le proposait pour *D. lutheri*.

3.3.3 La synthèse de S-adénosyl méthionine semble importante pour la régulation physiologique en limitation en vitamine B₁₂

Au niveau protéomique, la limitation en vitamine B₁₂ induit la sur-accumulation de la protéine MAT (gène *metK*), qui permet la conversion de la méthionine en S-adénosyl méthionine (SAM). Ce résultat est en accord avec les analyses d'expression génique réalisées par qPCR dans le chapitre 2 et indique que les tendances d'expression du gène sont conservées au niveau de la protéine. À l'inverse, les protéines METH, SAHH, CBLA et CBLB, dont la régulation transcriptionnelle était finement liée au quota de B₁₂, n'ont pas été différentiellement accumulées lors des analyses de protéomique comparative. Le découplage entre régulation transcriptionnelle et traductionnelle a déjà été observé par Bertrand et al. (2012) pour les Diatomées *T. pseudonana* et *P. tricornutum*, par Wurch et al. (2011) pour l'algue hétérokonte *Aureococcus anophagefferens* ainsi que par Fournier et al. (2010) pour la levure. Pour s'acclimater physiologiquement aux variations environnementales, les organismes doivent recycler les protéines devenues inutiles et en synthétiser de nouvelles. Un décalage temporel entre la régulation transcriptionnelle et traductionnelle pourrait être responsable de l'absence de cohérence des patrons de régulation des gènes et protéines METH, SAHH, CBLA et CBLB aux points concernant la réponse après spike. Il serait d'intérêt de réaliser un échantillonnage intermédiaire à ceux de la présente étude, par exemple 3 heures ou 5 heures après spike de B₁₂, afin de vérifier si la régulation de l'expression des gènes au niveau traductionnel est présente. Une autre explication pourrait être l'existence de mécanismes de régulation post-transcriptionnelle (RNAi, riboswitches, méthylation, etc.) ou traductionnelle à l'origine du décalage transcriptomique-protéomique observé pour ces protéines.

Chez *T. pseudonana*, la sur-accumulation de la protéine MAT a aussi été observée lors d'une culture limitée en cobalamine par rapport à un état non limité (Bertrand et al., 2012). Une autre caractéristique commune à *T. lutea* et à *T. pseudonana* est l'absence d'une activation de la voie métabolique de sauvetage de la méthionine (*methionine salvage pathway*), qui permet de recycler la méthionine à partir de la SAM (Sauter et al., 2013 ; Heal et al., 2019). Bien que ces résultats ne concernent que deux espèces de microalgues cobalamine-dépendantes, nous pouvons suggérer l'hypothèse que la régulation moléculaire au niveau de la MAT pourrait être commune aux microalgues B₁₂-dépendantes.

3.3.4 Le catabolisme des protéines et acides aminés est réduit en limitation en B₁₂

Une allocation du carbone supérieure dans les protéines et acides aminés libres en limitation en B₁₂ a été observée par rapport à la limitation azotée (Figure 1 de l'article page 145). En parallèle, une sous-accumulation de nombreuses protéases et peptidases a été notée pour le phénotype limité en B₁₂, notamment pour la méthylcrotonyl-CoA (MCC2), une protéine impliquée dans la dégradation de la leucine chez *P. tricornutum* (Ge et al., 2014). Le phénotype B₁₂-limité pourrait donc être lié à une moindre dégradation des protéines et acides aminés. Considérés dans un autre sens, ces résultats signifient que le catabolisme des protéines est plus élevé en limitation azotée. Ceci s'explique par un besoin accru de recyclage de l'azote en limitation azotée du fait de la diminution de l'entrée d'azote dans la cellule et a été observé chez de nombreuses espèces de microalgues (Dong et al., 2013 ; Alipanah et al., 2015). Les résultats observés en limitation B₁₂ vs limitation azotée sembleraient donc être plutôt dûs à l'effet de la limitation azotée plutôt qu'à un effet spécifique du manque de vitamine. La sous-accumulation de plusieurs protéases et peptidases en limitation B₁₂ vs réplétion a également été observée, ce qui supporte l'hypothèse d'un lien entre la limitation en cobalamine et l'accumulation de ces protéines.

Nous avons observé une sous-accumulation de la CSAP1 en limitation B₁₂ vs limitation azotée. La protéine CSAP1 a été décrite comme sur-accumulée en carence en azote chez *T. lutea* (Garnier et al., 2014) et les travaux de thèse de Garnier (2016) ont mis en évidence une régulation transcriptionnelle du gène de la CSAP1 finement liée au quota d'azote. La CSAP1 possède un domaine décarboxylase, potentiellement impliqué dans la décarboxylation des acides aminés (Garnier, 2016). La cobalamine et l'azote sont tous les deux liés au métabolisme des acides aminés. Ces résultats suggèrent un lien spécifique entre CSAP1 et métabolisme des acides aminés en limitation azotée. Nous émettons donc l'hypothèse que les différences d'accumulation de la CSAP1 sont spécifiquement liées à la limitation azotée chez *T. lutea*, ce qui expliquerait les tendances observées en limitation B₁₂ vs azote.

3.3.5 Une limitation en vitamine B₁₂ conduit à la sous-accumulation des protéines liées à la remobilisation des squelettes carbonés

Les différences majeures de traits phénotypiques aux conditions testées sont en lien avec l'allocation intracellulaire du carbone. Une diminution de la ressource en carbone allouée à la synthèse des glucides ainsi qu'une légère augmentation de l'allocation carbonée aux lipides ont été observées en limitation en vitamine B₁₂ par rapport à la limitation azotée (Figure 1 de l'article page 145).

Au niveau métabolique, nous avons observé en limitation en vitamine B₁₂ une sous-accumulation notable de protéines du métabolisme central du carbone : soit la glycolyse/néoglucogenèse, le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative et la bêta-oxydation des lipides (Figure 4 de l'article page 152). Ces voies métaboliques sont parmi les principales du métabolisme central, responsables de l'acheminement des squelettes carbonés. En revanche, le cycle du glyoxylate, également impliqué dans la mobilisation du carbone cellulaire, n'a pas été impacté.

Le catabolisme des protéines, des acides aminés et des lipides produit des squelettes carbonés (acétyl-CoA, succinyl-CoA) qui peuvent être remobilisés dans les cycles de Krebs ou du glyoxylate et permettre la production de sucres par la néoglucogenèse. La sous-accumulation des protéases et peptidases ainsi que des protéines de la bêta-oxydation pourrait être liée à la sous-accumulation des protéines impliquées dans l'acheminement des squelettes carbonés. Ces résultats expliquent, au moins partiellement, les différences de traits phénotypiques.

Nous avons abordé en introduction l'importance de la cobalamine pour le fonctionnement du métabolisme carboné, par le biais de la synthèse du tétrahydrofolate (THF) et de la S-adénosyl méthionine (SAM). Une de nos hypothèses de départ était que le métabolisme carboné pourrait être affecté par la limitation en cobalamine du fait du lien entre ce cofacteur et la synthèse de ces coenzymes. Les résultats observés sont en accord avec cette hypothèse et requièrent une étude plus détaillée afin de caractériser les mécanismes moléculaires à l'origine de ces variations. Nous proposons que les méthyltransférases utilisant la SAM comme donneur de méthyle pourraient potentiellement jouer un rôle dans la réponse physiologique observée du fait du lien étroit entre vitamine B₁₂, méthionine et SAM.

3.3.6 La vitamine B₁₂ est potentiellement impliquée dans la régulation de la photosynthèse chez *T. lutea*

Afin d'étudier si des modifications de l'activité photosynthétique ou de la dissipation d'énergie en excès avaient lieu lors d'une limitation en vitamine B₁₂, des mesures du taux de transport des électrons ainsi que du niveau de quenching non photochimique ont été réalisées avec un Phyto-PAM (Figure 3.6 A et B). En théorie, le taux de transport des électrons augmente avec l'intensité lumineuse et atteint une phase de plateau signifiant la saturation des centres réactionnels des photosystèmes. L'intensité lumineuse maximale de l'appareil était insuffisante pour parvenir à la saturation des centres réactionnels de *T. lutea*, limitant l'interprétation des résultats (Figure 3.6 A). Une différence notable de niveau de quenching non photochimique a été observée malgré tout, pour laquelle les cultures limitées en B₁₂ ont montré des valeurs largement inférieures à celles des cultures en limitation azotée (Figure 3.6 B). *T. lutea* possède un cycle des xanthophylles constitué du couple diadinoxanthine-diatoxanthine (Serive et al., 2017). Le ratio diatoxanthine/(diadinoxanthine + diatoxanthine), un proxy de la photoprotection des cellules (Arsalane et al., 2011), était significativement plus bas en limitation en vitamine B₁₂ par rapport à la limitation azotée (Figure 2 de l'article page 146). De plus, de nombreuses protéines des antennes collectrices étaient sous-accumulées en limitation B₁₂ vs limitation azote ainsi que par rapport à la réplétion en B₁₂, suggérant une moindre acquisition de l'énergie lumineuse lors du manque de cobalamine (Figures 4 page 152). Considérés ensemble, ces résultats indiquent que *T. lutea* recevrait moins d'énergie lumineuse en limitation en cobalamine, dissiperait donc moins d'énergie en excès du fait d'une photochimie moins saturée, ce qui se traduirait par un ratio de dé-époxydation moins élevé par rapport à la limitation azotée.

La question du lien entre cobalamine et photosynthèse a été étudiée par Cheng et al. (2014) chez la bactérie pourpre *Rhodobacter capsulatus*. La B₁₂ est directement impliquée en tant que ligand dans la synthèse de l'appareil photosynthétique, basé sur la bactériochlorophylle (Cheng et al., 2014). Il est possible qu'un tel lien existe chez les microalgues B₁₂-dépendantes mais cette hypothèse reste à démontrer. Les données de protéomique ne permettent pas à ce jour d'identifier la totalité du protéome d'une microalgue notamment du fait du manque d'information sur la fonction des gènes et des protéines et du faible nombre d'algues séquencées qui limite la taille des bases de données. Rechercher

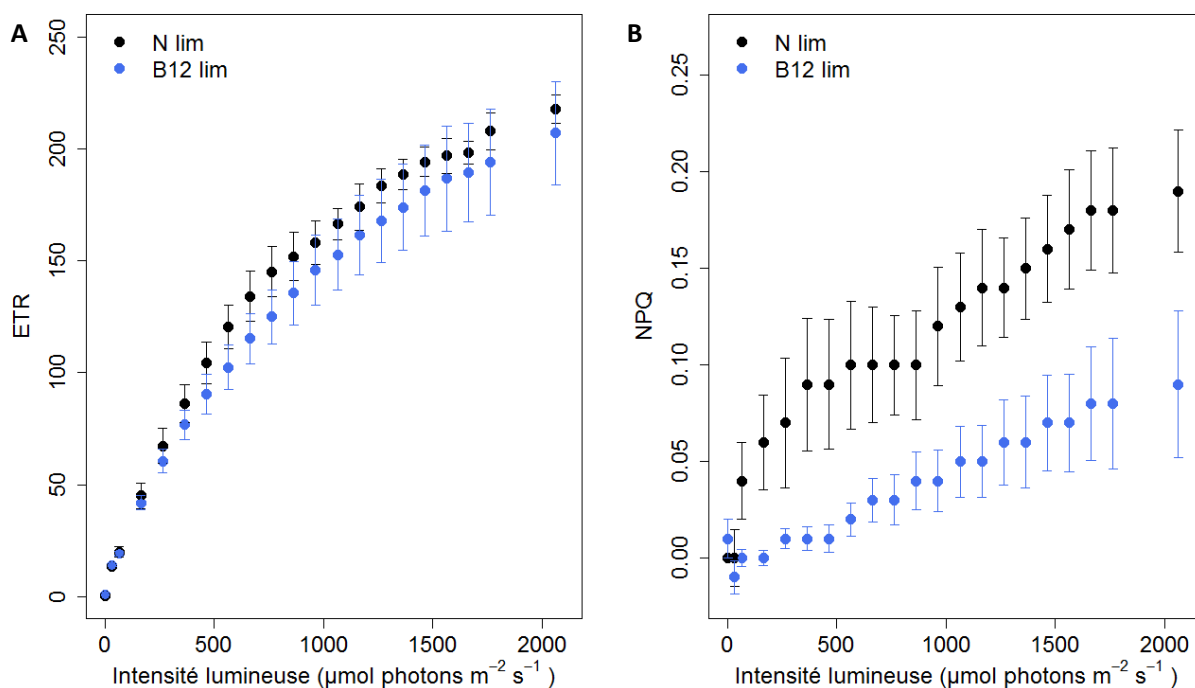


FIGURE 3.6 – Taux de transport des électrons (ETR) (A) et quenching non photochimique (NPQ) (B) en fonction de l'intensité lumineuse chez *T. lutea* cultivée en condition de limitation en vitamine B₁₂ (bleu) ou de limitation en azote (noir). Les valeurs sont les moyennes de trois mesures pour les deux réplicats biologiques $\pm$ l'écart-type.

les protéines ayant des sites de fixation des différentes formes de cobalamine permettrait d'identifier les voies métaboliques directement affectées par une limitation en B₁₂. L'identification de ces protéines pourrait être effectuée par l'utilisation d'une approche de co-immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-cobalamine. Une fois les protéines isolées et identifiées par spectrométrie de masse, il serait possible de rechercher les domaines spécifiques et d'étudier leurs activités. Ces résultats apporteraient des informations d'intérêt sur les modifications métaboliques des microalgues lors d'un manque de vitamine B₁₂.

3.3.7 La limitation en vitamine B₁₂ contraint fortement la synthèse de DMSP qui est remplacé par d'autres osmolytes azotés

Le DMSP est un précurseur du diméthylsulfure (DMS), un gaz produit par certaines microalgues et plantes et jouant un rôle dans la régulation climatique (Lovelock et al., 1972 ; Malin and Kirst, 1997 ; Malin and Steinke, 2004). Les microalgues haptophytes sont connues pour produire des quantités importantes de DMSP (Keller, 1989 ; Steinke et al., 1998 ; Franklin et al., 2010). La méthionine et la SAM sont impliquées dans sa synthèse

(Figure 3.7) (Gage et al., 1997 ; Stefels, 2000). Les enzymes impliquées dans la biosynthèse du DMSP sont mal connues, en particulier chez les microalgues.

Des dosages du DMSP particulière, ainsi que d'autres osmolytes communément décrits chez les microalgues tels que la glycine bêtaïne (GBT), un analogue azoté du DMSP (Challenger, 1951), la proline et la méthionine (Schobert, 1974 ; Blackwell and Gilmour, 1991 ; Keller et al., 1999 ; Liu et al., 2000 ; Gebser and Ponhert, 2013) ont été effectués aux différents états physiologiques. Un quota de DMSP plus faible en limitation en B₁₂ par rapport à la limitation azotée a été mesuré. Nous n'avons pas identifié de protéines présentant une forte identité avec les protéines de la voie de biosynthèse du DMSP telles que décrites dans la littérature pour les végétaux terrestres. En parallèle, de forts quotas en GBT et en proline ont été notés en limitation en B₁₂ (Figure 3 de l'article page 147). Le phénomène inverse a été obtenu en limitation azotée, pour laquelle une absence quasi totale des osmolytes azotés GBT et proline a été notée (Figure 3 de l'article page 147). Ces résultats indiquent un potentiel remplacement du DMSP par les osmolytes azotés lors d'une limitation en cobalamine. Nous avons pu identifier des protéines impliquées dans la synthèse de proline et sur-accumulées en limitation en B₁₂ par rapport à la limitation en azote. Ces protéines peuvent être à l'origine de l'accumulation de proline en limitation en cobalamine. Les tendances une heure après ajout de cobalamine dans les cultures sont identiques à celles à l'équilibre en limitation B₁₂, sauf pour la proline, dont le quota est significativement plus faible en réplétion en cobalamine. Un échantillonnage supplémentaire quelques heures plus tard aurait peut-être permis d'observer d'autres changements des quotas en osmolytes suite à l'ajout de cobalamine, en particulier pour le DMSP, pour lequel une légère augmentation, non significative, peut être notée en réplétion en B₁₂ (Figure 3 de l'article page 147).

Jusqu'à présent, la réduction de la synthèse du DMSP en condition de limitation en vitamine B₁₂ n'avait été montrée que chez une microalgue cobalamine-dépendante, la Diatomée *T. pseudonana* (Spiese and Tatarkov, 2014 ; Heal et al., 2019). Le remplacement du DMSP par d'autres osmolytes a été à plusieurs reprises suggéré lors des travaux de Keller et al. (1999, 2004) et le remplacement du DMSP par la proline et l'homarine n'a été observé que très récemment pour cette espèce via des méthodes de métabolomique (Heal et al., 2019). Nos résultats sont partiellement en accord avec les leurs. Une nouvelle fois, ces résultats tendent à indiquer que les microalgues B₁₂-dépendantes ont des mécanismes de régulation physiologique similaires lors d'un manque de cobalamine

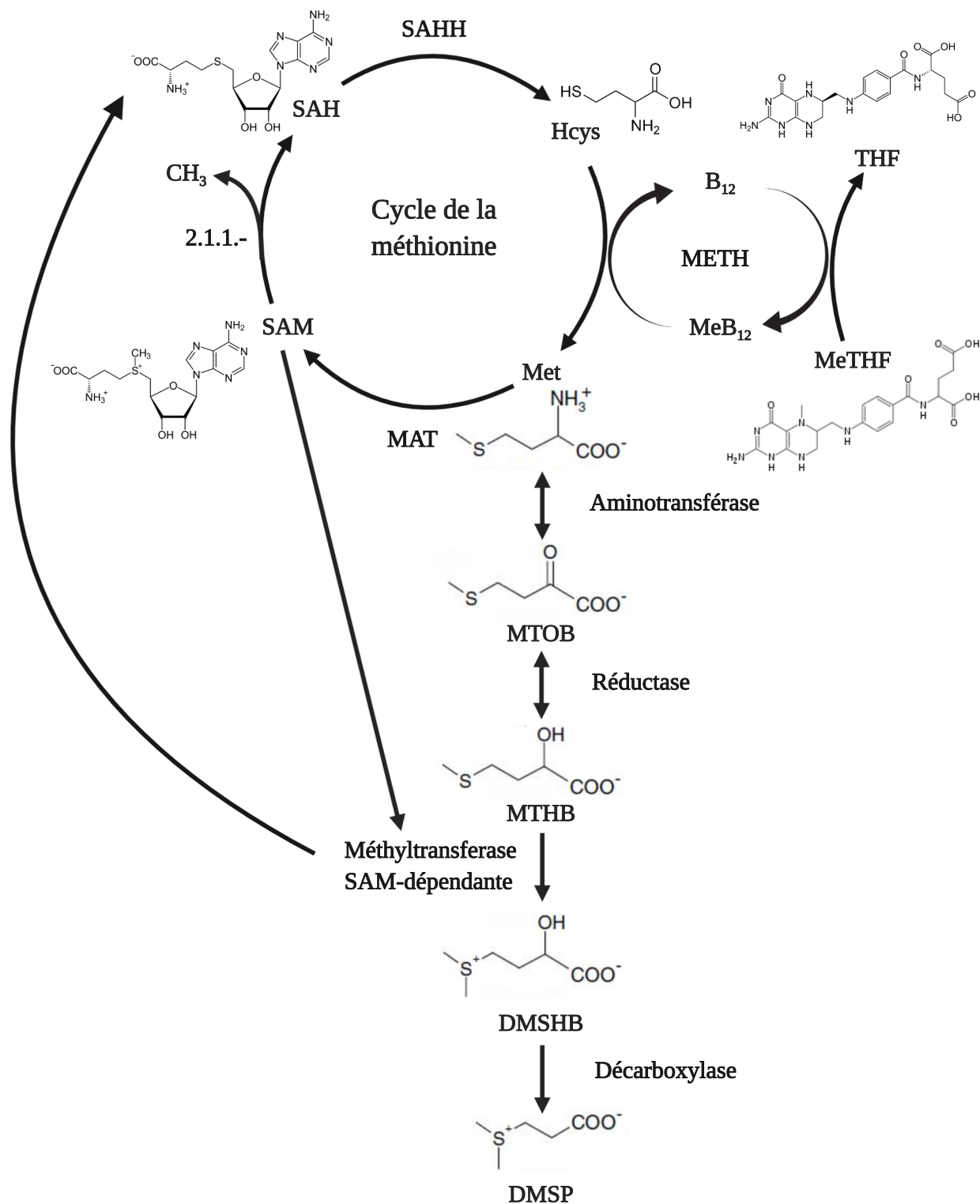


FIGURE 3.7 – Représentation schématique de l'implication de la méthionine et de la SAM dans la synthèse du DMSP (basée sur les travaux de Gage et al. (1997) ; Stefels (2000)).

Nous avons par la suite étudié l'allocation de méthionine entre le DMSP et les protéines, en considérant qu'une mole de DMSP est produite à partir d'une mole de méthionine. En limitation en B₁₂ le DMSP correspond à environ 40 % de l'allocation en méthionine, les 60 % restants étant alloués à la synthèse protéique (Figure 3.8). À l'inverse, en limitation azotée 80 % du contenu en méthionine sont alloués au DMSP et 20 % du total sont incorporés dans les protéines (Figure 3.8). La proportion de méthionine libre dans l'allocation de la méthionine correspond à moins de 1 % du total. Les quantités de méthionine protéique et en équivalent DMSP sont réduites de 44,3 % au total en limitation en cobalamine (300,97 fg/cell) comparativement à la limitation azotée (539,86 fg/cell). La production de méthionine semble donc réduite en limitation en B₁₂ et nécessite d'être confirmée par une mesure du contenu en SAM. Une analyse complémentaire du DMSP dissous dans le milieu extracellulaire, qui n'a pas pu être effectuée lors de nos travaux, permettrait de savoir si la diminution du DMSP intracellulaire est liée uniquement à une moindre synthèse ou s'il est en parti excrété.

La production de DMSP reste néanmoins active en limitation en B₁₂, bien que ce métabolite nécessite deux molécules de méthionine (une pour le squelette carboné et une via la SAM, voir Figure 3.7) et soit donc coûteux à produire lorsque la cobalamine est limitante. Le maintien de la synthèse de DMSP est donc une forte contrainte métabolique. La carence en B₁₂ induit une diminution importante du pool de SAM chez *T. pseudonana* (Heal et al., 2019). Si le pool de SAM est également réduit chez les Haptophytes lors d'un manque de ce cofacteur, la synthèse de DMSP sera d'autant plus coûteuse. Il est possible que ce métabolite joue un rôle important dans le métabolisme de *T. lutea*, ce qui justifierait le maintien de sa production. Le DMSP est considéré comme un osmolyte et un antioxydant important chez les microalgues (Keller, 1989 ; Sunda et al., 2002 ; Gebser and Ponhert, 2013 ; Petrou and Nielsen, 2018). Un pouvoir osmorégulateur et/ou antioxydant supérieur(s) à ceux de la proline et de la GBT justifierait sa synthèse en dépit de son coût métabolique.

Plusieurs autres rôles potentiels du DMSP ont été suggérés dans la littérature. Par exemple, les travaux de Stefels (2000) ont proposé que la synthèse de DMSP ferait office d'un système de stockage du soufre dans le cas où l'afflux de ce nutriment serait trop rapide par rapport à sa conversion en protéine, ou bien lorsque la dégradation des protéines augmenterait trop la concentration intracellulaire en soufre. Une explication possible serait que la production de DMSP est le seul moyen de stocker le soufre en excès dans la

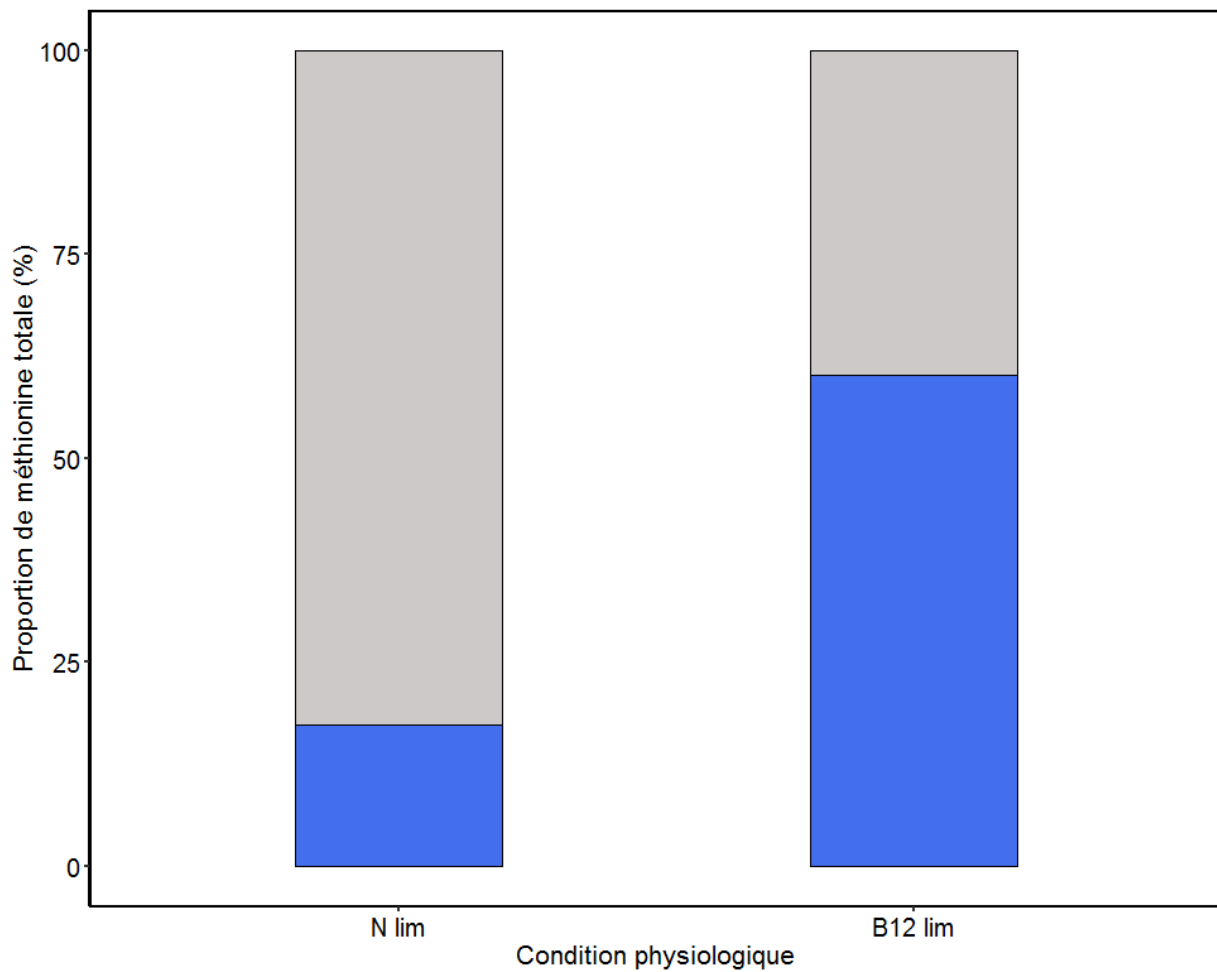


FIGURE 3.8 – Barplot représentant l'allocation de la méthionine entre le DMSP (gris) et les protéines (bleu) chez la microalgue *Tisochrysis lutea* cultivée en condition de limitation en vitamine B₁₂ ou de limitation en azote. Les résultats en réplétion en B₁₂ sont similaires à ceux en limitation en vitamine.

cellule.

Une autre hypothèse proposée dans la littérature serait que le stockage du soufre sous la forme du DMSP permettrait de libérer de l'azote lors de la transamination de la méthionine en première étape de la synthèse du DMSP (Gage et al., 1997 ; Stefels, 2000). Cette hypothèse expliquerait la raison pour laquelle une carence en azote favorise la synthèse du DMSP (Turner et al., 1989 ; Gröne and KIRST, 1992 ; Sunda et al., 2007). L'apport d'azote étant en excès dans nos cultures limitées en cobalamine, l'hypothèse de la synthèse de DMSP pour obtenir de l'azote ne paraît adaptée en limitation en vitamine B₁₂. Le rôle métabolique exact du DMSP lors d'une limitation en vitamine B₁₂ semble être important et nécessite d'être approfondi. Les futures études sur le rôle du DMSP devraient se focaliser sur l'identification des gènes impliqués dans sa biosynthèse, qui représentent encore une inconnue non négligeable freinant les avancées dans ce domaine de recherche. L'étude de mutants dont la voie de biosynthèse du DMSP serait bloquée par mutation aléatoire et/ou ciblée permettrait d'apporter des informations importantes sur les gènes impliqués dans la synthèse de ce métabolite ainsi que sur son rôle chez les microalgues haptophytes.

3.4 Conclusion

Ce travail est le premier apportant une vue d'ensemble de l'effet d'une limitation en vitamine B₁₂ sur le métabolisme d'une microalgue haptophyte. La Figure 3.9 présente la synthèse des résultats obtenus. Nous avons vu que la synthèse de méthionine était limitée, impactant l'allocation de la méthionine dans les protéines et les osmolytes, ainsi que la méthylation via le cycle de la méthionine, influant ainsi sur de nombreux processus cellulaires. Les mécanismes moléculaires responsables du phénotype B₁₂-limité restent à éclaircir. Du fait du lien entre vitamine B₁₂ et méthyltransférases SAM-dépendantes, l'analyse du méthylome de *T. lutea* à différents niveaux de disponibilité en cobalamine pourrait permettre d'identifier les mécanismes de régulation transcriptionnelle, voire les modifications épigénétiques potentiellement à l'origine des différences phénotypiques.

Dans l'environnement, les différences phénotypiques d'allocation du carbone entre les compartiments biochimiques pourraient potentiellement avoir des conséquences sur la qualité de matière organique disponible pour les réseaux trophiques supérieurs consommant les microalgues haptophytes.

Nous avons observé que les modifications physiologiques de *T. lutea* présentaient des similitudes avec celles de *T. pseudonana* décrites dans la littérature, ce qui suggère une conservation des mécanismes métaboliques liés à un manque de B₁₂ chez les microalgues cobalamine-dépendantes. Des études comparatives analysant les réponses physiologiques d'autres algues auxotrophes pour la B₁₂ appartenant à différents phyla permettraient de vérifier si les caractéristiques que nous avons considérées comme communes sont réellement conservées dans divers taxons.

Ce travail est le premier décrivant une relation de substitution entre DMSP et osmolytes azotés chez une Haptophyte cultivée en limitation en B₁₂, où le DMSP est remplacé par ses analogues azotés tels que la glycine bêtaïne et la proline (Figure 3.9). La quantité de méthionine utilisée pour la synthèse de DMSP correspond néanmoins à environ 40 % de la méthionine intracellulaire (le reste correspond aux protéines), en dépit d'une réduction de près de la moitié du pool de méthionine. Le DMSP est considéré comme une molécule d'information chimique majeure dans la phycosphère, qui peut par exemple médier les interactions algues-bactéries entre *Ulva* et son microbiote associé, permettant la morphogenèse de la macroalgue (Kessler et al., 2018). Une autre étude réalisée par Barak-Gavish et al. (2018) a également observé que les souches de l'Haptophyte *Emiliania*

huxleyi produisant le plus de DMSP étaient plus favorablement lysées par des molécules algicides bactériennes. Les auteurs proposent que le DMSP joue le rôle de signal chimiotactique, permettant aux bactéries de localiser la microalgue. Nous proposons que le maintien de la production de DMSP malgré son coût métabolique élevé pourrait être lié à un rôle physiologique clé chez *T. lutea* et/ou que le DMSP pourrait servir de molécule de communication chimique, induisant peut-être des interactions bactériennes en condition xénique. Les Haptophytes sont parmi les principaux contributeurs à la synthèse du DMSP dans les systèmes océaniques avec les Dinoflagellés (Keller, 1989). Un manque de cobalamine aura donc des conséquences importantes sur la contribution des Haptophytes au cycle du soufre. Ces résultats nous amènent à proposer que le niveau de production du DMSP par les microalgues haptophytes est dépendante de la disponibilité en vitamine B₁₂ et donc de la production bactérienne en ce cofacteur.

3.5 Article 2 : B₁₂ limitation affects global metabolism and DMSP production in the model haptophyte microalgae *Tisochrysis lutea*

Charlotte Nef¹, Céline Henry², Élodie Nicolau¹, Jean-Baptiste Bérard¹, Fabienne Hervé³, Amandine Caruana³, Raymond Kaas¹, Francis Mairet¹ et Matthieu Garnier¹

¹IFREMER, Laboratoire de Physiologie et biotechnologie des Algues, rue de l'île d'Yeu, 44311 Nantes, France.

²Institut Micalis, PAPPSO, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

³IFREMER, Laboratoire Phycotoxines, rue de l'île d'Yeu, 44311 Nantes, France.

Manuscrit corrigé par l'ensemble des auteurs et en cours de soumission dans ISME – Septembre 2019

B₁₂ limitation affects global metabolism and DMSP production in the model haptophyte microalgae
Tisochrysis lutea

Charlotte Nef¹, Céline Henry², Élodie Nicolau¹, Jean-Baptiste Bérard¹, Fabienne Hervé³, Amandine M. N. Caruana³, Raymond Kaas¹, Francis Mairé¹, and Matthieu Garnier¹

¹IFREMER, Physiology and Biotechnology of Algae Laboratory, rue de l'Ile d'Yeu, 44311, Nantes, France.

²Micalis Institute, PAPPSO, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France.

³IFREMER, Phycotoxins Laboratory, rue de l'Ile d'Yeu, 44311, Nantes, France.

1 Abstract

Recent results suggest that all haptophytes lineages, microalgae of great ecological importance, are auxotrophic for the vitamin B₁₂, a limiting element in different areas of oceans. Here, B₁₂ limitation on the model haptophyte *Tisochrysis lutea* was studied in controlled continuous culture using nitrogen limitation as reference. Ecophysiological parameters were constant and similar in both conditions. Analysis of global biochemical composition revealed different effect of B₁₂ and nitrogen limitation on the carbohydrates, lipids proteins and free amino-acid contents. Comparative proteomic analysis confirmed the effect of B₁₂ limitation on the methionine cycle, and allowed to identify metabolic pathways likely involved in the differences in biochemical compositions. Analysis of metabolites clearly indicates that DMSP is an important sink of methionine in *Tisochrysis lutea* and that B₁₂ limitation strongly decreases the production of DMSP (which is counterbalanced by other metabolites). This suggests that oceanic DMSP production by haptophyte can be driven by cobalamin-producing prokaryotes.

Keywords: Metabolism, Cobalamin, Comparative proteomics, Chemostat, *Tisochrysis lutea*, DMSP, DMS.

2 Introduction

Haptophytes are marine microalgae with ubiquitous representatives [1,2] that tend to dominate oligotrophic open oceans [3]. This group is ecologically important as it is one main component of pico-planktonic and nano-planktonic communities [4,5]. Haptophytes contribute in various ways to global carbon cycle by photosynthetically fixating carbon [6,7] and by producing calcifying coccoliths, the formation of which is thought to be accountable for half of total calcium carbonate precipitations in marine systems [8]. Haptophytes play an important role in sulphur biogeochemistry as well, due to their high production relative to cell size of dimethyl sulfonio propionate (DMSP), the precursor of climatically-important gas dimethyl sulphide (DMS) supposed to be playing a role in regulating climate balance [9–13].

It has been recently proposed that Haptophyta phylum gathers only vitamin B₁₂-dependent (auxotrophic) species [14], contrary to the generally presumed mosaic pattern of vitamin B₁₂ auxotrophy among eukaryotic phytoplankton [15]. Vitamin B₁₂ (cobalamin) is an enzymatic cofactor synthesized only by a subset of bacteria and archaea [16,17] and has been reported to be available in oceanic systems in low femtomolar to picomolar quantities [18–20]. As a consequence, cobalamin is considered limiting for phytoplankton development in many areas of the ocean [20–24]. Haptophytes would therefore constitute an ecologically-original taxon whose growth would be relying almost exclusively on bacterial vitamin B₁₂.

In spite of phytoplankton dependency on vitamin B₁₂, information about the effect of cobalamin limitation on microalgal metabolism is scarce, especially for haptophytes. Methylcobalamin, one of the principal forms of cobalamin, is critical for *de novo* synthesis of methionine and tetrahydrofolate (THF) through methionine synthase activity. The B₁₂-dependent methionine synthase (METH) is encoded in most microalgae whereas cobalamin-independent microalgae possess both the B₁₂-dependent enzyme and a B₁₂-independent isoform (METE) [15,25]. Methionine is required in almost all proteins and is also the precursor of DMSP and S-adenosyl methionine. The latter is an abundant C₁-donor, as part of the methionine cycle, involved in numerous functions such as DNA methylation, amino acid metabolism, and potentially DMSP synthesis [26–30].

How microalgae cope with the B₁₂ limitation has been explored in diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* and in the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* [31–34]. In the model haptophyte species *Tisochrysis lutea*, a first targeted gene expression analysis suggested that these organisms can cope with B₁₂ limitation by assimilating dissolved methionine, finely regulating genes involved in methionine cycle and B₁₂ transport and/or limiting B₁₂ transport on the mitochondrion [14]. The aim of the present study was to evaluate the consequences of vitamin B₁₂ limitation on the global metabolism of *T. lutea* by comparing B₁₂ limitation to nitrogen limitation and B₁₂ repletion. Continuous cultures, global phenotyping and comparative proteomics were applied. Our results suggest that B₁₂ limitation modifies carbon and nitrogen allocation, methionine metabolism, and as a consequence affects intracellular osmolytes composition. Combined with prior studies, we finally propose several implications regarding the effect of B₁₂ limitation on haptophytes at larger scale.

3 Material and methods

3.1 Cultures and samples

Cultures conditions were previously detailed in Nef et al. (2019). Briefly, axenic strain of *Tisochrysis lutea* CCAP 927/14 was cultured in chemostat continuous cultures, in cobalamin limitation (modified Walne's medium [35] with 40 ng L⁻¹ B₁₂) and in nitrogen limitation (modified Walne's medium with 25 mg L⁻¹ NaNO₃). Biological duplicates were done for both conditions. Temperature was set at 27 ± 1°C with continuous light (400 μmol photons m⁻² s⁻¹) and pH maintained at 8.2 by CO₂ regulation. Dilution rate was set at 0.5 d⁻¹ and monitored daily. A discreet input of the limiting nutrients was realized at day 25 either with 40 ng L⁻¹ B₁₂ or 25 mg L⁻¹ NaNO₃ for B₁₂-limited and nitrogen-limited chemostats respectively. Samples were collected at three time points during steady-state (days 14, 21 and 25) and 1 hour after nutrient spike (day 26) for the following analyses (see Nef et al. (2019) for details on cultures physiological state).

3.2 Biochemical analyses

Particulate carbon and nitrogen were measured with a CN elemental analyser (Flash 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) on a total of 20 10⁶ cells filtered on 25 mm precombusted GF/F microfibers filters (0.7 μm, Whatman, UK). Total proteins and carbohydrates were quantified using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit and Dubois assay [36] respectively, as previously described in Garnier et al. (2016). For free amino acids quantification, extraction was performed on cellular pellets of 80 10⁶ cells suspended in 800 μL freshly distilled water then broken by sonication and centrifuged. Supernatants were analysed on P2M2 platform by HPLC (Rennes, France). For total lipid measurements, cellular pellets of 250 10⁶ cells were homogenized into 3 mL chloroform/methanol 2/1 v/v and sonicated 10 min in ice bath (pulse mode). Three milliliters of chloroform/methanol 1/2 v/v and 2.7 mL distilled water were added to the tubes and centrifuged. The organic phase was then transferred into pre-combusted glass tube. The addition of 3 mL chloroform/methanol was repeated twice. Lipids were dried under nitrogen flux then dried at 60°C and weighted. Analysis of pigment was described in [38]. Concentrations of chlorophyll *c*2 (Chl *c*2), chlorophyll *a* (Chl *a*), and carotenoids fucoxanthin (Fuco) diatoxanthin (Diato), diadinoxanthin (Diadino), echinenone (Echin) and beta-carotene (β-Car) in samples were determined from DHI (Denmark) standards. Proteins, lipids, carbohydrates and pigments measurements were converted to % of total carbon using the following conversion factors: 0.53 g carbon / g proteins; 0.4 g carbon / g carbohydrates; 0.76 g carbon / g lipids; 0.74 g carbon / g chlorophyll *a*; 0.69 g carbon / g chlorophyll *c*; .0.80 g carbon / g carotenoid or xanthophyll [39]. For free amino acids quantification, each mole of the corresponding amino acid was converted into its carbon equivalent.

Extraction of DMSP and some other osmolytes was performed on 80×10^6 cells suspended into 1 mL methanol. Extracts were centrifuged and filtered on 0.2 μm filters. Analyses of methionine, dimethylsulfoniopropionate (DMSP), glycine betaine (GBT) and proline were performed on a LC System (model UFLC XR, Shimadzu) coupled to a triple-quadrupole mass spectrometer (4000Qtrap, ABSciex). Based on [30], chromatography was performed with a Hypersil GOLD HILIC column (150×2.1 mm, 3 μm , ThermoScientific) with a guard column (10×2.1 mm, 3 μm). Details of the LC-MS/MS method are described in [40]. The flow rate of the mobile phase was modified to 0.25 ml min^{-1} for this chromatographic column. Compounds were quantified against their standards (Sigma Aldrich) prepared in methanol to cover calibration levels from 50 nM to 5000 nM.

3.3 Proteomics

Methods used for proteomic analysis and raw data are fully described in [41]. Briefly, proteins were extracted and purified from 350×10^6 cells. 20 μg proteins were fractionated on SDS-PAGE 10 % acrylamide gel. After trypsin digestion, peptides were analysed by LC-MS/MS on the PAPPSO platform (<http://pappso.inra.fr/>). An Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ (Thermo Fisher Scientific) coupled to an UltiMate™ 3000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific) was used. Protein identification with X!TandemPipeline (PAPPSO, version 0.2.21, <http://pappso.inra.fr/bioinfo>) was done by using the *T. lutea* proteome in silico database (Garnier et al., 2016, version 2018, 17373 entries) as reference. Peptide quantities of the proteome were analyzed by eXtracted Ion Current (XIC) using MassChroQ “Black Caiman” version 0.3.7 [42]. Considering analytical depth, 6 and 4 biological replicates for B₁₂ and nitrogen limitations were respectively considered for further proteomic analyses. The abundance of proteins with at least 3 measured peptides were calculated as the sum of peptide intensities. Missing peptide intensities and missing proteins were assigned the lowest recorded values. The dataset was normalized to take technical variability between injections into account. One factor ANOVA was performed to determine the significance of variation between ecophysiological conditions. The effect of the factor on protein accumulation was considered significant when $p < 0.05$ and when the fold of expression was superior to 2.0 or inferior to -2.0.

4 Results

4.1 Carbon allocation

In order to characterize the effect of vitamin B₁₂ limitation on the synthesis of main metabolites in *T. lutea*, proteins, carbohydrates, free amino acids, lipids and pigments (chlorophylls and carotenoids) contents were measured in chemostats limited either by vitamin B₁₂ or nitrogen (N) at 3 time points of steady-states (at 0.5 d⁻¹) and 1 h after B₁₂ repletion. The growth kinetics are detailed in [41]. In B₁₂-limited cells, 32.9 % of carbon was allocated to proteins and 34.6 % to lipids (Fig. 1A and D). Carbon allocated to carbohydrates was 2.3 fold less in B₁₂ limitation (11.0 %) compared to N limitation (25.5 %) (Fig. 1B and raw data are in sup data X). In N-limited cells, carbon allocated to carbohydrates was quite similar to proteins (25.8 %) and lipids (24.5 %)

(Fig. 1A, B, D). Whereas 0.4 % of carbon was allocated to free amino acids during N limitation, 6.5 fold higher values were recorded during B₁₂ limitation (2.6 %) (Fig. 1C). Similar values of around 1.90 % carbon in total pigments were recorded in both conditions (Fig. 1E). General carbon allocation one hour after cobalamin spike was quite similar to B₁₂-limitation (Fig. 1A-E).

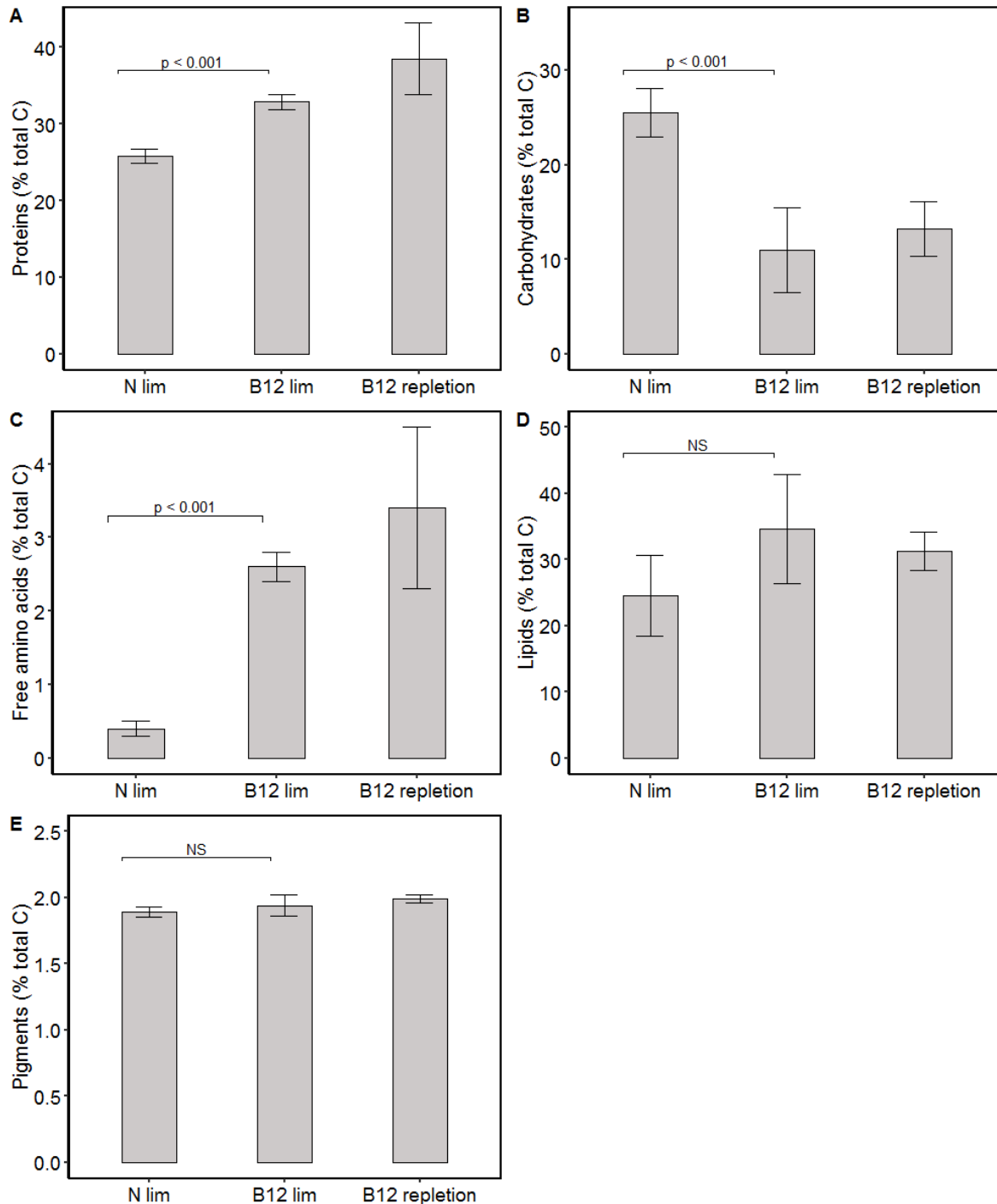


Figure 1. Carbon and partitioning between major metabolites in different nutrient states. Percentage of total carbon in (A), proteins, (B), carbohydrates, (C), free amino acids, (D), lipids and (E), pigments. Pigments correspond to the sum of Chl *a*, *c2* and xanthophylls. Values represent means $\pm$ one standard deviation for $n = 6$ biological replicates in B₁₂ and N limitation, and means $\pm$ one range for $n = 2$ biological replicates in B₁₂ repletion. Significance levels of one factor ANOVA are represented.

4.2 Pigments

Total chlorophyll (the sum of Chl *c2* and Chl *a*) per carbon unit was not impacted in B₁₂ limitation compared to N limitation, indicating that photosynthetic capacity was comparable in both physiological states (Fig. 2A). To identify whether B₁₂ limitation induced a photoprotective response, we analysed xanthophyll content. The ratio of pigments diatoxanthin (DT) and diadinoxanthin (DD) ($DT / (DD + DT)$) provides information on the microalgal photoprotective response as DD is converted into its quenched form DT in the xanthophyll cycle, allowing to dissipate excess energy [43]. The $DT / (DD + DT)$ ratio was lower in B₁₂ limitation vs N limitation (Fig. 2B), suggesting higher photoprotection in N-limited cells. No difference was observed in B₁₂ limitation vs repletion (Fig. 2A and B).

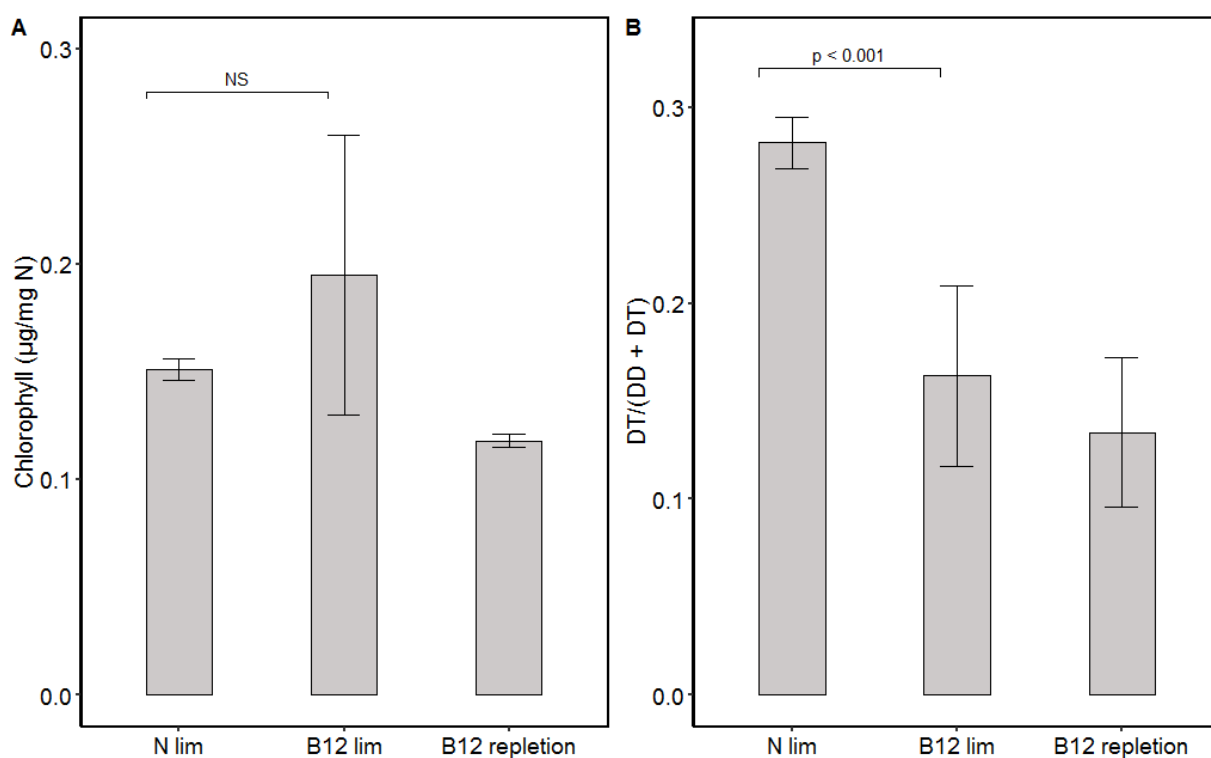


Figure 2. Intracellular concentration of pigments. (A), total chlorophyll (chlo *c2* + chlo *a*) quota. (B), ratio of photoprotective pigments diadinoxanthin and diatoxanthin. Values represent means $\pm$ one standard deviation for $n = 6$ biological replicates for B₁₂ and N limitation, and means $\pm$ one range for $n = 2$ biological replicates in B₁₂ repletion. Significance levels of one factor ANOVA are represented.

4.3 Osmolytes

The specific quantification of DMSP, glycine betaine (GBT), methionine and proline was conducted by LC-MS/MS (Fig. 3A-D). DMSP quota was five times lower in B₁₂ limitation (0.076 nmol/μg C) than in N limitation (0.419 nmol/μg C) and did not significantly changed one hour after cobalamin spike (0.099 nmol/μg C) (Fig. 3A). This represents respectively 2.53 % and 0.46 % of total algal carbon in B₁₂ and N limitations. Conversely, GBT and proline quotas were higher in B₁₂ limitation (0.096 and 0.030 nmol/μg C) whilst almost absent in N-limited cultures (< LOQ and 0.001 nmol/μg C) (Fig. 3C and D). This suggests that cobalamin limitation induces a replacement of DMSP by N-containing osmolytes. A significant decrease in proline quota was also observed in B₁₂ repletion (0.020 nmol/μg C) compared to B₁₂ limitation (Fig. 3D). Measures of free methionine did not show significant differences between the different ecophysiological conditions (Fig. 3B).

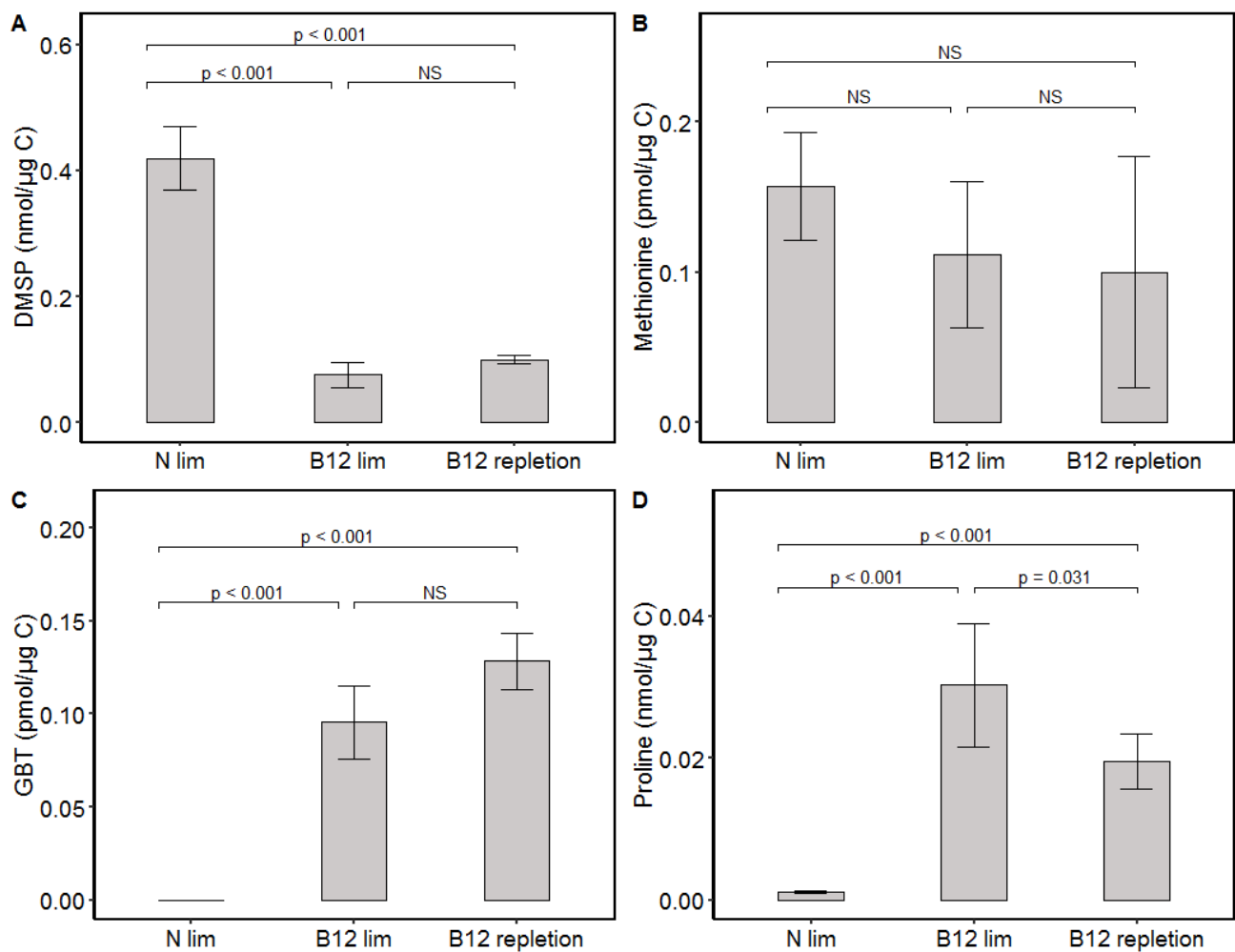


Figure 3. Intracellular concentration of osmolytes. (A), DMSP (B), methionine (C), GBT and (D), proline. Values represent means $\pm$ one standard deviation for $n = 18$ technical replicates for B₁₂ and N limitation, and means $\pm$ one standard deviation for $n = 6$ technical replicates in B₁₂ repletion (except for methionine with $n = 5$ replicates). GBT content for N limitation was below the limit of quantification. Significance levels of one factor ANOVA are represented.

4.4 Comparative proteomics

4.4.1 Overview of comparative proteomic results

In order to evaluate key metabolic pathways impacted by vitamin B₁₂ limitation in the model haptophyte microalgae *Tisochrysis lutea*, a large-scale comparative proteomic analysis was carried out. Raw data are available in [41]. A total of 2636 proteins were identified. Six biological replicates from B₁₂ limitation, four replicates from N limitation and two from B₁₂ repletion were used for both following comparative analyses: B₁₂ limitation vs N limitation and B₁₂ limitation vs B₁₂ repletion sampled one hour after B₁₂ adding. The abundance of 1726 and 1765 proteins was compared for both analysis, respectively. The highest folds reached a factor 3 and the lowest were about -20 in both comparative analyses. The majority of differentially accumulated proteins had a fold between -2 and -5 (see volcano plots in sup data). In B₁₂ limitation vs N limitation, 108 proteins were significantly differentially accumulated with 84 and 24 proteins down and up-accumulated respectively, corresponding to a variation of 6.26 % of the detected proteome. In B₁₂ limitation vs repletion, 75 proteins were differentially accumulated with 61 and 14 down and up-accumulated respectively, accounting for a rearrangement of 4.25 % detected proteome. Functional annotation led to the identification of the putative function of 70 % of the differentially accumulated proteins.

4.4.2 Central metabolism of carbon

Differentially-accumulated proteins involved in photosynthesis, Calvin cycle, glycolysis, tricarboxylic acid (TCA) cycle, oxidative respiration and lipid metabolism were identified in our comparative proteomic analysis (Fig. 4, Table 1). Seven proteins involved in photosynthesis were down-accumulated in B₁₂ limitation vs N limitation and one was up-accumulated. Six of these proteins were involved in light harvesting and the last ones were a cytochrome b6f complex subunit and a ferredoxin. From the seven chlorophyll *a/b*-binding proteins found in *T. lutea* proteome, three were down-accumulated and two of these chlorophyll *a/b*-binding proteins were also down-accumulated in B₁₂ limitation vs repletion. Three of the 16 fucoxanthin-chlorophyll *a/b*-binding proteins in *T. lutea* proteome were also down-accumulated in B₁₂ limitation vs N limitation and one in B₁₂ limitation vs repletion. One PsfF protein involved in reaction centre was strongly down-accumulated (18.2 fold) in B₁₂ limitation vs repletion. In a same way, the large subunit of Rubisco involved in the first step of carbon fixation was 5 fold down-accumulated whereas the small subunit was not differentially-accumulated. Together these results indicate a potential decrease of carbon fixation capacity in B₁₂ limitation vs N limitation.

Five proteins involved in four out of twelve steps of glycolysis/gluconeogenesis were down-accumulated in B₁₂ limitation vs N limitation, with folds ranging from 2.1 to 10.4. Therefore, the metabolic reorientation of carbon skeletons through this pathway seemed globally reduced. In parallel, 4 TCA cycle proteins were down-accumulated in B₁₂ limitation vs N limitation. The TCA cycle acts as a hub to allocate carbon skeletons between lipids, carbohydrates and proteins and provides energy to the cell in the form of ATP through the oxidation of these components. In addition to the apparent reduction of TCA cycle activity, 7 enzymes involved in oxidative

Table 1. List of identified proteins differentially accumulated ($p < 0.05$ and fold > 2.0 or $p < 0.05$ and fold < -2.0) in *T. lutea* in B₁₂ limitation vs nitrogen limitation. Only proteins of identified function are presented. Positive fold changes are represented in bold.

Protein ID	Functional classification	Pathway	Protein name	Protein code	E.C.	Fold change	p-value
P2301.01	Central metabolism & energy	Aerobic respiration	Cytochrome c oxidase subunit 6b-1	COX6b		-2.1	0.044
Tiso_v2_Prot_09912		Aerobic respiration	Cytochrome c oxidase subunit Via + 1 transmembrane domain	COX6a	1.9.3.1	-2.8	0.032
P62.01		Aerobic respiration	Mitochondrial peptidase subunit beta		3.4.24	-2.5	0.045
P682.01		Aerobic respiration	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 5	NADHDH		-3.4	0.007
P422.01		Aerobic respiration	Succinate dehydrogenase	SDH		-2.1	0.017
P276.01		Aerobic respiration	V-type proton ATPase subunit A	ATPase A		-3.7	0.033
P12.01		Aerobic respiration	V-type proton ATPase subunit B	ATPase B		-5.5	0.017
P148.01	Tiso_v2_Prot_15662	Aerobic respiration	V-type proton ATPase subunit C	ATPase C		-2.7	0.032
		Calvin cycle	Rubisco	Rbcl		-5.0	0.040
P432.01		Carbohydrates biosynthesis	Sialic acid synthase			-5.6	0.030
P793.01	Tiso_v2_Prot_14541	Cellular amide catabolic process	Aliphatic amidase			-3.5	0.003
		Glucose metabolic process	Mannitol dehydrogenase C-terminal domain			2.6	0.001
P87.01		Glycolysis /Gluconeogenesis	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	PGAM	5.4.2.1	-6.3	0.022
P5.03		Glycolysis /Gluconeogenesis	Bifunctional enolase /transcriptional activator	ENO	4.2.1.11	-10.4	0.044
P2651.01		Glycolysis /Gluconeogenesis	Pyruvate kinase	PK	2.7.1.40	-7.4	0.039
P209.01		Glycolysis /Gluconeogenesis	Triosephosphate isomerase	TP11	5.3.1.1	-2.8	0.040
P47.01		Glycolysis /Gluconeogenesis	Triosephosphate isomerase	TP12	5.3.1.1	-2.1	0.035
P1016.01		Photosynthesis	Chlorophyll a /b- binding protein			-2.5	0.039
P448.01		Photosynthesis	Chlorophyll a /b- binding protein			-2.7	0.011
P89.01		Photosynthesis	Chlorophyll a /b- binding protein			-2.8	0.007
P225.01		Photosynthesis	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit		1.10.9; 1.10.9.1	-2.2	0.007
P58.01		Photosynthesis	Ferredoxin	Fd		2.0	0.013
P110.01		Photosynthesis	Fucoanthin-chlorophyll a /c -binding protein			-2.4	0.014
P27.01		Photosynthesis	Fucoanthin-chlorophyll a /c -binding protein			-2.5	0.028
P57.01		Photosynthesis	Fucoanthin-chlorophyll a /c -binding protein			-2.4	0.046
P236.01		Purine metabolism	Adenosine kinase, mitochondria	AdK	2.7.1.20	2.2	0.020
P198.01		TCA cycle	2-oxoglutarate dehydrogenase-E1	OGDC-E2	1.2.4.2	-7.0	0.039
P417.01		TCA cycle	Succinyl-CoA ligase subunit alpha	SCS		-2.3	0.016
P2296.01	Cofactor metabolism	Cobalamin biosynthesis	Cobalamin synthesis protein CobW	CobW		2.3	0.015
P38.01		Methionine cycle	Methionine adenosyl transferase	MAT	2.5.1.6	2.3	0.025
P1241.01		Tocopherol biosynthesis (vitamin E)	SAM-dependent tocopherol O-methyltransferase			-2.0	0.050
P1182.01	Lipids & carbohydrates	Beta-oxidation	Acyl-CoA dehydrogenase	ACDH		-2.0	0.017
P1056.01		Beta-oxidation	Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	HCDH	1.1.1.35	-2.1	0.032
P281.01		Stress response and defense	Glucan 1,3-beta-glucosidase A			-2.1	0.017
P2739.01	N metabolism (proteins & amino acids)	Synthesis/ degradation of branched-chain amino acids	3-oxoacid CoA-transferase		2.8.3.5	-2.0	0.024
P647.01		Amino acid transport & metabolism	Acetolactate synthase large subunit		2.2.1.6	2.1	0.005
Tiso_v2_Prot_09563		Amino acid transport & metabolism	NAD-specific glutamate dehydrogenase	GDH	1.4.1.2; 1.4.1.3;	2.2	0.014
P156.01		Aminoacid degradation	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain	MCC2	6.4.1.2	-3.1	0.038
P2809.01		Aminoacyl-tRNA biosynthesis	Isoleucine-tRNA ligase		6.1.1.5; 3.1.1.1	2.0	0.037
P3332.01		Aminoacyl-tRNA biosynthesis	Valine-tRNA ligase		6.1.1.9; 3.1.1.1	-2.5	0.042
P35.01		Catabolism of amino-acids	Coccolith scale associated protein 1	CSAP1		-3.3	0.037
P96.02		Glutamate biosynthesis	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 2		1.4.7.1	-4.8	0.005
P915.01		Protease / peptidase	26S protease regulatory subunit 7			-5.4	0.039
P880.01		Protease / peptidase	Aspartic peptidase family A1		3.4.23	-2.7	0.007
P3901.01		Protease / peptidase	Peptidase M3-like family, oligoendopeptidase		3.4.24	2.0	0.026
P525.01		Protease / peptidase	Proteasome subunit alpha type-6-A		3.4.25	-5.2	0.020
P2455.01		Protease / peptidase	Proteasome subunit beta type-5		3.4.25	-3.1	0.002
P2831.01		Protease / peptidase	Ubiquitin-like modifier-activating E1			2.6	0.040
P53.01		Proteolysis, dipeptidase activity	Cysteine peptidase		3.4.13	-2.9	0.010
P166.01		Urea cycle	Argininosuccinate synthase	ASuS	6.3.4.5	-2.5	0.045
Tiso_v2_Prot_14921		Urea cycle	N-acetylglutamate synthase		2.3.1.1; 2.3.1.5	2.0	0.006

Table 1. (continued)

Protein ID	Functional classification	Pathway	Protein name	Protein code	E.C.	Fold change	p-value
P665.01	Morphogenesis & motility	Cell division	Cell division protein FtsZ homolog 2-2, chloroplastic		3.6.1.15	-2.1	0.013
P2111.01		Cytoskeleton	Tektin family			-2.6	0.008
P544.01		Morphogenesis & motility	Caltractin			-2.1	0.014
P923.01	Oxidative stress response	Cell redox homeostasis	Thioredoxin H1	TRX		-2.8	0.011
P1205.01		Reduction of methionine sulfoxide	Peptide methionine sulfoxide reductase	MSR	1.8.4.12	-3.2	0.003
P562.01	Post translational modification	Chaperone	T-complex protein 1 subunit eta			-10.2	0.013
P1.07		HSP	Heat shock cognate 70 kDa protein	HSP70		3.4	0.028
P564.01	Signal transduction	Calcium ion binding	EF-hand, calcium binding motif			-2.1	0.028
P1024.01		Calcium ion binding	LETM1-like and EF Hand domains containing protein			3.1	0.001
P437.01		Phosphorelay signal transduction	Histidine-containing phosphotransfer domain			-2.3	0.009
P741.01		Signal transduction	Calmodulin			-5.2	0.037
Tiso_v2_Prot_15676	Transcription & translation	Chloroplast ribosomal protein	30S ribosomal protein S11			2.1	0.004
P1296.01		Chloroplast ribosomal protein	50S ribosomal protein L2			2.1	0.003
Tiso_v2_Prot_06434		DNA binding	Histone H2B	H2B		-2.4	0.000
P126.01		DNA binding	Histone5-like protein	H5		-2.4	0.032
P701.01		Initiation	Translation initiation factor IF-2		3.6.1.15	-2.9	0.042
P1093.01		Ribosomal protein	30S ribosomal protein S20			2.8	0.004
P315.01		Ribosomal proteins	60S ribosomal protein L11			-2.2	0.029
P303.01		Ribosomal proteins	60S ribosomal protein L5-1			-22.3	0.003
P488.01		rRNA processing	Nucleolar protein 56			-5.2	0.049
P1002.01		Transcription	DNA polymerase III subunit gamma III			-16.5	0.011
Tiso_v2_Prot_02242		Transcription	RNA polymerase Rpb2, domain 7, subunit beta		2.7.7.6	2.0	0.016
P1362.01		Transcription factor	BolA	BolA		-2.2	0.004
P1261.01		Transcription regulation	Histone deacetylase complex subunit SAP30L	HDAC		-2.1	0.029
P335.01	Transport & secretion	Intermembrane lipid transport	Glycolipid transfer protein-like			-2.1	0.022
Tiso_v2_Prot_05607		Intracellular protein transport	Mitochondrial carrier protein PTZ00168			2.8	0.023
P304.02		Intracellular protein transport	Ras-related protein RABD2a		3.6.1.15	-3.5	0.005
P1768.01		Intracellular protein transport	Transport protein Sec24-like CEF			2.2	0.032

phosphorylation were down-accumulated in B₁₂ limitation vs N limitation and in B₁₂ limitation vs repletion. Two proteins involved in β -oxidation of lipids, that both have 2 homologues, were down-accumulated in B₁₂ limitation vs N limitation, suggesting a potential decrease in lipid degradation as a result of cobalamin limitation. No clear change in β -oxidation of lipids was observed in B₁₂ limitation vs repletion (sup data).

4.4.3 Metabolism of proteins and amino acids

In B₁₂ limitation vs N limitation, 17 proteins involved in nitrogen metabolism were differentially-accumulated (Table 1). Among these, 6 proteins with a protease or peptidase activity were down-accumulated over the 7 differentially-accumulated (Table 1). A methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC2), that has been shown to provide acetyl-CoA through degradation of leucine in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [44] was also down-accumulated in B₁₂ limitation vs N limitation (Table 1). Seven proteins involved in N metabolism were also down-accumulated in B₁₂ limitation vs repletion (sup data). Taken together, these results point to a decrease in protein and amino acid catabolism.

4.4.4 Impact of vitamin B₁₂ limitation on proteins related to cobalamin and methionine metabolism

We investigated whether a limitation in vitamin B₁₂ induced a change of proteins involved in methionine cycle. The B₁₂ dependent methionine synthase (METH) was strongly up-accumulated (10.6 fold) in B₁₂ limitation vs repletion (sup data). Although this result was weakly statistically supported ($p = 0.09$), it suggests a short-term effect of B₁₂ repletion on the synthesis of METH. No clear change of METH accumulation was observed in B₁₂ limitation vs N limitation. The methionine adenosyltransferase (MAT) was 2.34 fold up-accumulated in B₁₂ limitation vs N limitation and 1.92 fold up-accumulated in B₁₂ limitation vs repletion (Table 1, Fig. 4). MAT allows the conversion of methionine into S-adenosyl methionine. MAT over-accumulation suggests either a potential attempt to meet S-adenosyl methionine demand in spite of B₁₂ scarcity or an increase of S-adenosyl methionine requirement in cobalamin limitation. In some microorganisms, a methionine salvage pathway (MSP) can serve as an alternate way to get methionine back after its conversion into S-adenosyl methionine [45]. Though we did find 4 proteins potentially involved in MSP in *T. lutea*, none of them was differently-accumulated, suggesting that methionine cycling through MSP was not favoured in spite of reduced vitamin B₁₂ availability.

The accumulation of two other B₁₂-requiring enzymes identified in *T. lutea* genome was investigated. Class II ribonucleotide reductases (RNRII) catalyse the reversible conversion of dNTP into NDP for DNA synthesis with cobalamin as a cofactor [46]. We did not find RNRII protein in *T. lutea* proteome, but a supposedly cobalamin-independent class I RNR (RNRI) which was over-accumulated by 1.9 in B₁₂ limitation vs N limitation (sup data).

4.4.5 Proteins involved in osmolyte synthesis

In microalgae, DMSP biosynthesis from methionine involves two reversible steps of transamination and reduction, a transfer of methyl by a methyltransferase and a final step of decarboxylation [26,47]. The corresponding genes are poorly described in marine microalga. On the basis of functional annotation, putative candidates were selected in the proteome (Supp data). Among them, enzymes with unclear function, and which amount was related to DMSP concentrations retained our attention. However, only one methyl transferase was selected (P1333.01) on these criterions and functional analysis are missing for assuming its role in DMSP synthesis. In the environment, DMS may be released after DMSP cleavage by DMSP lyases [48]. No DMSP lyases candidate was found in *T. lutea* by searching for homologous DMSP lyases of the *Emiliania huxleyi*

(P0DN21, P0DN23, R1F9H0, R1CW23, R1ERP2, R1F493, R1ENF4 and R1G6M4) and *Symbiodinium* sp. (P0DN22).

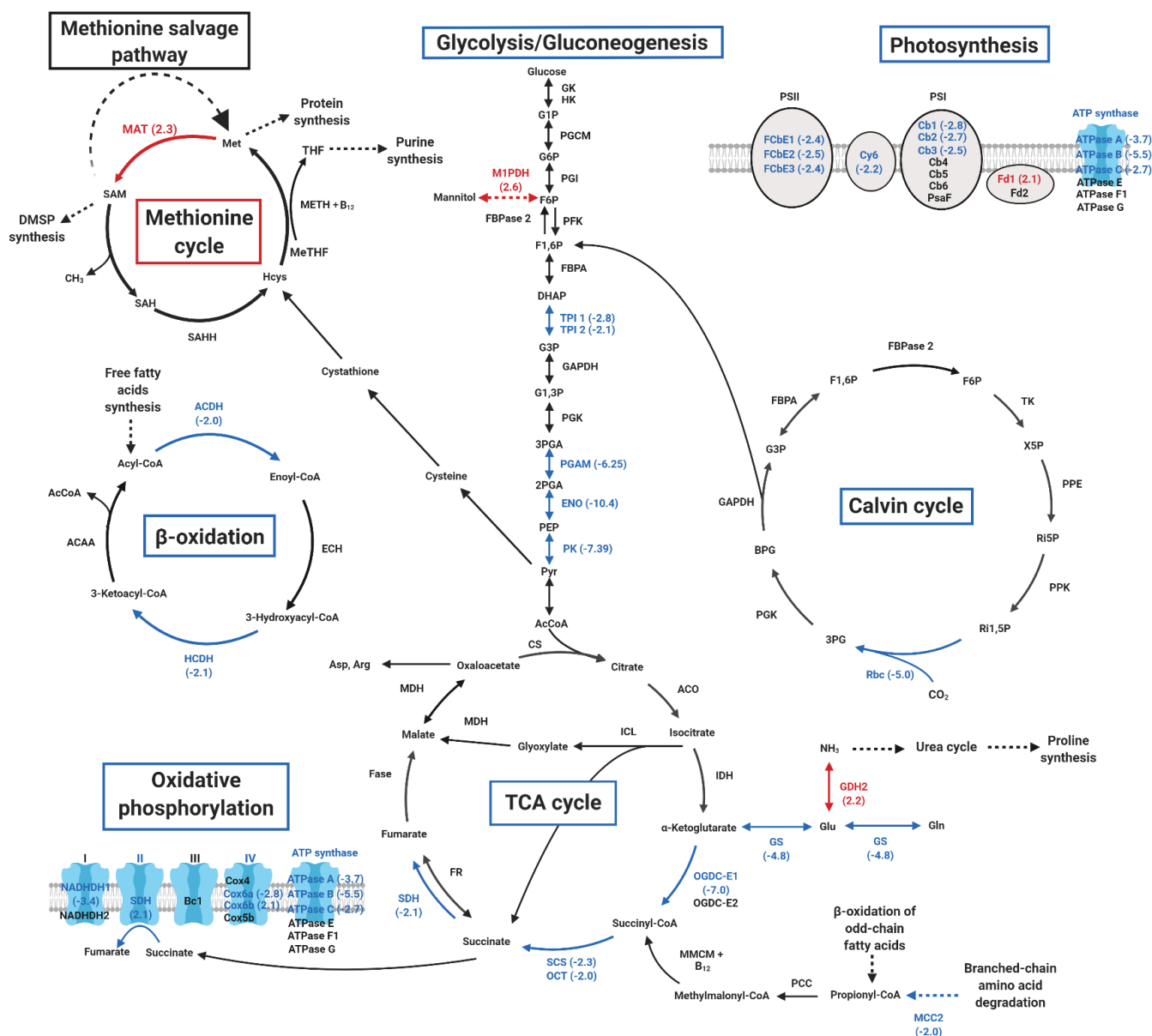


Figure 4. Overview of major metabolic pathways differentially impacted in *B₁₂* limitation vs. *N* limitation. Up-accumulated proteins ($p < 0.05$ and fold > 2.0) are shown in red and down-accumulated proteins ($p < 0.05$ and fold < -2.0) are shown in blue.

We then focused on proteins involved in the synthesis of N-containing osmolytes glycine betaine (GBT) and proline. Choline is converted by choline dehydrogenase (CDH) into betaine aldehyde that is in turn converted into GBT by betaine aldehyde dehydrogenase (BADH). We identified a putative CDH that did not display differential accumulation in this study. Proline is synthesized from ornithine originated from the ornithine-urea cycle in diatoms and haptophytes [49]. Two proteins involved in the synthesis of ornithine, namely an N-

acetylglutamate synthase (Tiso_v2_Prot_14921) and an acetylornithine transaminase (P1475.01) were up-accumulated in B₁₂ limitation vs N limitation (Table 1). An argininosuccinate synthase (ASuS) that converts aspartate and citrulline into argininosuccinate in the urea cycle was down-accumulated by 2.5 under B₁₂ limitation vs N limitation (Table 1). All these proteins are unique in *T. lutea* proteome. Although ASuS appeared down-accumulated, the over-accumulation of the majority of these proteins in B₁₂ limitation is in line with the higher proline content.

5 Discussion

Information about how microalgae mediate vitamin B₁₂ limitation is rare even though B₁₂ controls phytoplankton development in numerous marine systems [20–24]. In a previous work we proposed that Haptophyta would be the first microalgal phylum described to gather only B₁₂-dependent species [14]. Given that haptophytes are ubiquitous [2] and are key contributors to pico and nano-plankton biomass [5], deciphering the effect of cobalamin scarcity on these microalgae should provide important insights to understand mechanisms shaping these microbial communities. Here, we characterized the effect of vitamin B₁₂ limitation on the global physiology of the model haptophyte microalga *Tisochrysis lutea*. The microalgae was grown in controlled B₁₂-limited and nitrogen-limited chemostats, enabling to analyse accurately controlled and steady ecophysiological conditions. *T. lutea* physiology in nitrogen limitation has been already characterized at biochemical and proteomic level in a previous study in similar conditions [37] and for this reason was chosen as reference to evaluate the specific effect of B₁₂ limitation on *T. lutea* metabolism in this study. We performed biochemical analyses and deep comparative proteomics to compare the effect of B₁₂ limitation vs nitrogen limitation, and to study the short term physiological response in B₁₂ repletion.

Both cobalamin and nitrogen (N) are involved in the synthesis of amino acids and proteins. Thereby, very few and specific differences between B₁₂ and N limitation were expected at steady state with a fixed growth rate. Few differences at proteomic level were observed in B₁₂ limitation vs N limitation and vs B₁₂ repletion, that we were able to link to clear phenotypic traits variations. The main metabolic pathways affected at proteomic level by vitamin B₁₂ limitation were methionine metabolism, central carbon metabolism and nitrogen metabolism. Possible interconnections of these pathways and their implications are discussed below.

First, photosynthetic and photo-protective status of *T. lutea* were compared between B₁₂ and N limitations by integrating different analyses. Chlorophyll content did not differ between both ecophysiological status but B₁₂-limited cultures exhibited lower photoprotection and respiration compared to N-limited cultures. As effort was made to maintain equal light behind the cultures (50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) as a mean to assume same light availability, we observed a slight difference of 10 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in front of the chemostats. Because this difference of intensity was very low the difference in pigment ratio may be related to the effect of nutrient limitation rather than to the effect of dissimilar light intensities. Together with these results, the reduction of proteins involved in light harvesting complex and cytochrome b6f in B₁₂ limitation suggest that *T. lutea*

dissipated less excess energy in B₁₂ limitation compared to N limitation. In the purple bacteria *Rhodobacter capsulatus*, vitamin B₁₂ binds to an antirepressor complex and regulates bacteriochlorophyll pathway [50]. Our results in *T. lutea* suggest similar mechanism but such of hypothesis should be more deeply explored in eukaryotic phytoplankton. On other part, proteomic analysis showed a concomitant decrease of proteins of TCA cycle and oxidative phosphorylation suggesting a general reduction of mitochondrial energetic metabolism in B₁₂ vs N limitation. Thus, despite the same specific growth rate, the photosynthetic and respiratory characteristics change between B₁₂ and N limitations. Such differences have already been observed in the chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* grown in chemostat with the same dilution rate under N and phosphorus limitations [51]. The development of this kind of comparisons could provide a better picture of how algae acclimate according to the different limiting nutrients.

Previous RT-qPCR analyses have shown that B₁₂ limitation led to the overexpression at transcript level of B₁₂-dependent methionine synthase (METH), methionine adenosyltransferase (MAT) and S-adenosyl homocysteine hydrolase (SAHH), the three methionine cycle enzymes [14]. Here, vitamin B₁₂ limitation led to a 2.3 times over-accumulation of MAT. The methionine salvage pathway seemed not to be active. These results partially confirmed previous transcriptomic results, supporting the hypothesis that B₁₂ limitation finely regulates the amount of methionine cycle enzymes in *T. lutea*. Similar observations have been reported for B₁₂-dependent diatom *Thalassiosira pseudonana* which accumulated elevated amounts of MAT when grown with low cobalamin input [31]. MAT converts methionine into S-adenosyl methionine (SAM), a methylating agent of great importance for numerous reactions. In *T. pseudonana* cells, SAM is less abundant in B₁₂ limitation despite the up-accumulation of MAT [52]. Therefore, it is possible that B₁₂-dependent microalgae share a common acclimation mechanism to B₁₂ limitation by increasing the ability to produce SAM, potentially to maintain methylation reactions.

A down-accumulation of proteases, peptidases and amino-acid degradation proteins was observed in B₁₂ limitation and this was correlated to a higher concentration of total proteins and free amino acids in cells. In addition, proteomics analyses showed a general reduction of β -oxidation and, in accordance, biochemical analysis showed a higher lipid concentration. The decrease of protein and lipid catabolism suggest a lower source of carbon skeleton for carbohydrates production. Accordingly, a lower carbon allocation to carbohydrates during B₁₂ limitation was observed. Moreover, numerous enzymes of TCA cycle and glycolysis/gluconeogenesis were down-accumulated in B₁₂ limitation. TCA cycle is an important metabolic crossroad for carbon skeletons. Taken together, these results suggest a lower allocation of carbon originating from lipids and proteins catabolism to the synthesis of carbohydrates via the TCA cycle and gluconeogenesis. Carbohydrates and lipids contents did not change one hour after B₁₂ repletion and no clear difference was observed at proteic level for β -oxidation, TCA cycle and glycolysis/gluconeogenesis. It is likely that mechanisms regulating intracellular carbon allocation after a vitamin B₁₂ input may take longer than one hour before having observable effects. SAM and tetrahydrofolate are two coenzymes involved in C₁ groups transfer

and their synthesis is closely related to B₁₂ [28,29,53,54]. The link between B₁₂ and carbon metabolism might be responsible for the observed changes in carbon allocation.

Both methionine and SAM are involved in DMSP synthesis [48] and haptophytes are known to be major contributors to DMSP and DMS production in oceans [10]. Our hypothesis was that reduced B₁₂ availability would lead to decreased DMSP production in B₁₂-auxotrophic haptophytes. The comparison between B₁₂ and N starved cultures of the B₁₂-dependent diatom *Thalassiosira pseudonana* showed that DMSP concentration was lower in B₁₂ starvation [55]. In haptophytes, N starvation was shown to greatly increase the production of DMS [56,13]. Here, our analysis clearly indicated a sharp DMSP decrease during B₁₂ limitation in *T. lutea*, indicating that oceanic DMSP production by haptophytes can be driven by B₁₂ availability levels.

DMSP is suspected to play different roles in algal cells, such as osmoregulation, cryoprotectant in polar algae, and antioxidant [10,57–59]. Here, our results show a higher production of N-containing osmolytes GBT and proline to counterbalance the decrease of DMSP during B₁₂ limitation. Though we were not able to detect differentially-accumulated proteins accountable for the increase of GBT, we identified several proteins potentially responsible for differential proline synthesis in B₁₂ limitation vs N limitation and repletion. Such a switch was proposed to occur but was not clearly observed in previous studies [56,60]. This reinforces the partial role of osmolyte of DMSP.

In the haptophyte *E. huxleyi*, it has been estimated that 5 % of cell carbon was allocated to DMSP whatever the nitrogen limitation conditions [13]. In *T. lutea*, we recorded overall quite similar values of 2.5 % in N limitation but only 0.5 % in B₁₂ limitation. Molecular analysis did not allow to clearly identify genes involved in DMSP synthesis, nor in the conversion of DMSP into DMS. Whereas some candidates have been identified, there is not clear evidence for B₁₂ limitation impact on the expression of DMSP biosynthetic enzymes or conversion in DMS. Therefore, we assume that the reduction in DMSP is the result of a smaller quantity of methionine produced under the effect of B₁₂ limitation. Accordingly, we evaluated the importance of DMSP as a methionine sink by comparing the amount of methionine granted to DMSP in comparison to protein synthesis. Free methionine amount was considered negligible and SAM was not estimated in this study. In B₁₂ limitation, 40 % of methionine was allocated to DMSP and 60 % to proteins whereas in N limitation 80 % of methionine was allocated to DMSP and 20 % to proteins. Additionally, total methionine quantities (considered in this study as the sum of proteic methionine and methionine in DMSP equivalent) were reduced by 44 % in B₁₂ limitation (300.97 fg/cell) compared to N limitation (539.86 fg/cell). Maintaining DMSP production even in conditions of B₁₂ scarcity is therefore an important metabolic constraint, at least for methionine metabolism. It seems plausible that benefits of DMSP production justify minimal cellular amounts despite high methionine cost. DMSP is considered as a major infochemical in the phycosphere and can control algal interactions with bacteria [61–63]. We therefore hypothesize that key physiological role to ensure balanced global metabolism and/or important signalling may explain continuous DMSP synthesis in conditions of low B₁₂ availability.

In the environment, DMSP can be cleaved into dimethyl sulfide (DMS) by the enzyme DMSP-lyase in select phytoplankton species and bacteria [10,64–66]. DMS is a climatically-important sulphur gas, contributing to around 10–40 % of total global sulphur budget and is mainly emitted from oceanic reservoirs [67,68]. In haptophytes DMSP-lyase activity has been suggested to be restricted to only one family, the Noelaerhabdaceae [9]. We did not find any DMSP-lyase homologue in the proteome of *T. lutea* (Isochrysidaceae family), which lends support to this idea. Here, we showed that DMSP biosynthesis in *T. lutea* is partially driven by cobalamin availability. In marine systems, vitamin B₁₂ production is performed only by a subset of bacteria and archaea and our previous results suggest that all haptophytes are B₁₂-dependent [14]. Because DMSP production by haptophytes greatly contribute to the DMS oceanic production and sulfur cycle, all these elements support the hypothesis that bacterial communities indirectly affect DMS oceanic production and sulfur cycle.

6 Competing Interests

The authors declare that they have no competing financial interests.

7 Acknowledgements

This work was part of the Atlantic Microalgae project, we acknowledge funding by the region Pays de la Loire, France.

8 References

1. Jordan RW, Chamberlain AHL. Biodiversity among haptophyte algae. *Biodivers Conserv.* 1997;6:131–52.
2. O’Brien CJ, Peloquin JA, Vogt M, Heinle M, Gruber N, Ajani P, et al. Global marine plankton functional type biomass distributions: coccolithophores. *Earth Syst Sci Data.* 2013 Jul 12;5(2):259–76.
3. Reynolds CS. *Ecology of phytoplankton.* Cambridge: Cambridge University Press; 2006. 535 p. (Ecology, biodiversity, and conservation).
4. Not F, Latasa M, Scharek R, Viprey M, Karleskind P, Balagué V, et al. Protistan assemblages across the Indian Ocean, with a specific emphasis on the picoeukaryotes. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap.* 2008 Nov;55(11):1456–73.
5. Thomsen H, Buck KR, Chavez FP. Haptophytes as components of marine phytoplankton. In: *The Haptophyte Algae.* Clarendon Press, Oxford; 1994. p. 187–208.
6. Jardillier L, Zubkov MV, Pearman J, Scanlan DJ. Significant CO₂ fixation by small prymnesiophytes in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean. *ISME J.* 2010 Sep;4(9):1180–92.
7. Liu H, Probert I, Uitz J, Claustre H, Aris-Brosou S, Frada M, et al. Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains major pigment paradox in open oceans. *Proceeding Natl Acad Sci.* 2009;31:1–6.

8. Milliman JD. Production and accumulation of calcium carbonate in the ocean: Budget of a nonsteady state. *Glob Biogeochem Cycles*. 1993 Dec;7(4):927–57.
9. Franklin D, Steinke M, Young J, Probert I, Malin G. Dimethylsulphoniopropionate (DMSP), DMSP-lyase activity (DLA) and dimethylsulphide (DMS) in 10 species of coccolithophore. *Mar Ecol Prog Ser*. 2010 Jul 14;410:13–23.
10. Keller MD, Bellows WK, Guillard RRL. Dimethyl Sulfide Production in Marine Phytoplankton. In: Saltzman ES, Cooper WJ, editors. *Biogenic Sulfur in the Environment* [Internet]. Washington, DC: American Chemical Society; 1989 [cited 2019 Jun 12]. p. 167–82. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1989-0393.ch011>
11. Malin G, Turner SM, Liss PS. Sulfur: the plankton/climate connection. *J Phycol*. 1992 Oct;28(5):590–7.
12. Malin G, Kirst GO. Algal production of dimethyl sulfide and its atmospheric role. *J Phycol*. 1997 Dec;33(6):889–96.
13. Sunda WG, Hardison R, Kiene RP, Bucciarelli E, Harada H. The effect of nitrogen limitation on cellular DMSP and DMS release in marine phytoplankton: climate feedback implications. *Aquat Sci*. 2007 Sep;69(3):341–51.
14. Nef C, Jung S, Mairet F, Kaas R, Grizeau D, Garnier M. How haptophytes microalgae mitigate vitamin B₁₂ limitation. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1):8417.
15. Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, Warren MJ, Smith AG. Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*. 2005;483:90–93.
16. Martens J-H, Barg H, Warren MJ, Jahn D. Microbial production of vitamin B₁₂. *Appl Microb Biotechnol*. 2002;
17. Warren MJ, Raux E, Schubert HL, Escalante-Semeran JC. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). *Nat Prod Rep*. 2002;19:390–412.
18. Panzeca C, Beck AJ, Tovar-Sanchez A, Segovia-Zavala J, Taylor GT, Gobler CJ, et al. Distributions of dissolved vitamin B₁₂ and Co in coastal and open-ocean environments. *Estuar Coast Shelf Sci*. 2009;85:223–230.
19. Sañudo-Wilhelmy, S. A., Cutter LS, Durazo R, Smail EA, Gómez-Consarnau L, Webb EA, et al. Multiple B-vitamin depletion in large areas of the coastal ocean. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109:14041–14045.
20. Suffridge CP, Gómez-Consarnau L, Monteverde DR, Cutter L, Arístegui J, Alvarez-Salgado XA, et al. B vitamins and their congeners as potential drivers of microbial community composition in an oligotrophic marine ecosystem. *J Geophys Res Biogeosciences*. 2018;123:2890–2907.
21. Bertrand EM, Saito MA, Rose JM, Riesselman CR, Lohan MC, Noble AE, et al. Vitamin B₁₂ and iron colimitation of phytoplankton growth in the Ross Sea. *Limnol Oceanogr*. 2007;52:1079–1093.
22. Gobler CJ, Norman C, Panzeca C, Taylor GT, Sañudo-Wilhelmy SA. Effect of B-vitamins (B₁, B₁₂) and inorganic nutrients on algal bloom dynamics in a coastal ecosystem. *Aquat Microb Ecol*. 2007;49:181–194.
23. Koch F, Marcoval MA, Panzeca C, Bruland KW, Sañudo-Wilhelmy SA, Gobler CJ. The effect of vitamin B₁₂ on phytoplankton growth and community structure in the Gulf of Alaska. *Limnol Oceanogr*. 2011;56:1023–1034.

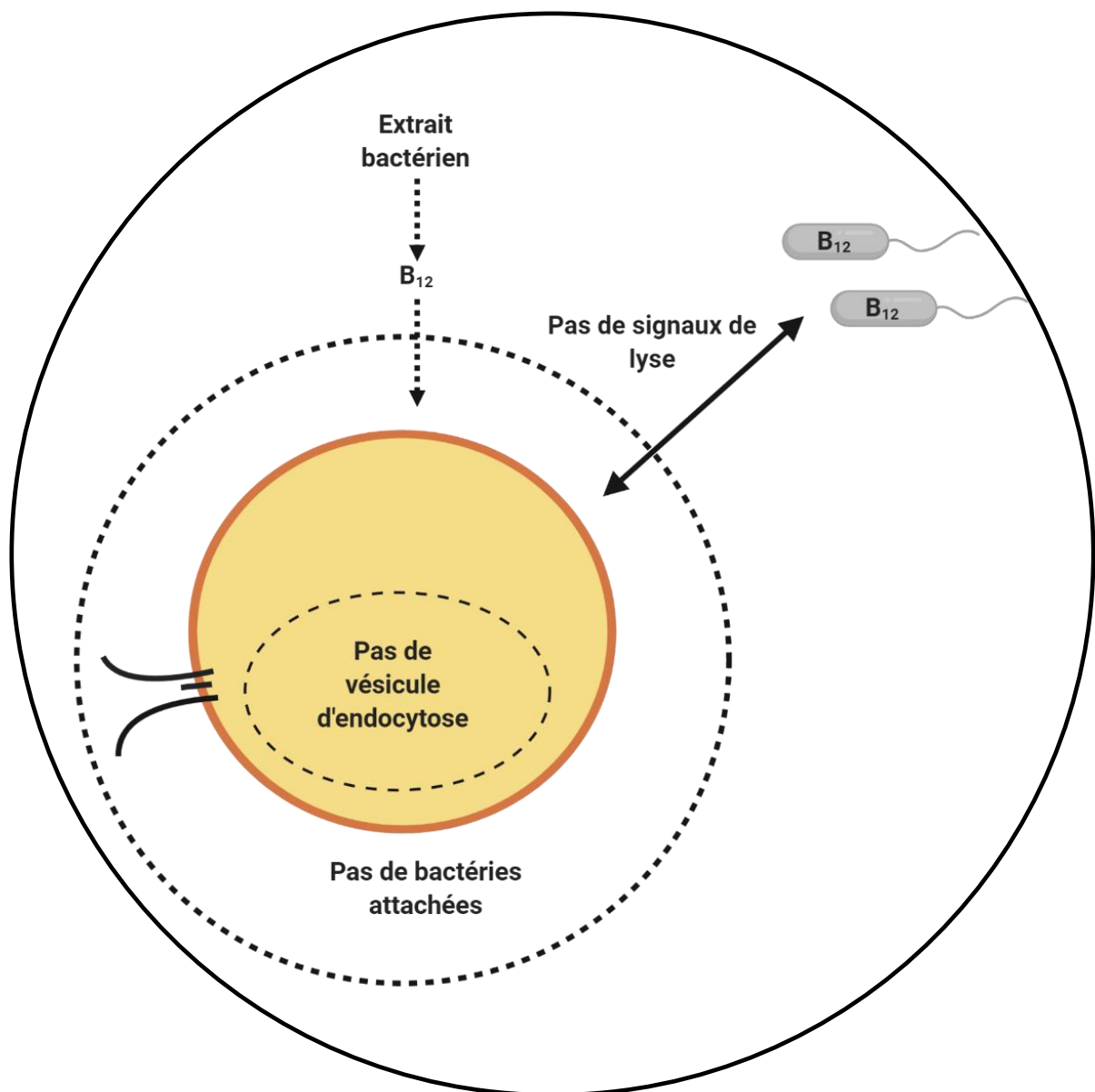
24. Panzeca C, Tovar-Sanchez A, Agusti S, Reche I, Duarte CM, Taylor GT, et al. B vitamins as regulators of phytoplankton dynamics. *Eos Trans Am Geophys Union*. 2006;49:594–596.
25. Helliwell EK, Wheeler GL, Leptos KC, Goldstein RE, Smith AG. Insights into the evolution of vitamin B₁₂ auxotrophy from sequenced algal genomes. *Trends Genet*. 2011;29:469–478.
26. Gage DA, Rhodes D, Nolte KD, Hicks WA, Leustek T, Cooper AJL, et al. A new route for synthesis of dimethylsulphoniopropionate in marine algae. *Nature*. 1997 Jun;387(6636):891–4.
27. Struck A-W, Thompson ML, Wong LS, Micklefield J. S⁺-Adenosyl-Methionine-Dependent Methyltransferases: Highly Versatile Enzymes in Biocatalysis, Biosynthesis and Other Biotechnological Applications. *ChemBioChem*. 2012 Dec 21;13(18):2642–55.
28. Fujimori DG. Radical SAM-mediated methylation reactions. *Curr Opin Chem Biol*. 2013 Aug;17(4):597–604.
29. Sauter M, Moffatt B, Saechao MC, Hell R, Wirtz M. Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochem J*. 2013 Apr 15;451(2):145–54.
30. Curson ARJ, Williams BT, Pinchbeck BJ, Sims LP, Martínez AB, Rivera PPL, et al. DSYB catalyses the key step of dimethylsulfonylpropionate biosynthesis in many phytoplankton. *Nat Microbiol*. 2018 Apr;3(4):430–9.
31. Bertrand EM, Allen AE, Dupont CL, Norden-Krichmar TM, Bai J, Valas RE, et al. Influence of cobalamin scarcity on diatom molecular physiology and identification of a cobalamin acquisition protein. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;1762–1771.
32. Bertrand EM, Moran DM, McIlvin MR, Hoffman JM, Allen AE, Saito MA. Methionine synthase interreplacement in diatom cultures and communities: Implications for the persistence of B₁₂ use by eukaryotic phytoplankton. *Limnol Oceanogr*. 2013;58:1431–1450.
33. Helliwell KE, Scaife MA, Sasso S, Ulian Araujo AP, Purton S, Smith AG. Unraveling vitamin B₁₂-responsive gene regulation in algae. *Plant Physiol*. 2014;165:388–397.
34. Helliwell KE, Collins S, Kazamia E, Wheeler GL, Smith AG. Fundamental shift in vitamin B₁₂ eco-physiology of a model alga demonstrated by experimental evolution. *ISME J*. 2015;9:1446–1455.
35. Walne PR. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. In: *Fishery Investigations*. 1970. p. 62.
36. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem*. 1956 Mar;28(3):350–6.
37. Garnier M, Bougaran G, Pavlovic M, Bérard J-B, Carrier G, Charrier A, et al. Use of a lipid rich strain reveals mechanisms of nitrogen limitation and carbon partitioning in the haptophyte *Tisochrysis lutea*. *Algal Res*. 2016;20:229–248.
38. Serive B, Nicolau E, Bérard J-B, Kaas R, Pasquet V, Picot L, et al. Community analysis of pigment patterns from 37 microalgae strains reveals new carotenoids and porphyrins characteristic of distinct strains and taxonomic groups. Ianora A, editor. *PLOS ONE*. 2017 Feb 23;12(2):e0171872.
39. Geider R, La Roche J. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur J Phycol*. 2002 Mar;37(1):1–17.

40. Georges des Aulnois M, Roux P, Caruana A, Réveillon D, Briand E, Hervé F, et al. Physiological and metabolic responses of freshwater and brackish strains of *Microcystis aeruginosa* acclimated to a salinity gradient: insight into salt tolerance. *Appl Environ Microbiol*. 2019 Aug 23;AEM.01614-19, aem;AEM.01614-19v1.
41. Nef C, Henry C, Mairet F, Garnier M. Proteome of *T. lutea* in B12 and N limitation [Internet]. SEANOE; 2019 [cited 2019 Aug 21]. Available from: <https://www.seanoe.org/data/00508/62006/>
42. Valot B, Langella O, Nano E, Zivy M. MassChroQ: A versatile tool for mass spectrometry quantification. *PROTEOMICS*. 2011 Sep;11(17):3572–7.
43. Arsalane W, Rousseau B, Duval J-C. Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem Photobiol*. 1994 Sep;60(3):237–43.
44. Ge F, Huang W, Chen Z, Zhang C, Xiong Q, Bowler C, et al. Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Regulates Triacylglycerol Accumulation in the Model Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Cell*. 2014 Apr 1;26(4):1681–97.
45. Albers E. Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. *IUBMB Life*. 2009 Dec;61(12):1132–42.
46. Sando GN, Blakley RL, Hogenkamp HP, Hoffmann PJ. Studies on the mechanism of adenosylcobalamin-dependent ribonucleotide reduction by the use of analogs of the coenzyme. *J Biol Chem*. 1975 Nov 25;250(22):8774–9.
47. Rhodes D, Gage DA, Cooper AJL, Hanson AD. S-Methylmethionine Conversion to Dimethylsulfonylpropionate: Evidence for an Unusual Transamination Reaction. *Plant Physiol*. 1997 Dec 1;115(4):1541–8.
48. Stefels J. Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *J Sea Res*. 2000;43:183–197.
49. Allen AE, Dupont CL, Oborník M, Horák A, Nunes-Nesi A, McCrow JP, et al. Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature*. 2011 May;473(7346):203–7.
50. Cheng Z, Li K, Hammad LA, Karty JA, Bauer CE. Vitamin B₁₂ regulates photosystem gene expression via the CrtJ antirepressor AerR in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol*. 2014 Feb;91(4):649–64.
51. Geider R, Macintyre, Graziano L, McKay RM. Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *Eur J Phycol*. 1998 Nov;33(4):315–32.
52. Heal KR, Qin W, Ribalet F, Bertagnolli AD, Coyote-Maestas W, Hmelo LR, et al. Two distinct pools of B12 analogs reveal community interdependencies in the ocean. *Proc Natl Acad Sci*. 2017 Oct 1;114(2):364–9.
53. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, et al. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J*. 1996;10:471–480.
54. Kozbial PZ, Mushegian AR. Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC Struct Biol*. 2005;5:1–26.
55. Spiese C, Tatarkov E. Dimethylsulfoxide reduction activity is linked to nutrient stress in *Thalassiosira pseudonana* NCMA 1335. *Mar Ecol Prog Ser*. 2014 Jul 17;507:31–8.

56. Keller MD, Matrai PA, Kiene RP, Bellows WK. Responses of coastal phytoplankton populations to nitrogen additions: dynamics of cell-associated dimethylsulfoniopropionate (DMSP), glycine betaine (GBT), and homarine. *Can J Fish Aquat Sci.* 2004 May;61(5):685–99.
57. Sunda W, Kieber DJ, Kiene RP, Huntsman S. An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature.* 2002 Jul;418(6895):317–20.
58. Gebser B, Pohnert G. Synchronized Regulation of Different Zwitterionic Metabolites in the Osmoadaption of Phytoplankton. *Mar Drugs.* 2013 Jun 17;11(6):2168–82.
59. Petrou K, Nielsen DA. Uptake of dimethylsulphoniopropionate (DMSP) by the diatom *Thalassiosira weissflogii*: a model to investigate the cellular function of DMSP. *Biogeochemistry.* 2018 Nov;141(2):265–71.
60. Keller MD, Kiene RP, Matrai PA, Bellows WK. Production of glycine betaine and dimethylsulfoniopropionate in marine phytoplankton. I. Batch cultures. *Mar Biol.* 1999 Nov 5;135(2):237–48.
61. Seyedsayamdost MR, Case RJ, Kolter R, Clardy J. The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nat Chem.* 2011 Apr;3(4):331–5.
62. Barak-Gavish N, Frada MJ, Ku C, Lee PA, DiTullio GR, Malitsky S, et al. Bacterial virulence against an oceanic bloom-forming phytoplankter is mediated by algal DMSP. *Sci Adv.* 2018 Oct;4(10):eaau5716.
63. Kessler RW, Weiss A, Kuegler S, Hermes C, Wichard T. Macroalgal-bacterial interactions: Role of dimethylsulfoniopropionate in microbial gardening by *Ulva* (Chlorophyta). *Mol Ecol.* 2018 Apr;27(8):1808–19.
64. Ledyard K, Dacey J. Dimethylsulfide production from dimethylsulfonio-propionate by a marine bacterium. *Mar Ecol Prog Ser.* 1994;110:95–103.
65. Steinke M, Wolfe G, Kirst G. Partial characterisation of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) lyase isozymes in 6 strains of *Emiliana huxleyi*. *Mar Ecol Prog Ser.* 1998;175:215–25.
66. Caruana AMN, Malin G. The variability in DMSP content and DMSP lyase activity in marine dinoflagellates. *Prog Oceanogr.* 2014 Jan;120:410–24.
67. Lovelock JE, Maggs RJ, Rasmussen RA. Atmospheric Dimethyl Sulphide and the Natural Sulphur Cycle. *Nature.* 1972 Jun;237(5356):452–3.
68. Charlson RJ, Lovelock JE, Andreae MO, Warren SG. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature.* 1987;326:655–661.

Chapitre 4

Interactions microbiennes pour la vitamine B₁₂



Sommaire

4.1	Introduction.	165
4.2	Matériel et méthodes	166
4.2.1	Recherche de bactéries productrices de vitamine B ₁₂ dans une communauté bactérienne associée à <i>T. lutea</i>	166
4.2.2	Criblage de souches bactériennes sur la base de leur production de vitamine	167
4.3	Résultats et discussion	171
4.3.1	Co-culture avec une communauté bactérienne	171
4.3.2	Sélection et caractérisation de souches bactériennes productrices de B ₁₂	173
4.3.3	Caractérisation des modes d'acquisition de la vitamine B ₁₂ par des co-cultures	179
4.3.4	Co-culture en chimostat avec <i>P. porticola</i>	182
4.4	Conclusion	186
4.5	Article 3 : Unravelling interactions between B ₁₂ -producing bacteria and the model haptophyte <i>Tisochrysis lutea</i> : the absence of B ₁₂ excretion prevents from mutualism in co-culture	190

4.1 Introduction

Le chapitre précédent a permis d'identifier certains liens entre vitamine B₁₂ et métabolismes de la méthionine, du carbone et de l'azote chez *T. lutea*, en couplant des approches biochimiques et moléculaires. Les résultats nous ont permis de proposer l'existence d'un lien direct entre les bactéries productrices de vitamine B₁₂ et la synthèse de DMSP par les microalgues haptophytes.

Ce chapitre a pour objet la compréhension des interactions microbiennes dans un système simplifié. Il présente les résultats obtenus concernant la caractérisation du mode d'obtention de la vitamine B₁₂ par les Haptophytes en prenant pour modèle *T. lutea*. Comme décrit en introduction, les seuls organismes capables de synthétiser la cobalamine sont des procaryotes et les concentrations de B₁₂ dissoute dans l'environnement marin sont régulièrement limitantes pour le développement du phytoplancton. Ainsi, les microalgues auxotrophes pour cette vitamine devront bénéficier soit d'un apport direct excrété par des producteurs de B₁₂, soit d'un apport indirect issu de la lyse cellulaire, bactérienne ou algale.

Dans la littérature, plusieurs travaux ont caractérisé des cultures bispécifiques de microalgues et de bactéries en absence d'un apport externe de vitamine. C'est par exemple le cas pour le Dinoflagellé marin *Lingulodinium polyedrum*, qui rendrait disponible de la vitamine B₇ pour la bactérie *Dinoroseobacter shibae* en retour des vitamines B₁ et B₁₂ (Cruz-López et al., 2018). Kazamia et al. (2012) ont de même montré l'atteinte d'un équilibre entre la Chlorophyte d'eau douce *Lobomonas rostrata* et la bactérie *Mesorhizobium loti*, durant lequel la bactérie produisait de la cobalamine en échange de matière organique algale. Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne fait état de la voie d'acquisition de la cobalamine par les microalgues haptophytes. Nous tenterons dans ce chapitre d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes :

- Peut-on cultiver *T. lutea* avec des bactéries comme seule source de vitamine B₁₂ ?
- Comment la vitamine B₁₂ produite par des bactéries est-elle transférée à *T. lutea* ?

Dans un premier temps, des cultures avec des bactéries naturellement associées à *T. lutea* ont été réalisées pour tester si ces bactéries pouvaient se substituer à un apport de B₁₂. Ensuite, les collections de bactéries du laboratoire provenant de cultures de microalgues ou de sources hydrothermales ont été criblées afin de sélectionner des bactéries

productrices de vitamine B₁₂. Par la suite, les génomes des bactéries sélectionnées ont été séquencés. Nous avons procédé à l'identification de ces bactéries et avons vérifié la présence d'une voie de biosynthèse de la cobalamine et de gènes codant pour des enzymes B₁₂-dépendantes. Des co-cultures de *T. lutea* avec certaines souches bactériennes ont été réalisées en mode batch et en chimostat limités et carencés en cobalamine pour tester si des interactions directes pouvaient permettre à l'algue d'obtenir la vitamine. L'ajout d'extrait bactérien a été effectué pour vérifier si *T. lutea* pouvait acquérir la cobalamine indirectement après destruction des bactéries, ce qui correspondrait à l'assimilation de lysat cellulaire.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Recherche de bactéries productrices de vitamine B₁₂ dans une communauté bactérienne associée à *T. lutea*

Afin d'identifier de potentielles bactéries productrices de cobalamine, nous avons commencé par repiquer dix cultures xéniques de *T. lutea* disponibles au laboratoire dans un milieu carencé en B₁₂. Ces souches provenaient de collections de microalgues de la *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP) (CCAP 927/14), de la *Culture Collection of Marine Phytoplankton* (CCMP) (CCMP 463) et de la *Roscoff Culture Collection* (RCC) (RCC 179 ; 1344 ; 3691 ; 3692 ; 3693 ; 3699) ainsi que du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (LOV) (OB-LOVC1 ; OB-LOVC4). L'observation d'un léger maintien d'une culture de *T. lutea* aurait signifié que des bactéries productrices de la vitamine étaient associées à la microalgue. Une culture de *T. lutea* (CCAP 927/14) s'est maintenue avec une faible concentration ($2-3 \cdot 10^6$ cell/mL) comparé aux autres (aux alentours de $1,5 \cdot 10^6$ cell/mL). Nous avons donc mis en place des cultures de *T. lutea* en mode batch à différentes conditions de disponibilité en vitamine B₁₂ afin de tenter de quantifier l'apport de vitamine par la communauté bactérienne. Les inoculum axénique et xénique de départ ont été repiqués trois fois à 40 ng/L de B₁₂ avant l'expérience. L'expérience a été mise en place en bouteilles de 1 L à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ avec un éclairage continu de $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et une homogénéisation des cultures assurée par un bullage d'air filtré sur $0,2 \mu\text{m}$. Des témoins axéniques négatifs sans ajout de cobalamine et des témoins axéniques positifs avec 40 ng/L de B₁₂ ont été inoculés à la même concentration initiale, soit

1 10⁶ cell/mL. Les cultures ont été réalisées en triplicats biologiques.

4.2.2 Criblage de souches bactériennes sur la base de leur production de vitamine

Dans la littérature, des études ont montré que les bactéries du genre *Halomonas* et les espèces du clade des *Roseobacter* seraient majoritairement productrices de vitamine B₁₂ (Luo and Moran, 2014 ; Romine et al., 2017). En conséquence, nous avons principalement choisi des bactéries appartenant à ce genre pour le criblage. Le laboratoire PBA dispose d'une collection de bactéries isolées de cultures de microalgues (Le Chevanton et al., 2013). Une souche de *Phaeobacter* sp. 09-029 ainsi que 4 souches de *Halomonas* sp. ont été sélectionnées à partir de cette collection. Le laboratoire Écosystèmes Microbiens et Molécules Marines pour les Biotechnologies (EM3B, IFREMER) possède également une collection de bactéries provenant de sources hydrothermales. Six souches de *Halomonas* sp. ont été obtenues à partir de leur collection.

Une souche de *Halomonas* sp., connue pour produire de la cobalamine et permettre le développement de cultures d'algues dépendantes de la B₁₂ dans des proportions équivalentes à des témoins avec vitamine (Croft et al. (2005), Supplementary Figures S1 et S2) nous a été fournie par Alison Smith, directrice du *Laboratory of Plant Physiology* à Cambridge. Cet échantillon a été renommé souche 19-001. Au total, 12 souches de bactéries ont été criblées.

Les bactéries ont été cultivées en triplicats biologiques dans un milieu de culture enrichi (Marine Broth, BD, Difco™, USA) pendant 24 heures à 28°C et placées sous agitation (180 tours par minute). Le dénombrement des bactéries a été effectué par dilutions successives et étalements sur du milieu Marine Broth avec ajout d'agar (12 g/L). Les culots bactériens ont été récoltés par centrifugation (10 000 g, 10 minutes, 10°C) et les surnageants ont été conservés pour dosage de la cobalamine dissoute. La cobalamine particulaire a été extraite et dosée en utilisant un kit immunologique ELISA, dont le protocole est décrit dans Nef et al. (2019).

Pour la vitamine B₁₂ dissoute (taille 1580 Da), des essais de préconcentration ont été réalisés en utilisant des unités de filtration à 1000 Da (Microsep Advance, Pall Corporation, USA), qui permettent de concentrer les molécules supérieures à cette taille. Un témoin positif de concentration en vitamine connue (40 ng/L) ainsi qu'un échantillon

du milieu de culture bactérien ont été pré-concentrés puis dosés comme précédemment. Nous avons utilisé cette méthode comme un proxy pour estimer si la concentration de B₁₂ dans le milieu extracellulaire des cultures bactériennes était supérieure à celle du milieu de culture. Si cela était le cas, les résultats indiqueraient une excrétion de la vitamine par la bactérie.

Séquençage et identification des bactéries d'intérêt

Une extraction d'ADN a été réalisée pour 4 souches bactériennes produisant toutes de la cobalamine et provenant de cultures de microalgues (souches 09-029, 19-001, 09-027 et 09-003). Le protocole d'extraction est décrit dans l'article en fin de chapitre.

L'étape de séquençage et d'assemblage des génomes bactériens a été réalisée par Simon Dittami et ses collègues à la Station Biologique de Roscoff. Le protocole utilisé est décrit en détail dans le matériel et méthodes de l'article en fin de chapitre. Les génomes ainsi obtenus ont été annotés via la plateforme MicroScope (Vallenet et al., 2017). Nous avons par la suite déposé les génomes sur la plateforme *Magnifying Genomes* (MaGe) développée par le Centre National de Séquençage. La voie de biosynthèse de la cobalamine ainsi que les potentielles autres enzymes B₁₂-dépendantes ont été recherchées pour les bactéries séquencées à l'aide de l'outil KEGG implémenté dans MaGe, qui réalise l'annotation putative des gènes par homologie avec une base de données de génomes procaryotes.

L'alignement des séquences du gène de l'ARNr 16S, obtenues suite au séquençage des bactéries, a été effectué à l'aide de l'outil MUSCLE (mode complet) pour 50 séquences, dont 46 étaient des séquences de référence de la base de données NCBI. Au total 83 % (1299) des positions initiales ont été conservées. L'étape de curation a été réalisée avec l'outil Gblocks, en autorisant les sauts dans les blocs finaux. L'arbre phylogénétique a été construit par maximum de vraisemblance (*maximum likelihood*) avec PhyML avec une valeur de bootstrap de 100.

Mise en place des cultures en mode batch

Co-cultures microalgues-bactéries Des précultures mixtes associant *T. lutea* et des bactéries ont été réalisées et repiquées avant l'expérience afin de laisser les organismes s'équilibrer et s'acclimater à leurs conditions de culture, comme l'ont suggéré les co-cultures de Kazamia et al. (2012). Dix microlitres de cultures bactériennes (une colonie dans 1 mL d'eau de mer autoclavée) des souches 09-029 ou 19-001 (Croft et al., 2005) ont été inoculés

dans des cultures axéniques de *T. lutea* (CCAP 927/14) et repiquées trois fois en présence de 40 ng/L de cobalamine. L'enrichissement de ces précultures a été réalisé avec un milieu de Conway modifié à 40 ng/L de vitamine B₁₂. Il a été fait de même pour des précultures de *T. lutea* axéniques.

L'ensemencement des cultures pour l'expérience a été réalisé en transférant des précultures en phase stationnaire de croissance (après trois semaines) à hauteur de 0,1 10⁶ cell/mL final. Les cultures ont été enrichies soit en Conway modifié sans cobalamine, soit en Conway modifié avec 40 ng/L de B₁₂. Des témoins axéniques négatifs sans ajout de cobalamine et des témoins axéniques positifs avec 40 ng/L de B₁₂ ont été inoculés à la même concentration initiale. Les conditions ont toutes été réalisées en triplicats biologiques

L'expérience de co-culture a été mise en place en bouteilles de 1 L à 27 ± 1°C avec un éclaircissement continu de 150 µmol photons m⁻² s⁻¹. L'homogénéisation des cultures a été assurée par un bullage d'air filtré sur 0,2 µm.

Cultures avec extraits bactériens Une partie des cultures témoin de *T. lutea* carencées en B₁₂ en phase stationnaire ont été reprises en deux lots de trois réplicats biologiques. Chaque triplicat a été inoculé avec des extraits bactériens de deux bactéries différentes : soit de la souche 09-029 soit d'une bactérie produisant peu de cobalamine en témoin négatif (Figure 1 de l'article page 195), la souche 09-729.

Des échantillons de cultures de bactéries âgées de 24 heures ont été récoltés par centrifugation (10 000 g, 10 minutes, 10°C) et les culots cellulaires ont été conservés. Ces culots ont été repris dans 1 mL d'eau osmosée autoclavée et la cobalamine a été extraite par ébullition 15 min à 99°C. Le surnageant, contenant la fraction hydrosoluble, a été séparé des débris après centrifugation (10 000 g, 5 minutes, 10°C). L'équivalent de l'extrait de 100 bactéries/algue pour la souche 09-029 a été ajouté dans chacun des trois réplicats de culture. Cette quantité de bactéries a été choisie car elle correspond dans la littérature au ratio bactérie :algue le plus élevé permettant des interactions mutualistes pour la cobalamine (Cruz-López et al., 2018).

Un extrait provenant des cultures témoin de la souche bactérienne 09-729 a été ajouté dans trois réplicats de cultures de *T. lutea* carencées en B₁₂. La quantité de bactéries 09-729 extraites a été normalisée sur la base d'une même quantité de carbone particulaire (mesuré par un autoanalyseur CHN) que celle de *Phaeobacter* sp. 09-029, soit un équivalent ajouté dans la culture de *T. lutea* de 70 mg/L final.

Suivi des populations Le suivi des populations de microalgues a été réalisé par dénombrement quotidien au Coulter Counter Multisizer III (Beckman Coulter). Les populations de bactéries dans les co-cultures ont été suivies deux fois par semaine par dénombrement au cytomètre en flux avec marquage au SYBR Green (Lonza) à raison d'un marquage à 1 % v :v. Les paramètres du cytomètre en flux incluaient une vitesse de prélèvement des échantillons fixée en mode intermédiaire (medium), une limite de temps à 50 µL prélevés, et un seuil fixé sur le FL-1 (longueur d'onde d'émission du SYBR Green, à 520-530 nm).

Co-culture microalgues-bactéries en mode chémostat

Une co-culture en photobioréacteur en mode chémostat limité en cobalamine a été réalisée au GEPEA (Saint-Nazaire, UMR 6144) dans le but d'étudier les interactions à des conditions physiologiques différentes. La bactérie *Phaeobacter* sp. 09-029 a été sélectionnée pour cette expérience du fait de son contenu élevé en vitamine B₁₂ (voir la section suivante).

Une culture axénique de *T. lutea* limitée en B₁₂ (40 ng/L) en phase stationnaire de croissance a été inoculée dans un photobioréacteur de 2 L à une concentration initiale de $0,5 \cdot 10^6$ cell mL⁻¹. Les conditions de cultures étaient identiques à celles réalisées dans le chapitre 2 : soit un départ en batch avec un milieu enrichi en Conway limité en B₁₂ (40 ng/L final), une régulation pH à 8,2, une température de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ et un éclaircissement continu à $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Douze jours après inoculation, à la fin de la phase de ralentissement de croissance, un taux de dilution de $0,5 \text{ j}^{-1}$ a été appliqué au système afin de passer en mode chémostat.

Les bactéries ont été précultivées dans du Marine Broth aux mêmes conditions que précédemment. La culture en fin de croissance a été récoltée par centrifugation 10 minutes à 6000 rpm à 10°C. Le culot a été remis en suspension dans de l'eau de mer stérile enrichie en Conway sans B₁₂ puis centrifugé pour éliminer toute trace du milieu de culture bactérien. Le rinçage a été effectué sept fois. Les bactéries ont été inoculées après atteinte de l'équilibre en limitation de B₁₂, 19 jours après ensemencement des cultures de *T. lutea*. Un volume final de 75 mL de culture bactérienne (environ 50 bactéries par algue) a été transféré dans le photobioréacteur contenant la culture de *T. lutea*. Le milieu d'enrichissement a été remplacé par un milieu carencé en B₁₂ après atteinte d'un équilibre. La dilution du système a été stoppée au jour 37 pour étudier la co-culture en batch. Le dénombrement des microalgues a été réalisé par comptage sur lame de Malassez après fixation au lugol

et celui des bactéries a été effectué en cellule de Thoma.

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Co-culture avec une communauté bactérienne

La Figure 4.1 représente l'évolution des cultures aux différentes conditions d'enrichissement en cobalamine. La culture de *T. lutea* xénique avec ajout de cobalamine n'a pas montré de différence significative de taux de croissance maximal ($p = 0,89$; test de Student bilatéral) ou de variation maximale de biomasse ($p = 0,058$) avec la culture témoin axénique avec ajout vitaminique (Table 4.1), indiquant que la communauté bactérienne n'a ni d'effet négatif ni positif sur l'algue en présence de cobalamine. En absence de B₁₂, les cultures xéniques ont montré une différence significative de variation maximale de biomasse ($p = 7 \cdot 10^{-4}$) mais pas de différence de taux de croissance maximal ($p = 0,36$). La communauté bactérienne associée à *T. lutea* cultivée en carence en B₁₂ a donc permis à la microalgue d'atteindre une concentration cellulaire 6 fois supérieure à celle des témoins axéniques sans la vitamine.

TABLE 4.1 – Paramètres des cultures de *T. lutea* avec un consortium bactérien avec et sans cobalamine.

Condition de culture	μ_{max} (j ⁻¹)	ΔC_{max} (10 ⁶ cell/mL)
Axénique - B ₁₂	0,43 ± 0,26	0,69 ± 0,07
Axénique + B ₁₂	1,19 ± 0,12	24,86 ± 2,16
Xénique - B ₁₂	0,63 ± 0,21	4,54 ± 0,72
Xénique + B ₁₂	1,22 ± 0,34	21,37 ± 0,75

En revanche, les bactéries n'ont pas permis à *T. lutea* de se développer autant que les témoins avec ajout de cobalamine. En effet, les témoins positifs ont présenté une variation maximale de biomasse 5 fois supérieure à celle des co-cultures sans B₁₂. À partir de ces

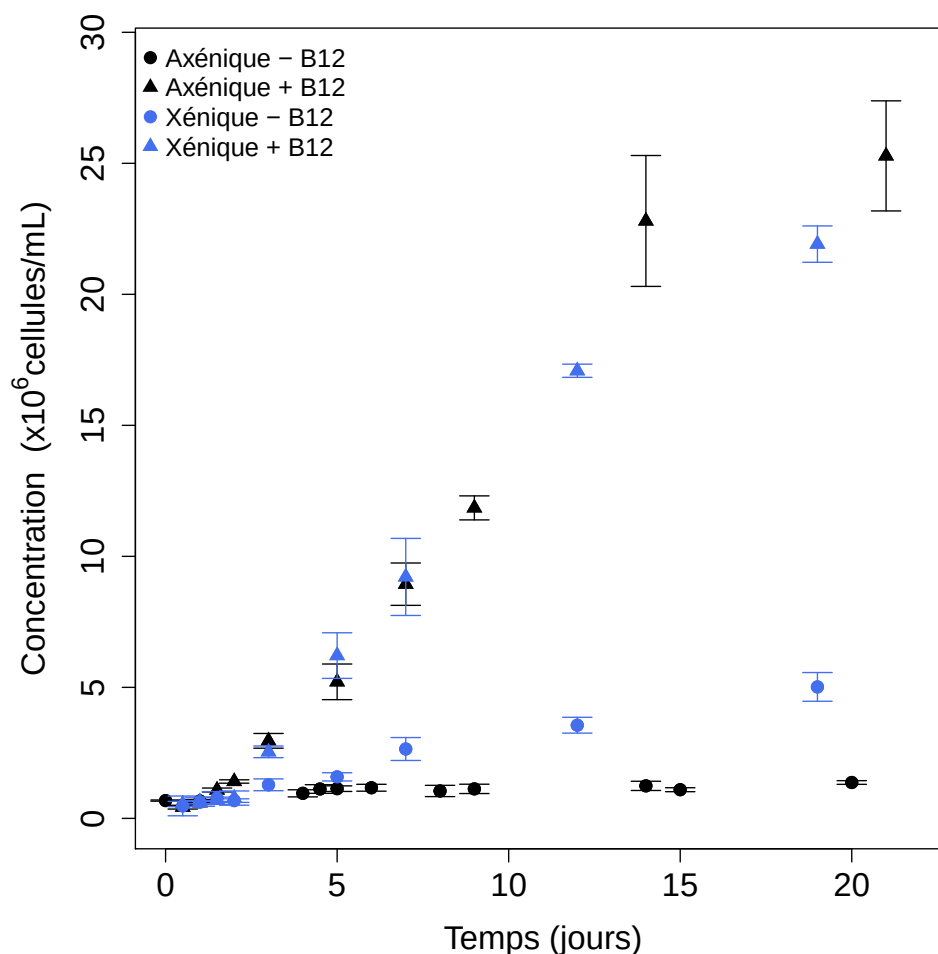


FIGURE 4.1 – Évolution de cultures de *T. lutea* avec une communauté bactérienne associée en fonction du temps, à différents niveaux de disponibilité de vitamine B₁₂.

résultats, et en tenant compte de la biomasse microalgale qui s'est développée en consommant la B₁₂ de l'eau de mer naturelle, nous pouvons estimer que les bactéries ont apporté environ 7 ng/L de B₁₂ à *T. lutea*. Nous avons par la suite réalisé des étalements sur Marine Agar afin de récupérer les bactéries cultivables, qui ont été conservées en stock glycérol 20 % à -80°C. Des analyses sont en cours afin d'identifier les espèces composant la communauté bactérienne et pouvant être à l'origine du développement de la microalgue.

Dans la littérature, plusieurs travaux ont mis en évidence un phénomène de "division du travail" entre les microorganismes pour l'accès aux cofacteurs (Helliwell et al., 2016 ; Romine et al., 2017 ; Gómez-Consarnau et al., 2018). Il est donc probable que la communauté bactérienne associée à *T. lutea* soit composée d'espèces qui ne produisent pas toutes de la vitamine, mais dont les interactions permettent au final à *T. lutea* d'acquérir une certaine quantité du cofacteur.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'interactions, nous avons choisi de ré-

duire la complexité du système en réalisant des cultures mixtes bispécifiques de *T. lutea* avec des bactéries. Nous souhaitons également tester si une culture simplifiée pouvait permettre à *T. lutea* d'atteindre une concentration cellulaire supérieure à celle obtenue avec une communauté bactérienne. Les souches bactériennes ont été sélectionnées sur la base des données de la littérature.

4.3.2 Sélection et caractérisation de souches bactériennes productrices de B₁₂

Nous avons recherché des bactéries marines productrices de vitamine B₁₂ à partir de collections bactériennes IFREMER regroupant des bactéries issues de cultures de microalgues ou de sources hydrothermales. Les bactéries du genre *Halomonas* ou du clade *Roseobacter* ont été préférentiellement choisies. Douze souches bactériennes ont finalement été sélectionnées et leur production de vitamine B₁₂ a été mesurée dans les fractions particulaire et extracellulaire pour identifier si elles accumulaient et/ou excrétaient la vitamine en absence des algues. Toutes les bactéries analysées sauf deux produisent de la cobalamine (Figure 1 de l'article page 195), exclusivement en intracellulaire, et ce indépendamment de leur provenance (cultures de microalgues ou sources hydrothermales). Les souches produisant le plus de vitamine à nos conditions de culture ont été isolées de cultures de microalgues. Ceci est un argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle les bactéries associées aux microalgues peuvent synthétiser des facteurs de croissance organiques, potentiellement utilisables par les algues. Nous pouvons aussi noter que certaines souches de *Halomonas* sp. semblent ne pas produire de cobalamine. Les travaux de [Romine et al. \(2017\)](#) ont montré que des *Halomonas* sp. provenant de communautés bactériennes naturelles n'avaient pas de riboswitch leur permettant de contrôler la biosynthèse de B₁₂. Ainsi, nous pouvons supposer qu'il est peu probable que l'absence de production de vitamine observée pour certaines souches de *Halomonas* sp. testées soit due à un effet des conditions de culture. Le résultat du criblage a montré que neuf souches de *Halomonas* sp. sur les onze testées, soit 82 % de notre échantillon, peuvent synthétiser de la vitamine B₁₂. Ceci indique, en accord avec la littérature, que la capacité de production de cette vitamine est très répandue chez les bactéries du genre *Halomonas*.

Les deux souches bactériennes produisant la plus forte quantité de B₁₂, la *Phaeobacter* sp. 09-029 et la *Halomonas* sp. 19-001 de [Croft et al. \(2005\)](#), ont été sélectionnées pour la

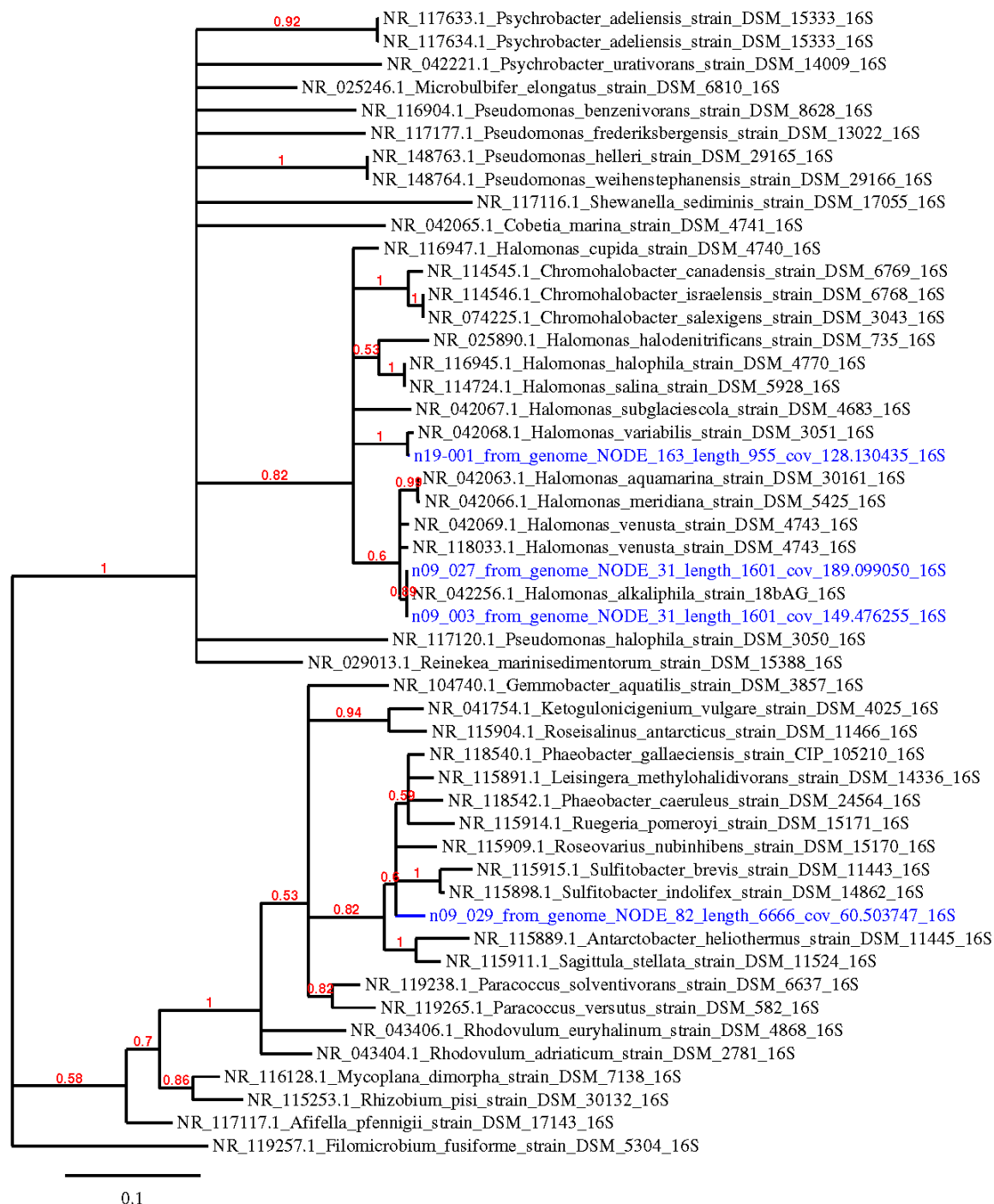


FIGURE 4.2 – Arbre phylogénétique des bactéries séquencées basé sur le gène de l'ARNr 16S avec des souches de référence. L'arbre a été réalisé par maximum de vraisemblance. Les valeurs de bootstrap sont indiquées aux nœuds et les valeurs supérieures à 50 % sont affichées. Les bactéries séquencées dans nos travaux sont présentées en bleu.

suite des expériences. Deux autres souches de *Halomonas* sp. (09-003 et 09-027) provenant de cultures de microalgues et produisant de la cobalamine ont également été sélectionnées pour séquençage. Le séquençage de ces souches puis les analyses à partir du gène de l'ARNr 16S ont permis de confirmer et d'affiner les résultats d'identification précédents. La souche 09-029 a été identifiée comme appartenant à l'espèce *Phaeobacter porticola* (classe des Alpha-protéobactéries, famille des *Rhodobacteraceae*) et la souche 19-001 appartenant au genre *Halomonas* sp., proche de *Halomonas alkaliphila* (classe des Gamma-protéobactéries, famille des *Halomonadaceae*). Les souches 09-003 et 09-027 ont été identifiées comme des *Halomonas alkaliphila*. L'arbre phylogénétique issu de l'alignement des séquences du gène de l'ARNr 16S a permis de rassembler la souche de *P. porticola* avec les autres bactéries de la famille des *Rhodobacteraceae* et de grouper *Halomonas* spp. avec les autres membre de la famille des *Halomonadaceae* (Figure 4.2).

Nous avons ensuite réalisé un alignement des séquences des gènes l'ARNr 16S des 4 bactéries avec des souches de référence appartenant uniquement aux genres *Phaeobacter* et *Halomonas* afin d'identifier si les souches étudiées semblaient représentatives de leur genre ou bien plutôt éloignées des autres espèces (Figure 4.3). Là encore, la souche de *P. porticola* a bien été groupée de façon robuste au même niveau que les deux autres souches de référence de ce genre, indiquant que les espèces sont relativement proches. Les deux souches de *Halomonas alkaliphila* ont été rassemblées en un groupe monophylétique. La souche *Halomonas* sp. 19-001 a été identifiée dans un groupe monophylétique à part, dans le même clade que *H. aquamarina* et *H. meridiana*, même si ce clade est assez faiblement supporté (50 %) par l'analyse.

Nous avons par la suite identifié la voie aérobie de biosynthèse de la vitamine B₁₂ chez les quatre souches séquencées (Figures 4.4, 4.5). Les quatre souches de *Halomonas* possèdent la totalité des gènes de la voie de biosynthèse identifiés par homologie, et 19 gènes ont été identifiés pour la souche de *P. porticola*. En particulier, chaque souche possède les trois gènes qui forment le complexe *cobNST*, un cortège de gènes considéré comme critique pour la synthèse de B₁₂ (Figure 4.4 A et B) (Luo and Moran, 2014).

Afin de mieux comprendre les besoins métaboliques en cobalamine de ces souches, les isoformes de méthionine synthase encodées par les quatre bactéries ainsi que d'autres protéines cobalamine-dépendantes ont été recherchées. Les quatre souches encodent le gène de la *metH*, et les génomes des *Halomonas* encodent de plus le gène *metE* de l'isoforme B₁₂-indépendante. Aussi, toutes les bactéries possèdent des ribonucléotides rédu-

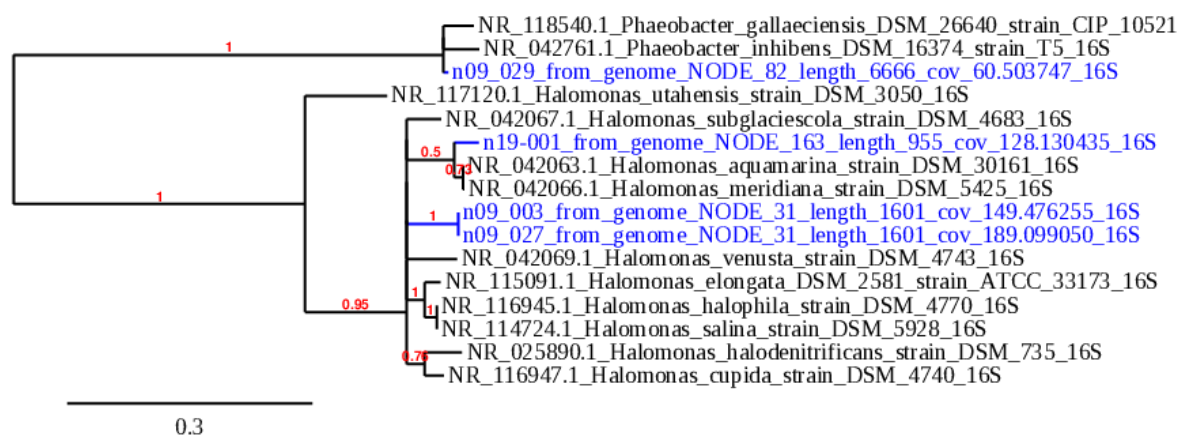


FIGURE 4.3 – Arbre phylogénétique des bactéries séquencées basé sur le gène de l'ARNr 16S avec des souches de références des mêmes genres taxonomique. L'arbre a été réalisé par maximum de vraisemblance. Les valeurs de bootstrap sont indiquées aux nœuds et les valeurs supérieures à 50 % sont affichées. Les bactéries séquencées dans nos travaux sont présentées en bleu.

tases B₁₂-dépendantes et aucune isoforme B₁₂-indépendante n'a été identifiée. Enfin, les quatre souches encodent des perméases de type BtuC, des protéines permettant d'importer la B₁₂ dans la cellule chez *E. coli* (De Veaux et al., 1986). La Figure 4.6 présente l'arbre phylogénétique pour la perméase des 4 bactéries par rapport à celles identifiées chez *E. coli*.

Ces résultats suggèrent tout d'abord que les *Halomonas* spp. étudiées semblent disposer du même équipement enzymatique lié à l'acquisition et à l'utilisation de la vitamine B₁₂. Nous avons vu en introduction que les procaryotes peuvent encoder une grande diversité d'enzymes cobalamine-dépendantes mais que la cause principale de dépendance à cette vitamine chez les microorganismes marins est la présence du gène *metH* et l'absence du gène *metE* (Sañudo-Wilhelmy et al., 2014). Ainsi, les résultats concernant les gènes de méthionine synthases encodés par les souches bactériennes étudiées suggèrent que *P. porticola*, contrairement aux souches de *Halomonas*, dépend obligatoirement de la cobalamine pour sa croissance, ce qui pourrait donner lieu à une plus faible excrétion de la vitamine par la bactérie, réduisant la quantité de vitamine excrétée potentiellement disponible pour des microalgues. Enfin, les quatre bactéries semblent pouvoir acquérir la vitamine B₁₂ à partir du milieu extracellulaire. Nous pouvons supposer que l'assimilation de cobalamine externe pourrait permettre aux bactéries de s'affranchir ponctuellement de la synthèse du cofacteur, qui est coûteuse, par exemple dans les cas de lyse ou du relargage de vitamine par certains organismes de la communauté microbienne.

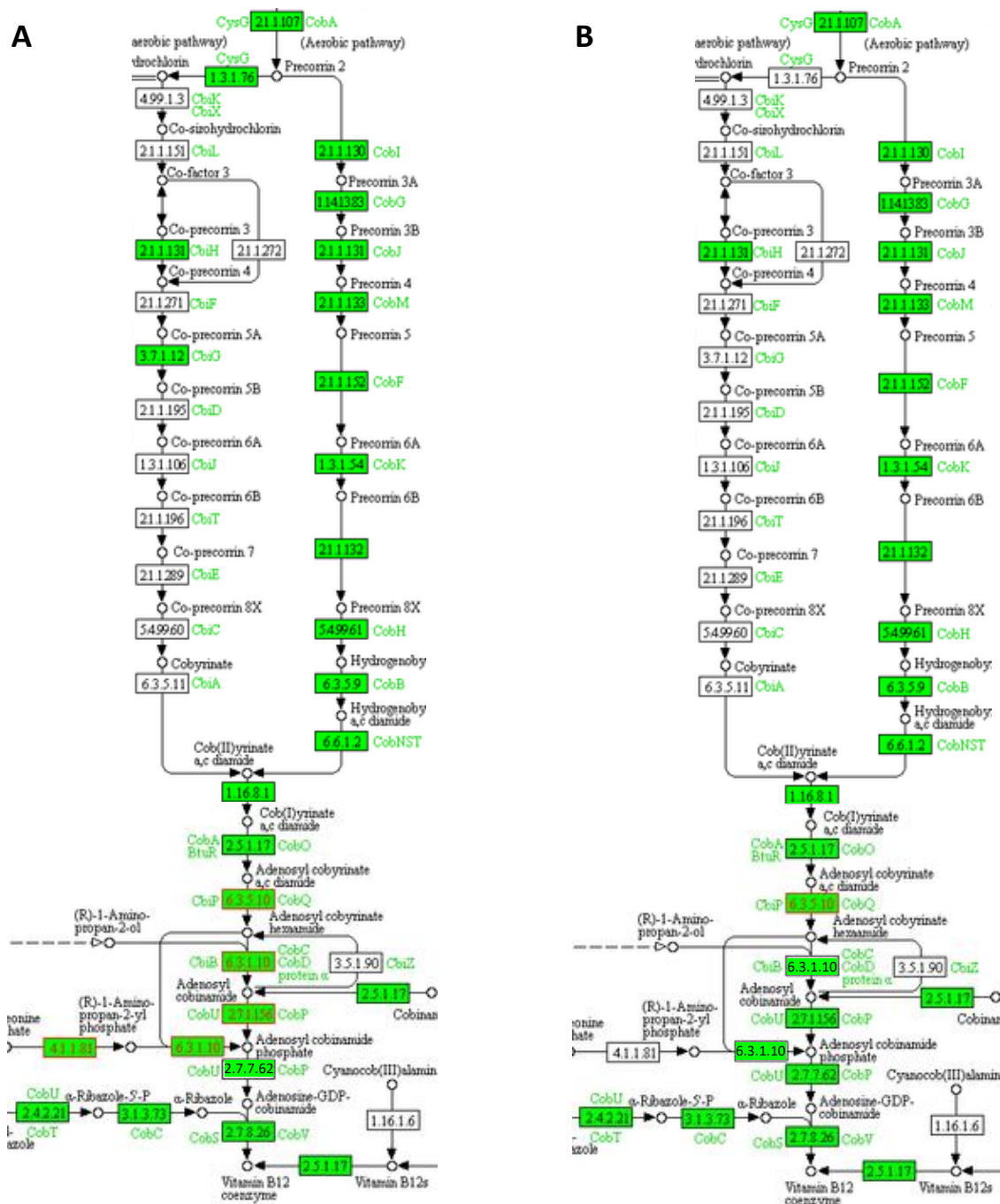
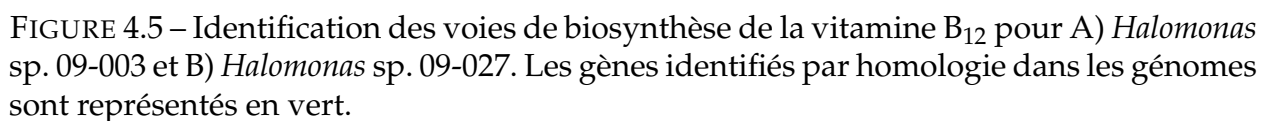


FIGURE 4.4 – Identification des voies de biosynthèse de la vitamine B₁₂ pour A) *P. porticola* et B) *Halomonas* sp. 19-001. Les gènes identifiés par homologie dans les génomes sont représentés en vert.



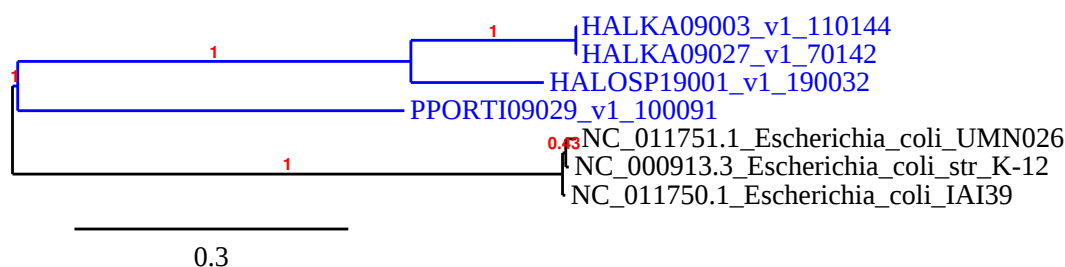


FIGURE 4.6 – Arbre phylogénétique des bactéries séquencées basé sur le gène encodant une perméase BtuC permettant l'import de vitamine B₁₂ avec les séquences de référence décrites chez *E. coli*. L'arbre a été réalisé par maximum de vraisemblance (85 % des positions conservées soit 994). Les valeurs de bootstrap sont indiquées aux nœuds. Les bactéries séquencées dans nos travaux sont présentées en bleu.

Pour la suite de l'étude, nous avons choisi de sélectionner les souches de bactéries séquencées les plus productrices de vitamine B₁₂ : *P. porticola* 09-029 et *Halomonas* sp. 19-001. Choisir des genres bactériens différents pour les expériences en co-cultures permettra d'identifier si les interactions de *T. lutea* avec des bactéries productrices de B₁₂ varient en fonction des groupes taxonomiques bactériens.

4.3.3 Caractérisation des modes d'acquisition de la vitamine B₁₂ par des co-cultures

Des cultures mixtes de *T. lutea* avec différentes bactéries sélectionnées sur leur critère de productivité en vitamine ont été mises en place afin de vérifier si les bactéries vivantes pouvaient soutenir la croissance de l'algue en condition de carence en cobalamine. Des cultures mixtes limitée en B₁₂ (40 ng/L d'enrichissement) ont également été établies pour identifier si les bactéries avaient un effet négatif sur la croissance de l'algue en présence de la vitamine. Ces cultures enrichies devenant également carencées en B₁₂ lors de l'atteinte de la phase stationnaire, un potentiel effet positif des bactéries aurait pu être observé.

La concentration microalgale obtenue en co-culture avec enrichissement vitaminique était équivalent à celle des témoins avec ajout de B₁₂ (Figure 3 de l'article page 197). Premièrement, ceci indique que l'ajout de ces bactéries n'a pas constitué un apport vitaminique supplémentaire, indiquant une absence d'excrétion de B₁₂. Deuxièmement, ces résultats montrent que les bactéries n'ont pas d'effet négatif sur *T. lutea* en présence de cobalamine, que cela soit par compétition pour l'accès à la ressource vitaminique ou par interaction directe (allélopathie). L'ajout de bactéries dans des cultures de *T. lutea* carencées en B₁₂ dès inoculation n'a pas permis d'obtenir une différence significative de biomasse

maximale, il semblerait donc qu'aucune des bactéries testées n'excrète de vitamine B₁₂ dans le milieu de culture en absence d'une source externe de cobalamine. Nous avons pu noter qu'une croissance des bactéries a bien été observée, indiquant que ces dernières ont assimilé de la matière organique microalgale. Les ratios bactéries :algues estimés dans nos co-cultures étaient de l'ordre de 1 :1 à 10 :1 (Table 1 de l'article page 198) et étaient équivalents à ceux décrits dans la littérature pour des co-cultures présentant des interactions mutualistes pour la B₁₂ (de 1 :1 à 100 :1) (Kazamia et al., 2012 ; Cruz-López et al., 2018 ; Cooper et al., 2019). Les ratios obtenus étaient donc en théorie suffisants pour permettre à *T. lutea* d'acquérir de la cobalamine.

Nos résultats de co-cultures sont en contradiction avec les observations que l'ajout de *Halomonas* sp. 19-001 permettait de lever la carence en cobalamine lors de cultures mixtes avec la Rhodophyte *Porphyridium purpureum* et avec le Dinoflagellé *Amphidinium operculatum*, indiquant que la bactérie représente une réelle source de vitamine pour certaines microalgues auxotrophes pour la B₁₂ (Croft et al., 2005). De la même manière, pour les membres du clade des *Roseobacter*, auquel *P. porticola* appartient, des interactions mutualistes pour les vitamines du groupe B, dont la cobalamine, ont été caractérisées dans les travaux de Cruz-López et al. (2018) et Cooper et al. (2019).

Les travaux décrivant des interactions microalgues-bactéries mutualistes pour la vitamine B₁₂ ont noté la consommation de composés organiques issus des microalgues par les bactéries, soit des vitamines du groupe B telles que la B₃, la B₇ et la B₉ (Cruz-López et al., 2018 ; Cooper et al., 2019), des acides aminés (Kazamia et al., 2012 ; Helliwell et al., 2018), des composés soufrés (Durham et al., 2015) ou un complexe de carbone organique dissous (Croft et al., 2005). L'étude de Cruz-López et al. (2018) a reporté l'attachement de bactéries aux microalgues. Cet attachement pourrait permettre aux bactéries de délivrer ponctuellement de la cobalamine aux cellules microalgales, peut-être en réponse à l'excrétion localisée de matière organique par les algues. Au cours de nos observations microscopiques en épifluorescence avec marquage au SYBR Green, nous n'avons jamais remarqué de bactéries attachées aux cellules de *T. lutea*, indiquant qu'il n'y a pas d'interaction physique au niveau de la phycosphère de *T. lutea* avec les bactéries testées. *T. lutea* est une microalgue haptophyte qui ne synthétise pas de coccolithes. Il est possible que les bactéries n'aient pas pu se fixer aux cellules de l'algue du fait d'un manque de capacité d'adhésion à sa structure.

Nous devons préciser que seule l'étude complémentaire menée par Grant et al. (2014)

sur les interactions entre *Mesorhizobium loti* et *Lobomonas rostrata* décrites par [Kazamia et al. \(2012\)](#) a pu démontrer qu'un échange direct de vitamine avait lieu entre les deux microorganismes. Les autres études sur ce sujet n'ont pas directement suivi les flux de vitamine B₁₂ de la cellule bactérienne à la cellule algale. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la cobalamine pourrait être assimilée par les microalgues par d'autres voies, comme par exemple la phagotrophie des bactéries. En effet, lors de cultures de la microalgue haptophyte *Isochrysis galbana* (Isochrysidaceae) carencées en vitamines B₁, B₇ et B₁₂, [Anderson et al. \(2018\)](#) ont observé une ingestion de bactéries par l'algue, où jusqu'à 37 % de la population microalgale montrait un comportement phagotrophe, leur permettant de se maintenir. Nous n'avons pas dans notre étude noté, lors d'observations en microscopie en épifluorescence avec marquage, de bactéries à l'intérieur des cellules microalgales, suggérant que *T. lutea* ne réalise pas la phagotrophie de ces bactéries. Un phénomène de sélectivité des bactéries par les microalgues bactérivores, telles que la Chlorophyte *Micromonas* spp. et l'Haptophyte *Isochrysis galbana*, a déjà été observé en condition de carence en cobalamine ([Anderson et al., 2018](#)). Au vu de nos résultats, il est possible que les bactéries testées ne pouvaient pas être ingérées par *T. lutea* soit du fait de la sélectivité des proies, soit parce que *T. lutea* ne disposerait pas de l'équipement génétique nécessaire pour réaliser la phagotrophie de bactéries. La raison pour laquelle nous n'avons pas observé de bactérivorie dans nos conditions mérite un examen approfondi. Des cultures carencées en B₁₂ de différentes Haptophytes auxotrophes pour cette vitamine, et provenant de taxons variés, avec des bactéries ayant subi un marquage fluorescent permettrait de tester l'hypothèse de la bactérivorie comme source de vitamine.

Notre questionnement de départ visait à comprendre si la vitamine B₁₂ était délivrée aux microalgues suite à une excrétion dans le milieu extracellulaire ou bien après un phénomène de lyse, libérant la vitamine intracellulaire. La lyse bactérienne permet aux microalgues d'accéder à des éléments nutritifs. Cela a par exemple été montré lors des travaux de [Shelford and Suttle \(2018\)](#) où la lyse de bactéries du genre *Vibrio* par des virus permettait à des microalgues d'accéder à la ressource azotée issue de la matière particulaire bactérienne. Ainsi, durant notre expérience, les co-cultures ont été maintenues pendant près de 50 jours afin de vérifier si en phase stationnaire tardive de *T. lutea* une lyse bactérienne massive était observée et pouvait permettre à l'algue d'obtenir de la cobalamine. Nous n'avons pas noté de phénomène de lyse important pour les bactéries associées, ni pour *T. lutea*. Il ne semble donc pas y avoir eu de signal chimique lytique

émis par des cultures sénescents de *T. lutea* ou de lyse due à des virus et conduisant à la destruction des bactéries lors de nos expériences.

En intégrant toutes ces informations, nous pouvons donc statuer que les interactions spécifiquement centrées sur la vitamine B₁₂ entre *T. lutea* et des bactéries appartenant à des genres bactériens différents, pourtant producteurs de B₁₂, étaient favorables uniquement pour les bactéries hétérotrophes, qui se sont développées en assimilant la matière organique de la microalgue.

Nous avons par la suite testé si un ajout d'extrait de bactéries comme proxy d'un apport de lysat cellulaire, pouvait être assimilé par *T. lutea* et permettre de lever la carence en vitamine B₁₂. L'ajout d'extrait bactérien provenant de *P. porticola* contenant une concentration élevée de B₁₂ (69.96 ± 5.23 ng/L final) à des cultures de *T. lutea* carencées en B₁₂ a été suivi d'une augmentation de la biomasse, indiquant une levée de la carence en vitamine B₁₂ (Figure 4 de l'article page 199). Les cultures de *T. lutea* avec extrait du témoin négatif, la souche *Halomonas* sp. 09-729, ont montré un léger développement, qui s'explique par une faible quantité de B₁₂ présente dans l'extrait (4.01 ± 1.41 ng/L final). D'après nos résultats de criblage, cette bactérie ne produit pas ou très peu, de cobalamine (Figure 1 de l'article page 195). Il est très probable que la cobalamine dosée dans l'extrait de la souche 09-729 provienne du milieu de culture bactérien, riche en cobalamine, et non pas d'une réelle capacité de biosynthèse. Ces résultats prouvent donc que *T. lutea* est capable de récupérer et d'assimiler la vitamine B₁₂ provenant d'extraits bactériens lors d'une carence en ce cofacteur. Dans le milieu naturel, la vitamine B₁₂ bactérienne pourrait être assimilée par *T. lutea* suite à des phénomènes localisés de lyse de bactéries et/ou de microalgues ayant un quota en vitamine B₁₂ supérieur à celui de *T. lutea*. Comme expliqué précédemment, nous n'avons à aucun moment observé de lyse bactérienne élevée, malgré des cultures de *T. lutea* sénescents. Il semble donc peu probable que *T. lutea* émette des signaux pouvant induire la lyse cellulaire bactérienne en absence de B₁₂, ou du moins aucun affectant les souches bactériennes testées.

4.3.4 Co-culture en chémostat avec *P. porticola*

Afin de mieux comprendre les modalités d'acquisition de la cobalamine par *T. lutea* dans des conditions environnementales différentes, des co-cultures de *T. lutea* et de *P. porticola*, la bactérie présentant la plus grande production de B₁₂, ont été réalisées en mode continu en chémostat au GEPEA.

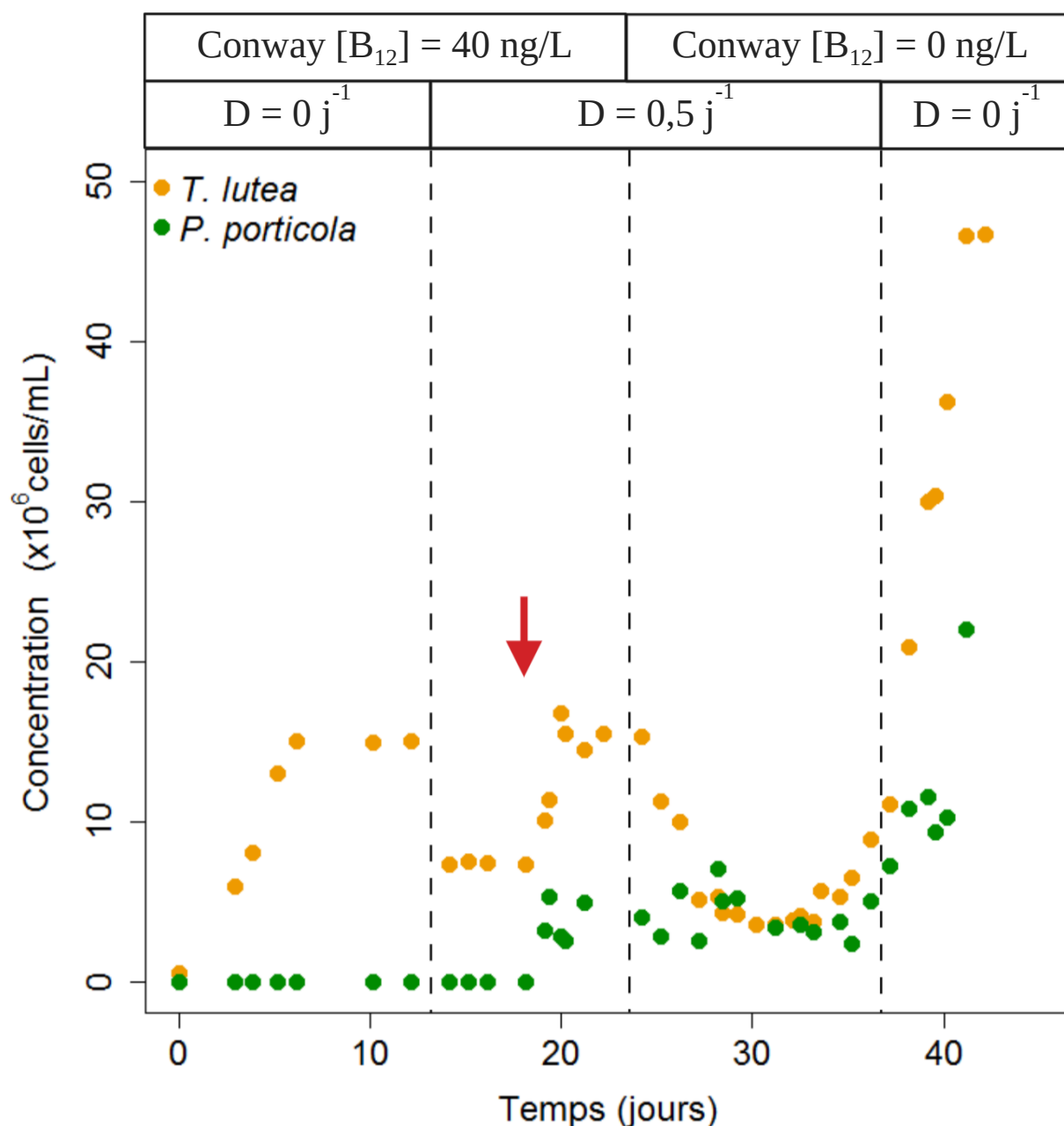


FIGURE 4.7 – Co-culture de *T. lutea* avec *P. porticola* en mode chimostat limité en vitamine B₁₂. L'évolution de la biomasse algale est représentée en orange, et celle de la biomasse bactérienne en vert. La flèche rouge symbolise l'inoculation des bactéries dans le photobioréacteur.

Le photobioréacteur a été ensemencé et maintenu en batch avec un enrichissement de B₁₂ de 40 ng/L (Figure 4.7). Un taux de dilution de 0,5 j⁻¹ a été appliqué suite au ralentissement du développement de la culture. Après atteinte d'un équilibre à 8 10⁶ cell mL⁻¹, les bactéries ont été ajoutées au photobioréacteur, donnant lieu à une augmentation de biomasse algale suivie d'une stabilisation à 15 10⁶ cell mL⁻¹, indiquant une levée du niveau de limitation (Figure 4.7). Selon nos estimations, les bactéries auraient donc apporté

l'équivalent d'environ 35 ng/L de cobalamine à la microalgue soit $7 \cdot 10^{-18}$ g B₁₂/bactérie.

Le passage à un milieu de culture carencé en cobalamine a été suivi d'une diminution de la biomasse algale qui s'est stabilisée à $3,5\text{-}4 \cdot 10^6$ cell mL⁻¹ (Figure 4.7). Ceci signifie que la production de cobalamine par les bactéries lors d'une carence en ce cofacteur est d'environ 10 ng/L, soit 3,5 fois inférieure à ce que nous avons estimé lors de l'atteinte de la phase d'équilibre limité en B₁₂. Aussi, nous pouvons noter une légère augmentation de biomasse juste avant l'arrêt de l'alimentation du chémostat, suggérant que la culture n'avait pas atteint un état d'équilibre. Nous ne pouvons donc pas statuer avec certitude sur l'apport potentiel de vitamine B₁₂ par *P. porticola* lors d'une carence en ce cofacteur.

En parallèle, la population bactérienne s'est maintenue à des concentrations similaires à celle de *T. lutea*, et des amas bactériens ont été observés dans les cultures (Figure 4.8). Comme le milieu de culture ne contient pas de matière organique hormis la vitamine B₁, *P. porticola* s'est développée en assimilant de la matière organique algale. Ceci suggère que des particules de matière organique, issues potentiellement de l'excrétion algale ou de la lyse cellulaire, sont utilisées comme substrat par les bactéries. La raison de la présence de ces amas reste à éclaircir et pourrait peut-être constituer un élément de réponse expliquant le maintien de *T. lutea*.

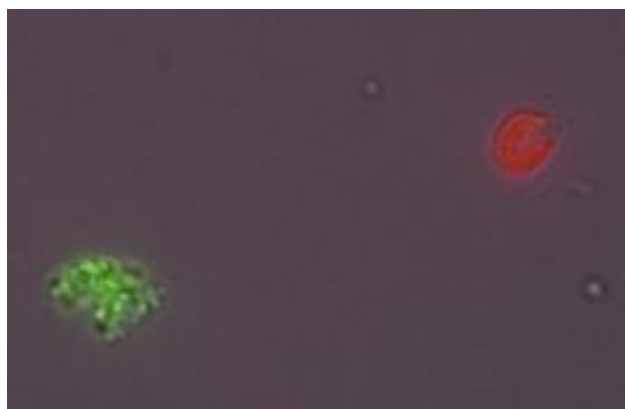


FIGURE 4.8 – Photographie en microscopie photonique d'amas de la bactérie *P. porticola* en co-culture de *T. lutea* avec en mode chémostat limité en vitamine B₁₂. Les bactéries marquées en SYBR Green apparaissent en vert, la cellule de *T. lutea* apparaît en rouge du fait de l'autofluorescence de la chlorophylle.

La culture en photobioréacteur a permis de co-cultiver les deux espèces en continu à différents taux de dilution et à différents niveaux d'apport de vitamine B₁₂. Ces résultats suggèrent que la culture de *T. lutea* avec *P. porticola* comme seule source de vitamine B₁₂ est potentiellement possible, mais les concentrations obtenues en mode continu sont faibles pour une production à l'échelle industrielle. L'observation d'un apport de B₁₂ provenant

de *P. porticola* en chémostat est contradictoire avec les résultats obtenus lors de cultures en mode batch carencées en vitamine B₁₂, cependant les deux modes de culture imposent des conditions abiotiques différentes aux microorganismes. Une culture continue témoin axénique carencée en vitamine B₁₂ est nécessaire pour vérifier que la cobalamine présente dans l'eau de mer n'est pas responsable du maintien de *T. lutea*. Le séquençage du gène de l'ARNr 16S de la bactérie présente dans le photobioréacteur devrait également être effectué afin d'être certains que la souche bactérienne est bien identique à celle inoculée au départ. L'expérience devrait donc être recommencée en incluant plus de réplicats de culture et des contrôles afin de valider les résultats biologiques.

Dans la littérature, les interactions entre l'Haptophyte *E. huxleyi* (Noelaerhabdaceae) et des bactéries du genre *Phaeobacter* sont plutôt amensalistes voire ont trait au parasitisme. C'est par exemple le cas en co-culture avec *Phaeobacter inhibens*, dans laquelle la bactérie est attachée aux cellules algales et favorise sa croissance jusqu'à un certain point, par rapport à des cultures axéniques, puis conduit à la lyse de la microalgue (Segev et al., 2016). Pour les co-cultures avec *Phaeobacter gallaeciensis*, Seyedsayamdost et al. (2011b) ont reporté que la bactérie produisait de l'acide phénylacétique favorisant la croissance algale, en retour du DMSP excrété par l'algue. Puis, lors de la sénescence des cultures de l'algue, cette dernière excréta de l'acide p-coumarique consommé par la bactérie et incorporé dans des molécules bactériennes algicides (Seyedsayamdost et al., 2011a). Avec *P. porticola*, *P. inhibens* et *P. gallaeciensis* forment les trois espèces constituant le genre *Phaeobacter* (Ruiz-Ponte et al., 1998 ; Martens et al., 2006 ; Breider et al., 2017). Nos résultats en mode chémostat seraient les premiers décrivant une co-culture d'une Haptophyte avec une espèce du genre *Phaeobacter* qui ne conduit pas à la lyse de la microalgue. Peut-être que *P. porticola* ne synthétise pas de composés algicides, contrairement aux autres espèces du genre, ou bien que ces composés n'affectent pas *T. lutea*, qui appartient à une famille d'Haptophytes différente (Isochrysidaceae) de celle d'*E. huxleyi*.

4.4 Conclusion

Ces travaux avaient d'une part pour but d'estimer si des bactéries pouvaient remplacer l'ajout de vitamine B₁₂ dans des cultures de *T. lutea*. D'autres part, nous avons tenté de comprendre comment la cobalamine est transférée à la microalgue. La Figure 4.9 présente le bilan du chapitre pour *T. lutea*. La culture avec une communauté bactérienne a permis d'apporter une petite quantité de vitamine B₁₂ à *T. lutea*, mais de façon insuffisante pour obtenir une biomasse élevée. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de statuer sur la composition de cette communauté et l'évolution des concentrations bactériennes en fonction du temps. Nous ignorons cependant si la microalgue a obtenu le cofacteur suite à la lyse/phagotrophie de bactéries ou bien après excrétion par les bactéries.

L'ajout de bactéries sélectionnées sur la base de leur production de B₁₂ s'est avéré insuffisant en batch pour permettre la croissance de *T. lutea* en absence d'un apport externe de la vitamine, ce qui indique que les conditions requises pour la mise en place d'une relation mutualiste entre les microorganismes n'étaient pas atteintes. Une première expérience en chimostat semble montrer un apport possible de B₁₂ par *P. porticola*, ce résultat devant toutefois être confirmé par des expériences complémentaires. Nous n'avons pas non plus observé de mortalité élevée des populations bactériennes ou microalgales, démontrant qu'il n'y avait pas d'effet négatif de l'une sur l'autre, même en condition de carence prolongée en vitamine B₁₂. Au vu de ces différents résultats, il semble donc difficile d'imaginer cultiver *T. lutea* avec des bactéries comme seule source de cobalamine pour des applications à grande échelle. Nos résultats sont contradictoires avec ceux obtenus par Croft et al. (2005) lors de co-cultures de la souche de *Halomonas* sp. 19-001 avec des microalgues auxotrophes pour la B₁₂, et démontrent que les interactions pour ce cofacteur peuvent être espèces-spécifiques.

L'ensemble de ces résultats nous amène à supposer l'existence de composés organiques excrétés par certaines algues et favorisant soit l'excrétion de vitamine B₁₂ soit la lyse bactérienne de certaines bactéries sensibles aux signaux. La Figure 4.10 présente des propositions d'hypothèses expliquant le mécanisme d'acquisition de la vitamine B₁₂ par les Haptophytes. Il est probable que *T. lutea* n'excrète pas de composé organique de ce type ou bien que les bactéries testées n'y étaient pas sensibles. Une autre explication pourrait être que l'attachement des bactéries aux cellules de *T. lutea* serait nécessaire pour

conduire à une excrétion localisée de la vitamine dans la phycosphère. L'absence d'attachement observée pourrait être due à la morphologie des cellules de l'algue, qui ne possède pas de coccolithes.

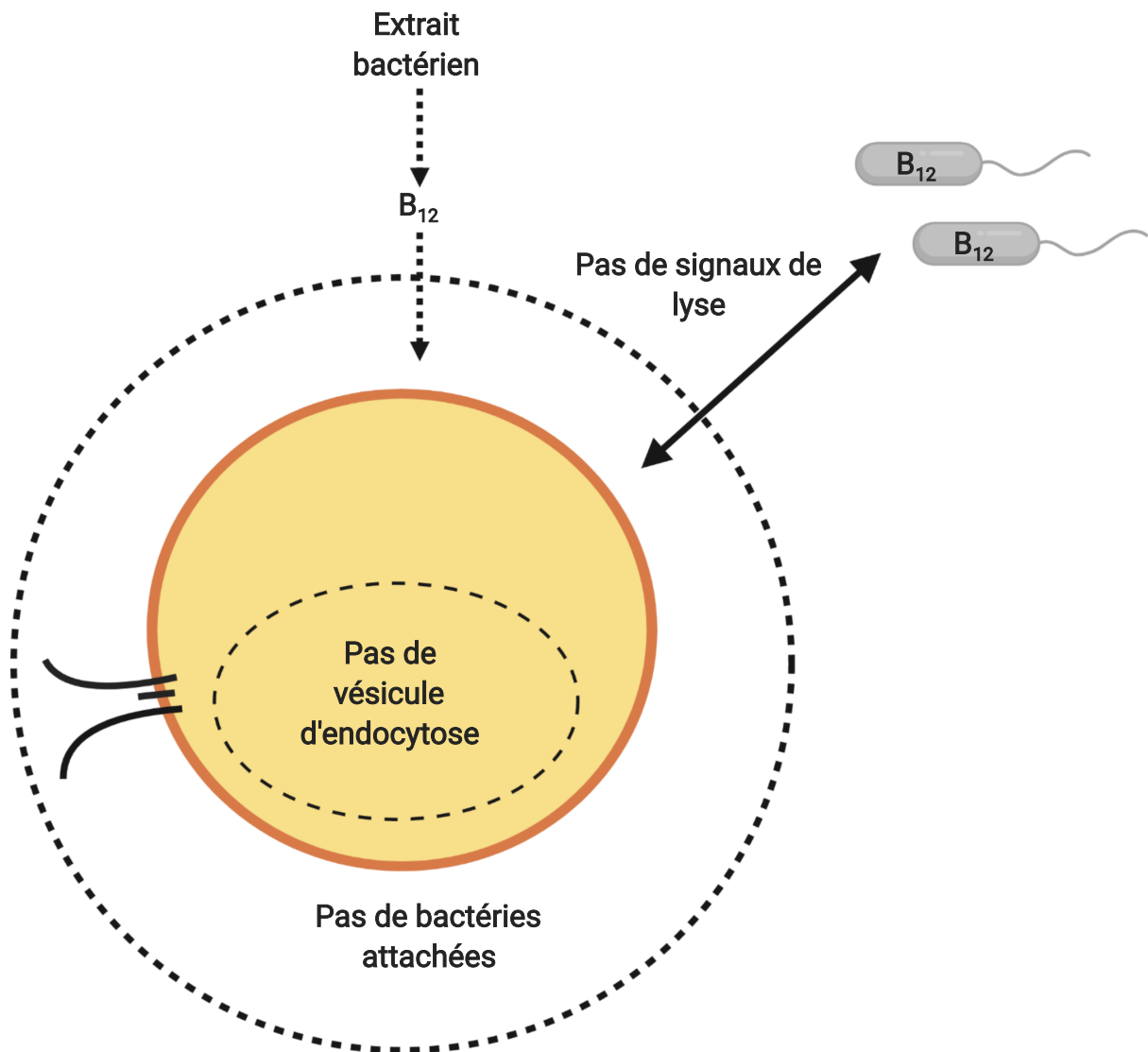


FIGURE 4.9 – Bilan du chapitre 4. Nous n'avons pas observé de bactéries attachées à *T. lutea* ni de vésicules d'endocytose. Les populations de *T. lutea* et de bactéries associées n'ont pas montré de mortalité importante et soudaine, indiquant qu'il n'y avait pas de lyse cellulaire massive due à des signaux chimiques particuliers. Nous avons observé que *T. lutea* pouvait acquérir la vitamine B₁₂ par l'assimilation d'extrait bactérien riche en ce cofacteur, ce qui indique une capacité à assimiler de la vitamine dans du lysat bactérien.

En revanche, *T. lutea* s'est développée sur un extrait bactérien riche en B₁₂, ce qui montre que la microalgue peut assimiler la vitamine B₁₂ présente dans du lysat bactérien. Nous proposons donc que la lyse bactérienne dans l'environnement pourrait permettre à *T. lutea* d'accéder à la ressource vitaminique. L'obtention de cobalamine par certaines espèces d'Haptophytes pourrait nécessiter l'intervention d'autres membres de la com-

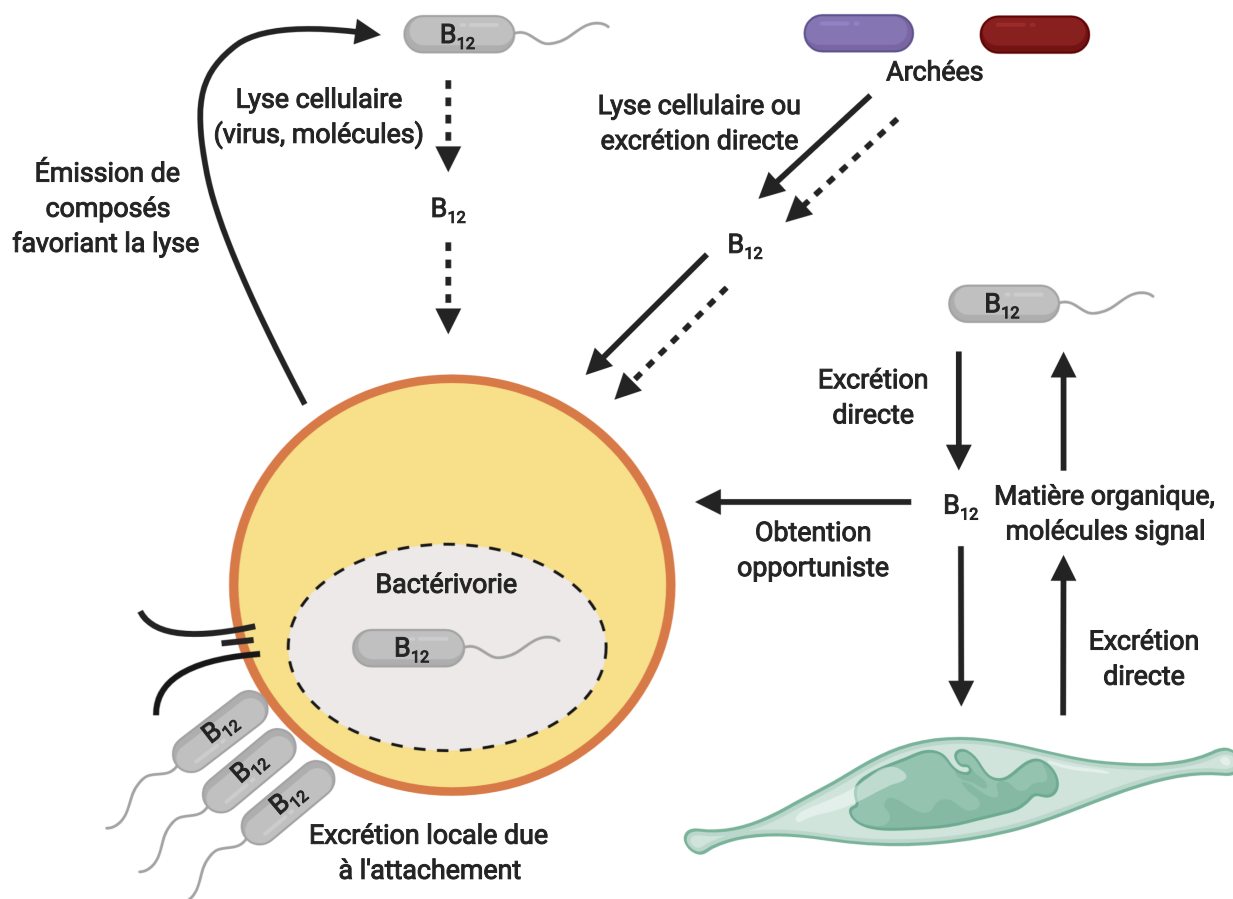


FIGURE 4.10 – Bilan du chapitre 4. Nous proposons d’autres mécanismes potentiels d’acquisition de cette vitamine par certaines Haptophytes, qui sont 1) la phagotrophie de bactéries productrices de B₁₂ ; 2) une obtention opportuniste dans le cas d’interactions mutualistes de certaines microalgues avec des bactéries productrices de B₁₂ ; 3) des interactions avec des Archées productrices de cobalamine.

munauté microbienne, qui pourraient par exemple jouer le rôle de médiateurs entre les microalgues et les bactéries productrices de vitamine B₁₂.

Nous n’avons pas observé de phagotrophie de bactéries par *T. lutea* durant nos expériences. La mixotrophie, souvent observée chez les Haptophytes (Marchant and Thomsen, 1994 ; Skovgaard et al., 2003 ; Zubkov and Tarran, 2008), pourrait donc être un moyen permettant à ces microalgues de se développer, ou du moins de se maintenir, dans les systèmes avec peu de vitamine B₁₂ dissoute.

Les *Thaumarchaeota* sont un groupe d’Archées dont la totalité des espèces séquencées possèdent l’équipement enzymatique permettant la synthèse *de novo* de vitamine B₁₂ (Doxey et al., 2015). Ces organismes sont retrouvés dans de nombreux environnements marins, et sont parmi les taxons majoritaires des eaux polaires (Doxey et al., 2015). D’autres groupes d’Archées, tels que les *Thermoagales*, peuvent synthétiser de la vitamine

B₁₂ *de novo* ou à partir de molécules organiques intermédiaires de la voie de biosynthèse complète (Swithers et al., 2012). La prise en compte de ces informations nous conduit à poser l'hypothèse que les Archées pourraient constituer une source de cobalamine alternative aux bactéries pour les microalgues haptophytes. Identifier les communautés bactériennes et d'Archées fréquemment associées aux Haptophytes dans les environnements limités en B₁₂ permettrait d'éclaircir la nature des interactions entre ces groupes.

4.5 Article 3 : Unravelling interactions between B₁₂-producing bacteria and the model haptophyte *Tisochrysis lutea* : the absence of B₁₂ excretion prevents from mutualism in co-culture

Charlotte Nef¹, Simon Dittami², Dominique Grizeau³, Delphine Passerini⁴, Raymond Kaas¹, Francis Mairêt¹ et Matthieu Garnier¹

¹IFREMER, Laboratoire de Physiologie et biotechnologie des Algues, rue de l'île d'Yeu, 44311 Nantes, France.

²Sorbonne Universités, CNRS, Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France.

³Université de Nantes, CNRS, GEPEA, 44602 Saint-Nazaire, France.

⁴IFREMER, Laboratoire Écosystèmes Microbiens et Molécules Marines pour les Biotechnologies, rue de l'île d'Yeu, 44311 Nantes, France.

Manuscrit en rédaction pour soumission dans *Frontiers in Marine Science*, sera proposé au co-auteurs prochainement pour relecture – 2019

Unravelling interactions between B₁₂-producing bacteria and the model haptophyte *Tisochrysis lutea*:
the absence of B₁₂ excretion prevents mutualism in co-culture

Charlotte Nef^{1*}, Simon Dittami², Dominique Grizeau³, Delphine Passerini⁴, Raymond Kaas¹, Francis Mairat¹ and Matthieu Garnier¹

¹IFREMER, Physiology and Biotechnology of Algae Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, 44311, Nantes, France.

²Sorbonne University, CNRS, Integrative Biology of Marine Models Laboratory, Roscoff Biological Station, 29680 Roscoff, France.

³Nantes University, CNRS, GEPEA, 44602 Saint-Nazaire, France.

⁴IFREMER, Microbial Ecosystems and Marine Molecules for Biotechnologies Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, 44311, Nantes, France.

*nefcharlotte@yahoo.fr

1. Abstract

Haptophyte microalgae are key contributors to microbial communities in many environments. It has been proposed recently that members of this group would be in majority dependent for vitamin B₁₂ (cobalamin), an enzymatic cofactor produced only by some bacteria and archaea. Here we examine for the first time the question of vitamin B₁₂ acquisition by haptophytes. We tested whether adding B₁₂-producing bacteria in vitamin-deprived cultures of the model species *Tisochrysis lutea* would allow the microalgae to overcome B₁₂ deprivation. Contrary to other studies reporting mutualistic algae-bacteria interactions for cobalamin, our results show that *T. lutea* did not receive vitamin B₁₂ by its associated bacteria, despite bacteria:algae ratios supposedly sufficient to allow enough vitamin production by bacteria to sustain microalgae growth. We also observed that *T. lutea* was able to scavenge and assimilate B₁₂-rich bacterial lysate during cobalamin deprivation, which shows that the primary bottleneck was the absence of B₁₂ excretion. This work give an alternate view of the direct metabolic exchange between microorganisms for group B vitamins.

Keywords: microbial interactions, vitamin B₁₂, cobalamin, haptophytes, *Tisochrysis lutea*

2. Introduction

Group B vitamins are essential cofactors required for activity of enzymes in central metabolism (ref). Most microalgae require in culture at least one or a combination of vitamin B₁ (thiamine), vitamin B₇ (biotin) and vitamin B₁₂ (cobalamin) (Provasoli, 1974; Croft et al., 2005, 2006), meaning that they must acquire these coenzymes from exogenous environmental sources. Cobalamin amendment experiments in several ecosystems demonstrated that this vitamin was significantly limiting phytoplankton growth in the Atlantic Ocean (Gobler et al., 2007), in coastal environments (Sañudo-Wilhelmy, S. A. et al., 2006), in the Gulf of Alaska (Koch et al., 2011) and in the Southern Ocean (Panzeca et al., 2006). Vitamin B₁₂ is the most complex vitamin known to date, and its synthesis is restricted to select species of bacteria and archaea (Raux et al., 1996, 2000; Martens et al., 2002; Doxey et al., 2015). In marine environments, several prokaryotic groups have been reported to gather species able to produce vitamin B₁₂, such as bacterial genus *Halomonas* (Romine et al., 2017). The study of Luo and Moran (2014) reported that species from Rhodobacteraceae clade all encoded vitamin B₁₂ biosynthesis genes. In Archaea, all sequenced species from *Thaumarchaeota* lineage have the genetic equipment to produce cobalamin *de novo* (Doxey et al., 2015).

Interkingdom interactions between microalgae and bacteria for B₁₂ have been reported in the literature. For chlorophytes for instance, (Kazamia et al., 2012) reported facultative interactions between the freshwater algae *Lobomonas rostrata* and the bacterium *Mesorhizobium loti*, in which algae delivered organic carbon, probably amino acids (Helliwell et al., 2018), to bacteria in return for cobalamin. For rhodophytes and In addition, mutualistic complementation of B vitamins between the marine chlorophyte *Ostreococcus tauri* (B₁₂ and B₁ auxotroph) associated with *Dinoroseobacter shibae* (Roseobacteraceae) (B₃, B₇ and B₉ auxotroph) has been described (Cooper et al., 2019). Regarding dinoflagellates, information has been gathered by (Tang et al., 2010) who showed that they were in majority cobalamin-dependent, and that some of them may proceed to metabolic trade-offs with associated bacteria to obtain the vitamin (Cruz-López et al., 2018). Croft et al. (2005) reported bacteria of the genus *Halomonas* able to sustain microalgae (rhodophytes and dinoflagellates) with the vitamin.

In a recent work, we proposed that Haptophyta phylum would gather exclusively cobalamin-dependent microalgae (Nef et al., 2019), meaning that this taxon would be relying on an external source for B₁₂ acquisition. Members of Haptophyte phylum are globally distributed (O'Brien et al., 2013) and significantly contribute to phytoplankton communities (Thomsen et al., 1994; Not et al., 2008) as well as global carbon (Milliman, 1993; Liu et al., 2009) and sulfur (Keller et al., 1989; Franklin et al., 2010) cycles. The role of vitamin B₁₂ on the physiology of this ecologically important group has been recently investigated (Nef et al., 2019, Nef et al., submitted), however, the way by which these microalgae may acquire vitamin B₁₂ remains poorly understood. In this context, we aimed at testing if haptophytes could

obtain bacterial cobalamin in a reciprocal relationship with direct interactions. In a first part, selection of B₁₂-producing bacteria has been realized. Culture assays of the model species *Tisochrysis lutea* and two bacterial strains in different B₁₂ concentrations (low and deprived) and with bacterial extracts have been conducted. To our knowledge, this is the first work addressing means of cobalamin acquisition in haptophytes.

3. Materials and methods

3.1. Bacterial screening

We searched for vitamin B₁₂-producing bacteria in our collections focussing on the marine genus *Halomonas* and on species from the Rhodobacteraceae clade. Bacterial strains were either isolated from microalgae cultures (strains 09-003, 09-027, 09-029, 09-213, 09-729) (Le Chevanton et al., 2013) or from deep-sea ecosystems (strains 1211, 1212, 1216, 1229, 1233 and 1236) (Laboratory EM3B, Ifremer, France). Another *Halomonas* sp. strain isolated from a microalgal culture and that can sustain some microalgae with cobalamin (Croft et al., 2005), was obtained and named strain 19-001. A total of twelve strains (11 *Halomonas* sp. and 1 *Phaeobacter* sp.) were screened. Bacteria were grown in biological triplicates in liquid Marine Broth medium (BD Difco™, Becton Dickinson Company, USA) 24 h at 28°C with shaking (180 rpm). Cellular concentration was quantified by plating on Marine Agar in serial dilutions. Cells and supernatants were separated by centrifugation (10,000 *g*, 10 min 10°C). Particular vitamin B₁₂ extraction was conducted by referring on the protocol described in (Nef et al., 2019). Effort was made to standardize the amount of cells measured for their B₁₂ quota. Vitamin B₁₂ in the dissolved fraction was pre-concentrated by centrifugation using 1000 Da column (Microsep Advance, Pall Corporation, USA). To avoid any bias caused by the presence of cobalamin in culture medium, a Marine Broth sample was also considered for the B₁₂ assay. Final B₁₂ quantification in both particular and dissolved fractions was realized with an ELISA test kit (Immunolab gmbh, Germany) by referring on the provided protocol.

3.2. Sequencing of bacteria

To extract DNA, bacterial lysis was performed with the adding of 530 µL Tris EDTA HCl pH 7.5, 60 µL SDS 10 % and 3 µL proteinase K (20 mg/mL). Samples were incubated 90 minutes at 55°C with shaking. Nucleic acids were purified with the adding of 100 µL NaCl and one volume phenol/chloroform isoamyl (25/24/1), centrifuged twice to harvest superior phase, followed by a last purification step with

chloroform. DNA was precipitated by adding 0.8 volume isopropanol and placing samples in ice for one hour. DNA pellets were harvested by centrifugation then washed with ethanol 70 % and finally suspended in 100 μ L Tris EDTA HCl pH 7.5.

The sequencing step was realized at the Roscoff Biological Station. Paired-end DNA libraries with an average insert size of 500 bp were prepared using the Nextera XT kit following the manufacturer's protocol. Libraries were then sequenced together with other microbial genomes using the Illumina MiSeq technology (V3, paired end, 2,300 bp reads) at GENOMER platform (Station Biologique de Roscoff), multiplexing 20 bacterial genomes per run. Raw reads were first examined using FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Low-quality sequences were trimmed or removed using Trimmomatic v.0.38 (Bolger et al., 2014), using sliding window with a quality score of 15 and a minimal read length of 36 bp as filters. Trimmed read pairs were used for genome assembly with SPAdes v.3.12 (Bankevich et al., 2012) using default parameters. Genomic sequences encoding ribosomal were identified using Barrnap v.0.8 (<https://github.com/tseemann/barrnap>) and 16S rDNA sequences used to search for complete reference genomes in the GenBank. These reference genomes were used for scaffolding with Medusa version 1.6 (Bosi et al., 2015). Finally, gaps in the scaffolds were filled wherever possible using GapCloser 1.12 (Luo et al., 2012) and the resulting draft genomes were annotated using the MicroScope platform (Vallenet et al., 2017).

Sequences alignment for 16S rRNA gene was realized with MUSCLE in full mode for 50 bacterial sequences of which 46 were reference sequences from the NCBI database. A total of 83 % initial positions were conserved. The curation step was conducted using Gblocks tool allowing gap positions within the final blocks. The final phylogenetic tree was constructed by maximum likelihood using PhyML (100 bootstraps).

3.4. *T. lutea*–bacteria cocultures and analyses

3.4.1. Microalgal cultures and cocultures

Axenic *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14) cultures (see (Nef et al., 2019) for purification protocol) were inoculated with 10 μ L (1 colony in 1 mL sterile seawater) of either *P. porticola* or *Halomonas* sp. bacterial cultures and enriched with modified Conway medium with 40 ng/L B₁₂. The precultures were transferred after three weeks of growth in fresh medium with 40 ng/L B₁₂. This step was repeated twice in order for the microorganisms to acclimate to each other. After one week in stationary phase, the precultures were transferred for the experiment either in B₁₂-deprived or B₁₂-enriched (40 ng/L) medium at 0.1 10⁶ cell/mL initial concentration of *T. lutea*. Axenic precultures of *T. lutea* were transferred three

times every three weeks in fresh B₁₂-limited medium. Final control axenic cultures were inoculated as above, either in B₁₂-deprived or B₁₂-enriched (40 ng/L) medium. All conditions were conducted in biological triplicates. The experiment was conducted in 1 L autoclaved glass bottles homogenized by bubbling of 0.2 µm filtered air. Cultures were maintained at 27 ± 1°C with continuous light (150 µmol photons m⁻² s⁻¹).

3.4.2. Microalgal cultures with bacterial extracts

The experiment with bacterial extracts adding was conducted starting from a fraction of the B₁₂-deprived axenic controls in stationary phase. Briefly, 200 mL of each replicate was aseptically transferred in new bottles, each inoculated either with strain 09-029 extract or with strain 09-729 extract, in order to obtain three biological replicates for both conditions.

Bacterial extracts were obtained with twenty-four hours aged bacterial cultures harvested by centrifugation and lysed by ebullition at 99°C for 15 minutes in 1 mL autoclaved ultrapure water. The equivalent of 100 bacteria/alga lysate for 09-029 were added in each of the three replicates. The quantity of 09-729 bacterial cells to be lysed was normalized on a same carbon basis than that of 09-029, corresponding to an equivalent of 70 mg/L carbon in final *T. lutea* cultures.

3.4.3. Analyses

Sampling and cell enumeration of microalgae cultures were performed on a daily base with a Multisizer Coulter Counter (Beckman Coulter). Bacterial cells were enumerated once to twice a week by flux cytometry (BD Accuri C6, BD Biosciences) with 1 % SybrTMGreenTM (Lonza) staining.

4. Results

4.1 Selection of vitamin B₁₂-producing bacteria

Eleven bacterial strains, either isolated from microalgae cultures or from hydrothermal vents and previously identified as *Halomonas* sp., were selected, together with one bacterium isolated from microalgae culture and identified as *Phaeobacter* sp.. The twelve bacteria were screened in both intracellular and extracellular compartments to assess whether they excreted B₁₂ in monoculture in absence of microalgae. As bacteria were grown in Marine Broth medium containing vitamin B₁₂, we measured the medium B₁₂ and removed it from the total (sum of intracellular plus extracellular). It appeared that all bacteria strains investigated but two seemed to produce vitamin B₁₂ (Fig. 1). (Romine et al., 2017) reported that *Halomonas* spp. from bacterial communities did not encode a B₁₂ riboswitch allowing them to regulate their vitamin production. It is therefore unlikely that lack of B₁₂ synthesis observed for two bacterial strains in our analysis is linked with culture conditions but most probably from a real inability to synthesize the vitamin.

Two strains that exhibited the highest vitamin production, namely 09-029 (*Phaeobacter* sp.) and 19-001 (*Halomonas* sp.) were selected and sequenced to identify their species and to confirm the presence of vitamin B₁₂ biosynthetic pathway. In addition, two *Halomonas* sp. strains (09-003 and 09-027) isolated from microalgal cultures and positively screened for vitamin B₁₂ production were sequenced to assess genus diversity for vitamin B₁₂ production. Following sequencing and 16S rRNA analyses, strain 09-029 was identified as *Phaeobacter porticola* and the three *Halomonas* strains were identified as *Halomonas alkaliphila* (strains 09-003 and 09-027) and *Halomonas* sp. (strain 19-001). After phylogenetic analysis with reference strains, *P. porticola* was consistently gathered with bacteria from the Rhodobacteraceae family and *Halomonas* sp. 19-001 was grouped with *H. variabilis* (Fig. 2). Both *H. alkaliphila* were grouped with the reference strain (Fig. 2).

All strains had the complete aerobic vitamin B₁₂ biosynthetic pathway (supplementary data) and in particular the *cobNST* gene complex, considered as a critical step for B₁₂ synthesis (Luo and Moran, 2014).

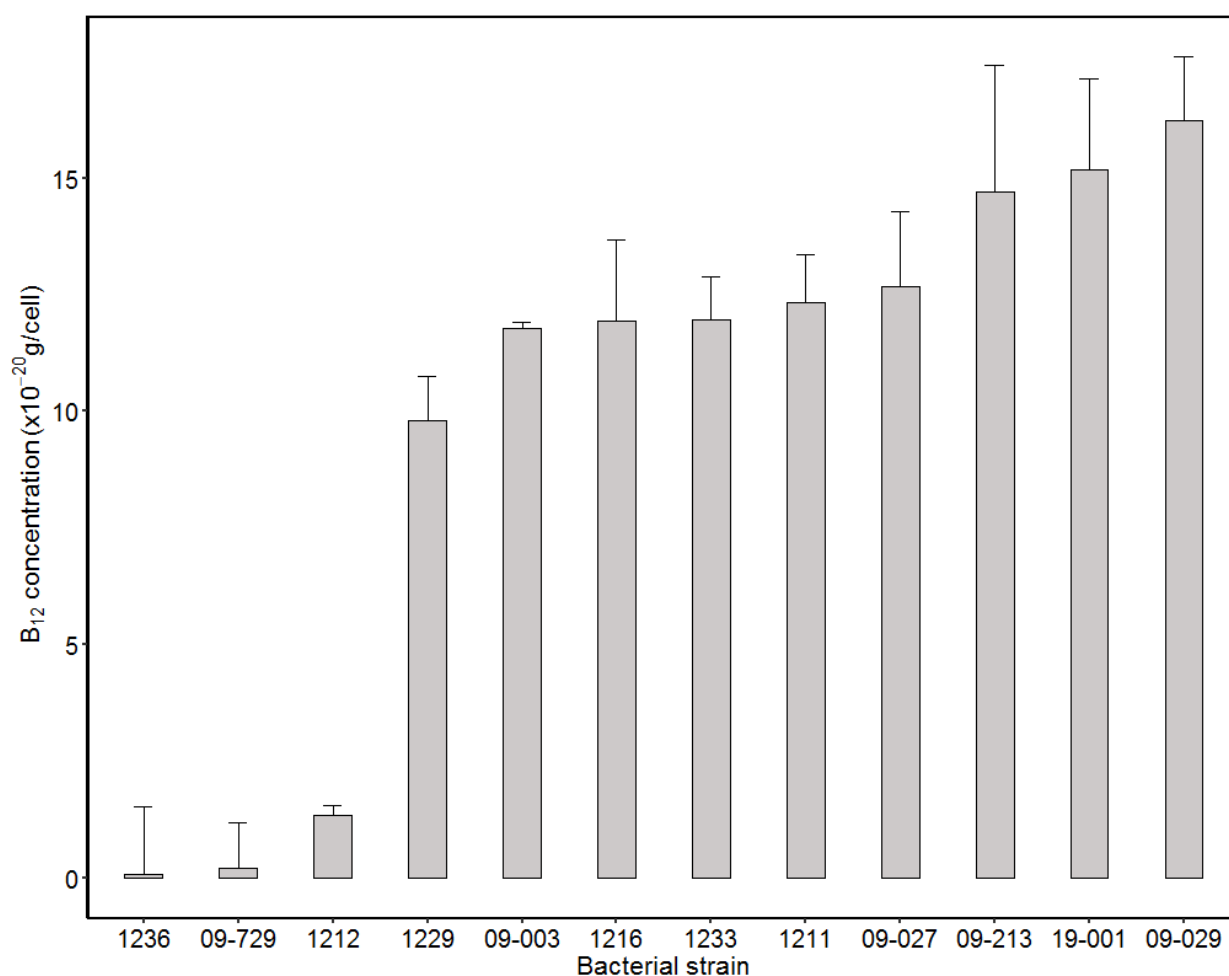


Figure 1. Screening of 12 bacterial strains for B₁₂ content.

To better understand B₁₂ dependency of the bacteria we screened, we searched for vitamin B₁₂-dependent enzymes in bacterial genomes and identified a B₁₂-dependent methionine synthase (*metH*) in all four strains. *Halomonas* spp. encoded an additional B₁₂-independent methionine synthase *metE*. All strains of both species encoded also several B₁₂-dependent ribonucleotide reductase genes (E.C. 1.17.4.1). Again, all *Halomonas* strains seem to have the same genetic equipment involved in B₁₂ utilization. These result suggest that whereas *Halomonas* spp. could potentially grow without the vitamin, *P. porticola* must rely on its own vitamin production to develop, which could reduce cobalamin quantity potentially available for *T. lutea* in co-culture. For the following experiments, we selected bacterial strains that had the highest vitamin B₁₂ content, namely *P. porticola* 09-029 and *Halomonas* sp. 19-001. In addition, we aimed at understanding whether *T. lutea* in co-culture with bacteria from different families would lead to different interactions.

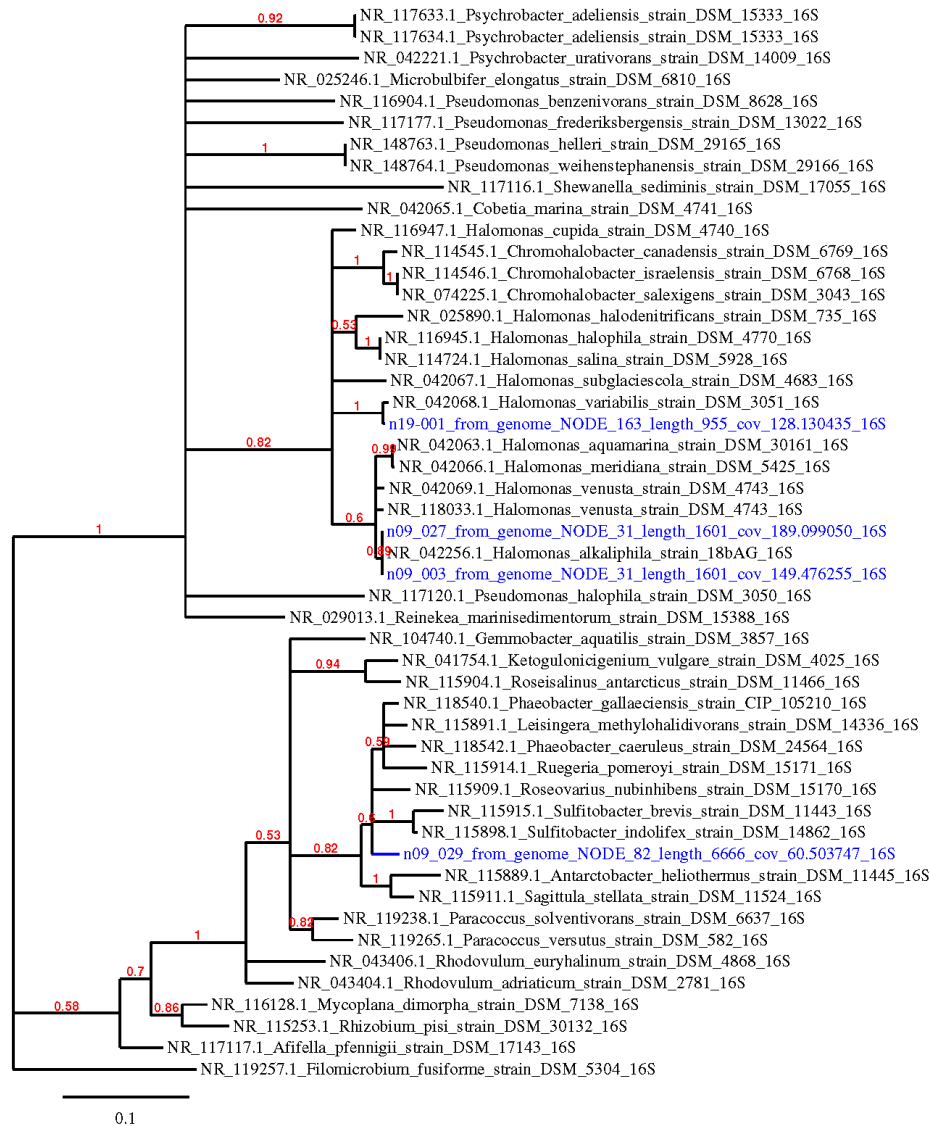


Figure 2. 16S rRNA phylogenetic tree for reference bacteria (black) and selected bacteria (blue) inferred from Maximum Likelihood. Bootstrap values superior to 0.6 are indicated.

4.2 *T. lutea*–bacteria cocultures

Tisochrysis lutea was grown in B₁₂-depleted and B₁₂-replete mixed cultures either with *P. porticola* or *Halomonas* sp. 19-001 (Fig. 3A). Axenic control cultures with and without B₁₂ adding were also established to identify if bacteria could have a negative effect on *T. lutea*.

None of the bacteria tested in B₁₂-depleted coculture restored *T. lutea* growth compared with axenic controls (Fig. 3A), which was illustrated by an absence of significant difference of maximal growth rate (μ_{max}) and maximal biomass increase (ΔC_{max}) compared with controls ($p > 0.05$; two factors ANOVA) (Table 1). As these bacteria were selected for their high B₁₂ production, this result suggests

that bacteria did not release enough vitamin B₁₂, preventing *T. lutea* from developing. Vitamin B₁₂-deprived cocultures were maintained for almost 50 days to test whether bacterial lysis would occur in late stationary phase of *T. lutea*, which would have allowed the microalgae to obtain cobalamin. We did not report bacterial lysis, likely indicating that the microalgae did not emit bactericide molecules.

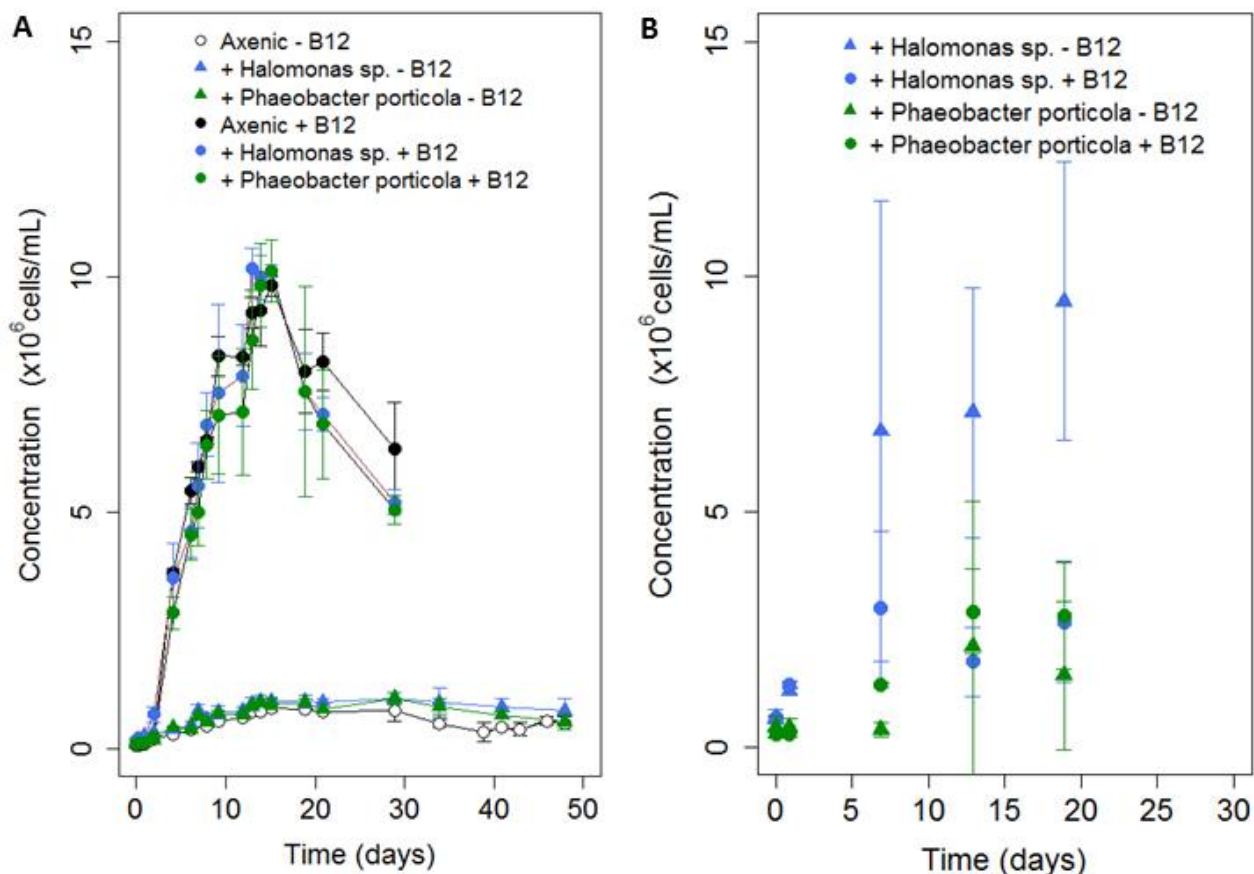


Figure 3. Evolution of *T. lutea* concentrations in axenic and mixed culture with B₁₂-producing bacteria (A). Evolution of bacterial concentrations in mixed cultures with *T. lutea* (B).

In addition, microalgal growth in coculture with B₁₂ adding was comparable to axenic controls (Fig. 3A, Table 1), indicating that bacteria did not excrete additional cobalamin. Although the adding of *Halomonas* sp. 19-001 in presence of the vitamin significantly impacted microalgal maximal growth rate (0.77 ± 0.05 ; $p = 0.0029$; two factors ANOVA) compared with axenic + B₁₂ controls (0.96 ± 0.02), it did not lead to differential ΔC_{max} , demonstrating that the microalgae assimilated the same vitamin amount than axenic controls. These results prove that none of the bacterial strains compete with *T. lutea* for the vitamin nor have a negative effect on the microalgae, such as the production of algicidal molecules, or that these did not affect the microalgae. Finally, we did not observe any attachment of bacteria on *T. lutea* cells nor the presence of bacteria in endocytosis vesicles.

Table 1. Parameters of *T. lutea*–bacteria co-cultures with or without cobalamin input.

Culture condition	μ_{max} (d ⁻¹)	ΔC_{max} (10 ⁶ cell/mL)	Bacteria/Algae ratio
Axenic - B ₁₂	0.40 ± 0.08	0.86 ± 0.10	
Axenic + B ₁₂	0.96 ± 0.02	9.73 ± 0.22	
<i>T. lutea</i> + 19-001	0.38 ± 0.04	0.97 ± 0.06	9.55 ± 3.05
<i>T. lutea</i> + 19-001 + B ₁₂	0.77 ± 0.05	10.23 ± 0.21	0.36 ± 0.20
<i>T. lutea</i> + 09-029	0.38 ± 0.02	0.98 ± 0.12	1.52 ± 1.48
<i>T. lutea</i> + 09-029 + B ₁₂	0.83 ± 0.03	10.03 ± 0.65	0.36 ± 0.04
<i>T. lutea</i> + lysate 09-029	0.38 ± 0.22	6.81 ± 1.59	
<i>T. lutea</i> + lysate 09-729	0.06 ± 0.06	0.96 ± 1.35	

In B₁₂-limited chemostat steady state (Nef, 2019), algal exudate represents 18 % of total particulate carbon, showing that microalgal excretion could allow bacterial growth. Bacteria developed in all co-cultures (Fig. 3B), demonstrating that they assimilated dissolved organic matter excreted by *T. lutea*. In stationary phase in mixed cultures with *Halomonas* sp. 19-001, bacteria:algae ratios were around 25 fold higher when grown without vitamin B₁₂ (9.55 ± 3.05 bacteria:alga) compared with cocultures with B₁₂ (0.36 ± 0.20 bacteria:alga) (Table 1). In coculture with *P. porticola*, ratios were comparable between both cultures with and without B₁₂ (around 1 bacterium:alga) (Table 1).

We then calculated the amount of vitamin B₁₂ theoretically made available by these bacteria with the measured bacterial biomass. These values were estimated around 1 to 4 ng/L B₁₂ in mixed cultures with *P. porticola* and 0.8 to 1 ng/L B₁₂ in coculture with *Halomonas* sp., assuming that all bacterial B₁₂ would be excreted in the medium and that their productivity would be equivalent to the one measured in the screening. These results correspond to very low cobalamin concentrations, equal to the ones measured in Southern Ocean (Panzeca et al 2009), the Indian Ocean (Fiala and Oriol 1984), North Atlantic Ocean (Panzeca et al 2008) and the Sargasso Sea (Menzel and Spaeth 1962).

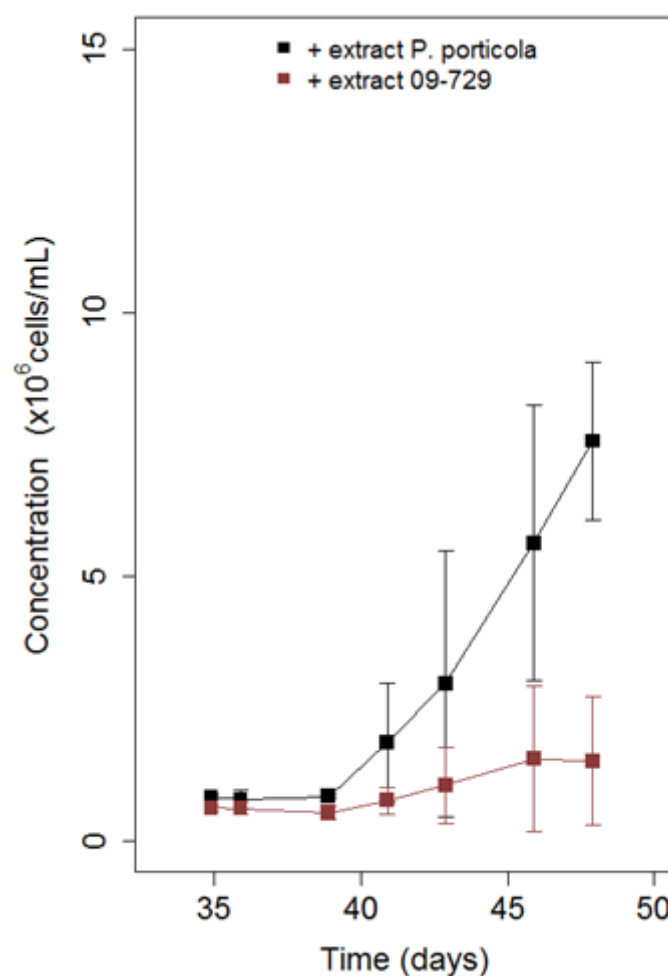


Figure 4. Evolution of *T. lutea* concentrations in axenic culture with bacterial extracts.

In a second part, we tested whether *T. lutea* would be able to scavenge cobalamin from bacterial extract. For this, we added extracts from the B₁₂-producing strain *P. porticola* and from *Halomonas* sp. 09-729 as negative control (Fig. 1 and 4). The amount of *P. porticola* extract added in each replicate was the equivalent of 100 bacteria/alga, corresponding to 70 mg/L final carbon. The same carbon equivalent was considered for *Halomonas* sp. 09-729 extract. Vitamin B₁₂ concentrations in bacterial extracts was measured at 69.96 ± 5.23 ng/L for *P. porticola* and 4.01 ± 1.41 ng/L for *Halomonas* sp. 09-729, both in equivalent final concentration in *T. lutea* cultures.

The adding of bacterial lysate from B₁₂-producing strain in B₁₂-deprived medium allowed the microalgae to develop to levels of positive controls with 40 ng/L (Fig. 3A and 4), indicating that *T. lutea* was able to scavenge and assimilate cobalamin from bacterial extract. Cultures with negative control lysate 09-729 exhibited a slight growth that can be explained by low B₁₂ content (Fig. 4). According to bacterial screening for B₁₂ production, it was the lowest vitamin-producing strain (Fig. 1). Note that such low B₁₂

quantity can be due to bacterial uptake from the culture medium, and so not necessarily to bacterial B₁₂ synthesis.

5. Discussion

Interactions between microalgae and bacteria for B₁₂ have been unevenly investigated for important microalgal groups such as chlorophytes and dinoflagellates. Haptophyte microalgae, suspected to be exclusively B₁₂ auxotrophic (Nef et al., 2019), are also ubiquitous and important contributors to primary productivity (Liu et al., 2009; Jardillier et al., 2010; O'Brien et al., 2013) and seem to present a diverse range of interactions with bacterial communities (Segev et al., 2016; Barak-Gavish et al., 2018). However information on their acquisition of vitamin B₁₂ is unknown. Considering this gap in knowledge, we attempted in the present work to characterize the way by which haptophytes may acquire vitamin B₁₂ from bacteria, by focussing on the species *Tisochrysis lutea*.

We screened bacteria to identify strains with an ability to produce high amount of vitamin B₁₂. Two strains of either *Phaeobacter porticola* or *Halomonas* sp. were grown with the microalgae to test whether a mutualistic relationship would occur in B₁₂ deprivation. The adding of living B₁₂-producing bacteria was insufficient to provide *T. lutea* with enough vitamin B₁₂, suggesting that conditions required for mutualism were not fulfilled. (Kazamia et al., 2012; Cruz-López et al., 2018) and (Cooper et al., 2019) observed bacteria-algae ratios around 10:1 to 30:1; 10:1 to 100:1 and 1:1 respectively for mutualistic algal-bacterial cocultures for cobalamin. In comparison, our measured bacteria:algae ratio was about 10:1 for *Halomonas* sp. 19-001 and 1:1 for *P. porticola* in B₁₂-deprivation. Compared to literature the ratios we observed were supposedly sufficient to allow mutualistic growth of the microorganisms. It has been reported that cobalt concentrations (around 20-30 10⁻¹² M) could limit vitamin B₁₂ synthesis by microorganisms (Panzeca et al., 2009). Here our experiment was conducted in natural seawater enriched with Conway medium that contains 8.41 10⁻⁸ M cobalt (CoCl₂), so it seems unlikely that a low B₁₂ production occurred due to cobalt limitation.

(Croft et al., 2005) experimentally demonstrated that the strain *Halomonas* sp. 19-001 could sustain the dinoflagellate *Amphidinium operculatum* and the rhodophyte *Porphyridium purpureum* with the same vitamin amount than positive controls, suggesting that it has the ability to export cobalamin in a mutualistic relationship. Here, B₁₂ productivity of this bacterium was confirmed but it appeared that this strain was unable to deliver enough cobalamin to *T. lutea* in our culture conditions. The second bacterium we tested was *P. porticola* from the Rhodobacteraceae family of which members have been showed to directly provide B₁₂ to the chlorophyte *Ostreococcus tauri* and the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* (Cruz-López et al., 2018; Cooper et al., 2019). Our experimental and *in silico* analyses provided the evidence that *P. porticola* has the ability to synthesize vitamin B₁₂. Similarly to

Halomonas sp. 19-001, our experimental co-cultures with *P. porticola* showed that this bacteria did not allow *T. lutea* to mitigate B₁₂ deprivation. Contrary to previous studies showing that bacteria can directly deliver enough cobalamin to microalgae, we did not observe differential growth of *T. lutea* grown with two B₁₂-producing bacterial strains from different bacterial taxa. However, we observed that the microalgae was able to scavenge and assimilate cobalamin-rich bacterial lysate, compensating B₁₂ limitation. These results indicate indirect interactions between bacteria and haptophytes for B₁₂, at least for *T. lutea*, and that bacterial lysis in the environment may provide cobalamin to some microalgae.

Mixotrophy is an important feature of haptophytes (Havskum and Riemann, 1996; Legrand, 2001; Unrein et al., 2014; Liu et al., 2016; Anderson et al., 2018). Furthermore, increased phagotrophy of bacteria, or bacterivory, has been observed during B₁₂-deprived cultures of the haptophyte *Isochrysis galbana*, allowing the algae to survive (Anderson et al., 2018). *I. galbana* and *T. lutea* both belong to the Isochrysidaceae family. Although we did not observe bacteria in *T. lutea* cells in our experiment, (Anderson et al., 2018) reported selective feeding of mixotrophic chlorophytes and of *I. galbana*. It might be that species of bacteria tested here were not edible by *T. lutea* or that the microalgae does not encode the genetic equipment allowing for phagocytosis of bacteria. We suggest that bacterivory may constitute an alternate way to obtain cobalamin at least for some haptophyte species. The hypothesis that haptophyte may indirectly assimilate B₁₂ by bacterivory should be tested with representatives from different haptophyte families and bacteria from different taxa.

Production of infochemicals has been evidenced as a way for microorganisms to interact in the phycosphere, the specific microenvironment surrounding algal cells. Such chemical communication has been reported several times for the haptophyte *Emiliania huxleyi* and its associated bacteria. For instance, (Seyedsayamdost et al., 2011a, 2011b) described a model of interaction in which senescent *E. huxleyi* produce *p*-coumaric acid, stimulating the excretion of roseobacticides, molecules that are detrimental to *E. huxleyi*, by *Phaeobacter gallacensis* (Roseobacters). Another study observed that production of bacterial indole-3-acetic acid mediates interaction between *Phaeobacter inhibens* and *E. huxleyi* (Segev et al., 2016). *P. inhibens* was in turn able to assimilate DMSP produced by the microalgae as a sulfur source and incorporate DMSP degradation products into amino acids and roseobacticides (Segev et al., 2016). One may wonder if signal molecules come at play in previously observed B₁₂ coculture, which could explain interaction specificity. Most of the studies analysing interactions between *E. huxleyi* and species from the genus *Phaeobacter* report a switch from mutualism to a pathogenic relationship. The present work is the first demonstrating that culture of a Haptophyte with a bacterium of the genus *Phaeobacter* do not ultimately lead to algal death. In the environment, many archaea, including the widespread taxa Thaumarchaeota, can synthesize vitamin B₁₂ *de novo* (Raux et al., 1996, 2000; Martens et al., 2002; Doxey et al., 2015). Archaea could constitute a vitamin B₁₂ source for auxotrophic microalgae. Future work should therefore investigate the link between archaeal production of the vitamin in co-culture with haptophytes.

Authors have demonstrated that for some microbial associations a mutualistic relationship for the vitamin may occur, in which microalgae trade organic substrates in exchange for bacterial B₁₂ (Kazamia et al., 2012; Cruz-López et al., 2018; Helliwell et al., 2018; Cooper et al., 2019). This is the first study testing B₁₂ acquisition by haptophytes. The present work shows that not all microalgae obtain vitamin B₁₂ by direct interactions with bacteria. On the other hand, *Tisochrysis lutea* is able to scavenge the vitamin from bacterial lysate, a strategy that could imply a potential ecological succession of haptophytes and B₁₂-producing bacteria. A recent study provided the evidence that viral lysis of heterotrophic bacteria releases nutrients that are taken up by marine phytoplankton (Shelford and Suttle, 2018). We hypothesize that this may be a way for B₁₂-auxotrophic phytoplankton to take up the vitamin. This study yielded important insights regarding interactions between haptophytes and bacteria for cobalamin. Further analyses are needed on a diverse range of haptophyte species to better characterize biotic interactions of this important microalgal community with bacteria and archaea.

6. Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

7. Acknowledgements

We wish to thank Alison Smith and Sue Aspinall (Department of Plant Sciences, University of Cambridge, UK) for providing the 19-001 strain (*Halomonas* sp.). We acknowledge funding from the French Région des Pays de la Loire.

8. References

- Anderson, R., Charvet, S., and Hansen, P. J. (2018). Mixotrophy in Chlorophytes and Haptophytes—Effect of Irradiance, Macronutrient, Micronutrient and Vitamin Limitation. *Front. Microbiol.* 9, 1704. doi:10.3389/fmicb.2018.01704.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021.
- Barak-Gavish, N., Frada, M. J., Ku, C., Lee, P. A., DiTullio, G. R., Malitsky, S., et al. (2018). Bacterial virulence against an oceanic bloom-forming phytoplankton is mediated by algal DMSP. *Sci. Adv.* 4, eaau5716. doi:10.1126/sciadv.aau5716.

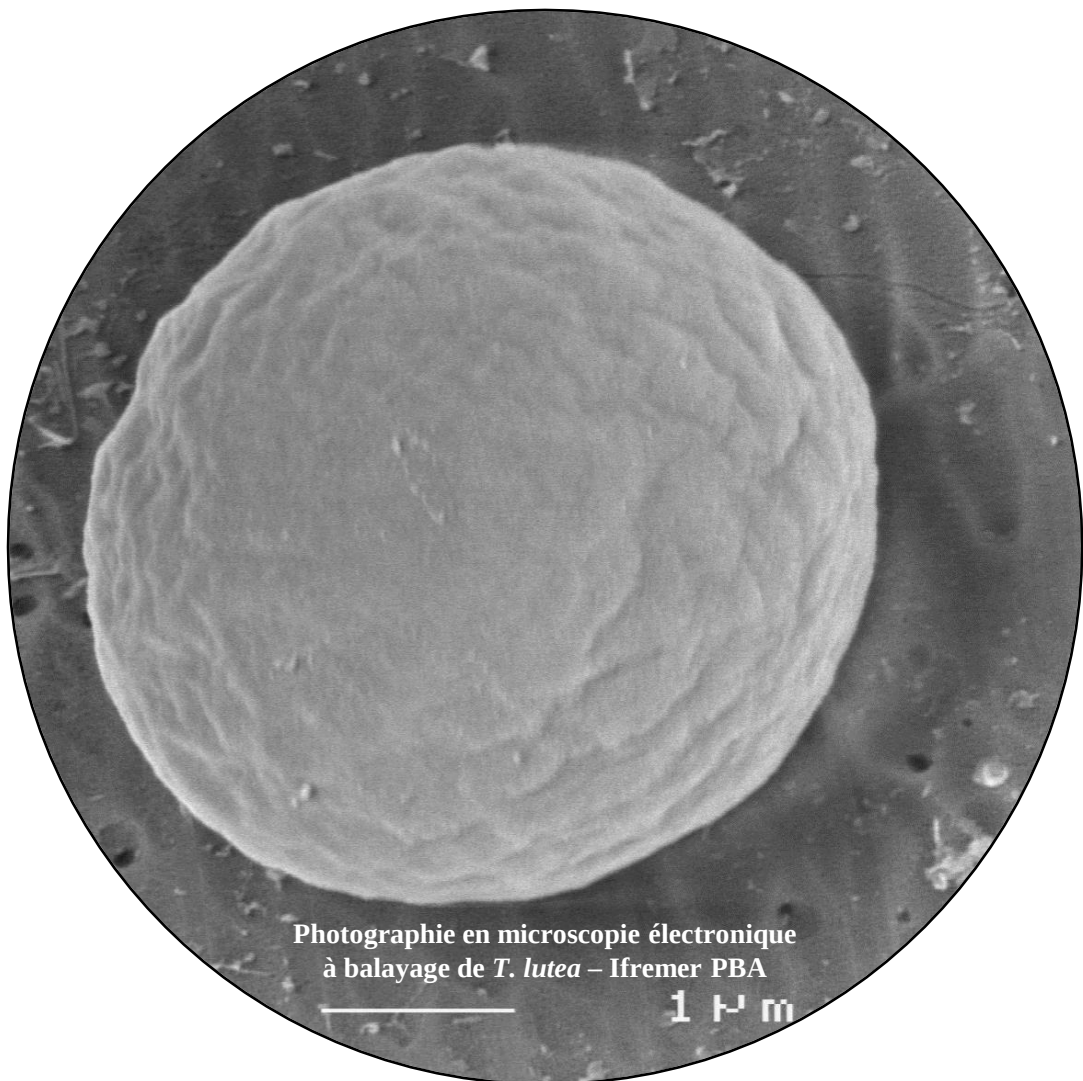
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bosi, E., Donati, B., Galardini, M., Brunetti, S., Sagot, M.-F., Lió, P., et al. (2015). MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. *Bioinformatics* 31, 2443–2451. doi:10.1093/bioinformatics/btv171.
- Cooper, M. B., Kazamia, E., Helliwell, K. E., Kudahl, U. J., Sayer, A., Wheeler, G. L., et al. (2019). Cross-exchange of B-vitamins underpins a mutualistic interaction between *Ostreococcus tauri* and *Dinoroseobacter shibae*. *ISME J.* 13, 334–345. doi:10.1038/s41396-018-0274-y.
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., and Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 433, 90–93.
- Croft, M. T., Warren, M. J., and Smith, A. G. (2006). Algae Need Their Vitamins. *Eukaryot. Cell* 5, 1175–1183. doi:10.1128/EC.00097-06.
- Cruz-López, R., Maske, H., Yarimizu, K., and Holland, N. A. (2018). The B-vitamin mutualism between the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* and the bacterium *Dinoroseobacter shibae*. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–12.
- Doxey, A. C., Kurtz, D. A., Lynch, M. D., Sauder, L. A., and Neufeld, J. D. (2015). Aquatic metagenomes implicate Thaumarchaeota in global cobalamin production. *ISME J.* 9, 461–471. doi:10.1038/ismej.2014.142.
- Franklin, D., Steinke, M., Young, J., Probert, I., and Malin, G. (2010). Dimethylsulphoniopropionate (DMSP), DMSP-lyase activity (DLA) and dimethylsulphide (DMS) in 10 species of coccolithophore. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 410, 13–23. doi:10.3354/meps08596.
- Gobler, C. J., Norman, C., Panzeca, C., Taylor, G. T., and Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2007). Effect of B-vitamins (B₁, B₁₂) and inorganic nutrients on algal bloom dynamics in a coastal ecosystem. *Aquat. Microb. Ecol.* 49, 181–194.
- Havskum, H., and Riemann, B. (1996). Ecological importance of bacterivorous, pigmented flagellates (mixotrophs) in the Bay of Aarhus, Denmark. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 137, 251–263. doi:10.3354/meps137251.
- Helliwell, K. E., Pandhal, J., Cooper, M. B., Longworth, J., Kudahl, U. J., Russo, D. A., et al. (2018). Quantitative proteomics of a B₁₂-dependent alga grown in coculture with bacteria reveals metabolic tradeoffs required for mutualism. *New Phytol.* 217, 599–612. doi:10.1111/nph.14832.
- Jardillier, L., Zubkov, M. V., Pearman, J., and Scanlan, D. J. (2010). Significant CO₂ fixation by small prymnesiophytes in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean. *ISME J.* 4, 1180–1192. doi:10.1038/ismej.2010.36.
- Kazamia, E., Czesnick, H., Van Nguyen, T. T., Croft, M. T., Sherwood, E., Sasso, S., et al. (2012). Mutualistic interactions between vitamin B₁₂-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environ. Microbiol.* 14, 1466–1476.
- Keller, M. D., Bellows, W. K., and Guillard, R. R. L. (1989). “Dimethyl Sulfide Production in Marine Phytoplankton,” in *Biogenic Sulfur in the Environment*, eds. E. S. Saltzman and W. J. Cooper (Washington, DC: American Chemical Society), 167–182. doi:10.1021/bk-1989-0393.ch011.
- Koch, F., Marcoval, M. A., Panzeca, C., Bruland, K. W., Sañudo-Wilhelmy, S. A., and Gobler, C. J. (2011). The effect of vitamin B₁₂ on phytoplankton growth and community structure in the Gulf of Alaska. *Limnol. Oceanogr.* 56, 1023–1034.

- 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.
- Legrand, C. (2001). Phagotrophy and toxicity variation in the mixotrophic *Prymnesium patelliferum* (Haptophyceae). *Limnol. Oceanogr.* 46, 1208–1214. doi:10.4319/lo.2001.46.5.1208.
- Liu, H., Probert, I., Uitz, J., Claustre, H., Aris-Brosou, S., Frada, M., et al. (2009). Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains major pigment paradox in open oceans. *Proceeding Natl. Acad. Sci.* 31, 1–6.
- Liu, Z., Campbell, V., Heidelberg, K. B., and Caron, D. A. (2016). Gene expression characterizes different nutritional strategies among three mixotrophic protists. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiw106. doi:10.1093/femsec/fiw106.
- Luo, H., and Moran, M. A. (2014). Evolutionary Ecology of the Marine Roseobacter Clade. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 78, 573–587. doi:10.1128/MMBR.00020-14.
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., et al. (2012). SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *GigaScience* 1, 18. doi:10.1186/2047-217X-1-18.
- Martens, J.-H., Barg, H., Warren, M. J., and Jahn, D. (2002). Microbial production of vitamin B₁₂. *Appl. Microb. Biotechnol.*
- Milliman, J. D. (1993). Production and accumulation of calcium carbonate in the ocean: Budget of a nonsteady state. *Glob. Biogeochem. Cycles* 7, 927–957. doi:10.1029/93GB02524.
- Nef, C. (2019). *Métabolisme et interactions bactériennes en lien avec la vitamine B₁₂ chez la microalgue haptophyte Tisochrysis lutea*. Université de Nantes.
- Nef, C., Jung, S., Mairet, F., Kaas, R., Grizeau, D., and Garnier, M. (2019). How haptophytes microalgae mitigate vitamin B₁₂ limitation. *Sci. Rep.* 9, 8417. doi:10.1038/s41598-019-44797-w.
- Not, F., Latasa, M., Scharek, R., Viprey, M., Karleskind, P., Balagué, V., et al. (2008). Protistan assemblages across the Indian Ocean, with a specific emphasis on the picoeukaryotes. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* 55, 1456–1473. doi:10.1016/j.dsr.2008.06.007.
- O’Brien, C. J., Peloquin, J. A., Vogt, M., Heinle, M., Gruber, N., Ajani, P., et al. (2013). Global marine plankton functional type biomass distributions: coccolithophores. *Earth Syst. Sci. Data* 5, 259–276. doi:10.5194/essd-5-259-2013.
- Panzeca, C., Beck, A. J., Tovar-Sanchez, A., Segovia-Zavala, J., Taylor, G. T., Gobler, C. J., et al. (2009). Distributions of dissolved vitamin B₁₂ and Co in coastal and open-ocean environments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 85, 223–230. doi:10.1016/j.ecss.2009.08.016.
- Panzeca, C., Tovar-Sanchez, A., Agusti, S., Reche, I., Duarte, C. M., Taylor, G. T., et al. (2006). B vitamins as regulators of phytoplankton dynamics. *Eos Trans. Am. Geophys. Union* 49, 594–596.
- Provasoli, C. (1974). “Vitamins and growth regulation,” in *Algal physiology and biochemistry* Botanical monographs. (University of California Press), 741–787.

- Raux, E., Lanois, A., Levillayer, F., Warren, M. J., Brody, E., Rambach, A., et al. (1996). Salmonella typhimurium cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes: functional studies in S. typhimurium and Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 178, 753–767.
- Raux, E., Schubert, H. L., and Warren, M. J. (2000). Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂): a bacterial conundrum. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1880–1893.
- Romine, M. F., Rodionov, D. A., Maezato, Y., Osterman, A. L., and Nelson, W. C. (2017). Underlying mechanisms for syntrophic metabolism of essential enzyme cofactors in microbial communities. *ISME J.* 11, 1434–1446. doi:10.1038/ismej.2017.2.
- Sañudo-Wilhelmy, S. A., Gobler, C. J., Obkamichael, M., and Taylor, G. T. (2006). Regulation of phytoplankton dynamics by vitamin B₁₂. *Geophys. Res. Lett.* 33, 1–4.
- Segev, E., Wyche, T. P., Kim, K. H., Petersen, J., Ellebrandt, C., Vlamakis, H., et al. (2016). Dynamic metabolic exchange governs a marine algal-bacterial interaction. *eLife* 5, e17473. doi:10.7554/eLife.17473.
- Seyedsayamdost, M. R., Carr, G., Kolter, R., and Clardy, J. (2011a). Roseobacticides: Small Molecule Modulators of an Algal-Bacterial Symbiosis. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 18343–18349. doi:10.1021/ja207172s.
- Seyedsayamdost, M. R., Case, R. J., Kolter, R., and Clardy, J. (2011b). The Jekyll-and-Hyde chemistry of Phaeobacter gallaeciensis. *Nat. Chem.* 3, 331–335. doi:10.1038/nchem.1002.
- Shelford, E. J., and Suttle, C. A. (2018). Virus-mediated transfer of nitrogen from heterotrophic bacteria to phytoplankton. *Biogeosciences* 15, 809–819. doi:10.5194/bg-15-809-2018.
- Tang, Y. Z., Koch, F., and Gobler, C. J. (2010). Most harmful algal bloom species are vitamin B₁ and B₁₂ auxotrophs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 20756–20461.
- Thomsen, H., Buck, K. R., and Chavez, F. P. (1994). “Haptophytes as components of marine phytoplankton,” in *The Haptophyte Algae* (Clarendon Press, Oxford), 187–208.
- Unrein, F., Gasol, J. M., Not, F., Forn, I., and Massana, R. (2014). Mixotrophic haptophytes are key bacterial grazers in oligotrophic coastal waters. *ISME J.* 8, 164–176. doi:10.1038/ismej.2013.132.
- Vallenet, D., Calteau, A., Cruveiller, S., Gachet, M., Lajus, A., Josso, A., et al. (2017). MicroScope in 2017: an expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* 45, D517–D528. doi:10.1093/nar/gkw1101.

Chapitre 5

Synthèse globale



Sommaire

- 5.1 Les Haptophytes seraient en majorité auxotrophes pour la vitamine B₁₂ 211
 - 5.2 La substitution de l'apport en vitamine B₁₂ par des bactéries n'est pas encore possible pour la culture à grande échelle de *T. lutea*. 212
 - 5.3 Un manque de vitamine B₁₂ pourrait impacter la contribution globale des Haptophytes à la production primaire et au cycle du soufre . . . 214
 - 5.4 Notre étude suggère un lien entre la synthèse de DMSP par les Haptophytes et l'auxotrophie pour la vitamine B₁₂ 216
 - 5.5 Proposition d'un modèle d'interactions microbiennes entre les Haptophytes et les procaryotes à travers la vitamine B₁₂ et le DMSP 217
-

Les questionnements de cette thèse relevaient d'une part de problématiques d'ordre fondamental, afin de mieux comprendre le rôle de la vitamine B₁₂ dans la structuration des communautés microbiennes dans les écosystèmes marins, et également d'ordre plus appliqué, pour estimer si la culture de *Tisochrysis lutea* avec des bactéries productrices de cobalamine était réalisable et applicable dans un contexte de culture à grande échelle. Nos travaux apportent des réponses, ou des éléments de réponse, à ces questions et sont les premiers à avoir apporté des informations sur l'utilisation de la vitamine B₁₂ chez les Haptophytes et leurs interactions avec des bactéries pour ce cofacteur.

5.1 Les Haptophytes seraient en majorité auxotrophes pour la vitamine B₁₂

Le premier objectif de cette thèse était d'estimer la plasticité physiologique de *T. lutea* envers la disponibilité en vitamine B₁₂ dans le milieu et les mécanismes moléculaires associés. Nous avons tout d'abord estimé la proportion d'espèces auxotrophes pour la vitamine B₁₂ chez les Haptophytes afin d'identifier si notre étude sur l'utilisation de cette vitamine par *T. lutea* pouvait être considérée comme représentative de ce taxon. Pour cela, nous avons adopté une approche *in silico* en recherchant les gènes codant pour les deux isoformes de méthionine synthase pour les espèces dont les données génomiques et transcriptomiques étaient disponibles (chapitre 2). Du fait du peu d'espèces d'Haptophytes dont le génome est séquencé, la majeure partie des données utilisées sont issues d'analyses transcriptomiques. Sur la base de l'absence du gène *metE* chez les 19 souches investiguées, représentant les différents ordres taxonomiques, nous proposons que les microalgues haptophytes formeraient un groupe homogène constitué uniquement d'espèces auxotrophes pour la vitamine B₁₂ (Nef et al., 2019). Nous avons croisé nos résultats avec la recherche de séquences métagénomiques et métatranscriptomiques dans la base de données MATOU (Tara Océans), dont les résultats ont confirmé l'absence du gène et du transcrit de la *metE* chez les Haptophytes dans les échantillons naturels. La répartition de la dépendance à la cobalamine chez les Haptophytes n'aurait pas de lien avec les zones plus ou moins concentrées en vitamine B₁₂. Nos résultats nécessitent d'être confirmés par des cultures de microalgues haptophytes carencées en vitamine B₁₂ en prenant soin de limiter au maximum la contamination bactérienne des cultures. Nos travaux suggèrent que l'ancêtre commun des Haptophytes n'encodait pas la copie du gène *metE*.

La théorie de la Reine Noire, avancée par [Morris et al. \(2012\)](#), propose un phénomène de réduction de la taille des génomes pour certains organismes. Cette théorie expliquerait la raison pour laquelle des microorganismes sont dépendants d'autres pour des fonctions métaboliques indispensables. Les métabolites dont la synthèse n'est plus possible pourraient être obtenus dans le milieu extracellulaire à partir d'autres microorganismes retrouvés généralement en association. La perte de certains gènes permettrait de limiter les coûts métaboliques associés au maintien de la fonction. Cette théorie pourrait s'appliquer à notre hypothèse de l'absence du gène *metE* chez les Haptophytes du fait de la présence d'une source de vitamine B₁₂ dans l'environnement proche de l'ancêtre commun des Haptophytes.

5.2 La substitution de l'apport en vitamine B₁₂ par des bactéries n'est pas encore possible pour la culture à grande échelle de *T. lutea*

Le second objectif de nos travaux était de définir quelles pourraient être les conditions environnementales qui permettraient à une bactérie productrice de B₁₂ d'assurer la croissance de *T. lutea*. L'ajout de bactéries comme seule source de vitamine B₁₂ permettrait de s'affranchir de l'intrant vitaminique et d'occuper une niche écologique, rendue indisponible pour l'installation de bactéries potentiellement pathogènes. Une telle culture mixte pourrait être particulièrement intéressante pour des applications biotechnologiques du fait d'une robustesse améliorée ([Tandon et al., 2017](#)). Aussi, la reminéralisation de la matière organique algale par les bactéries hétérotrophes rendrait de nouveau disponible des éléments nutritifs pour les algues, permettant de limiter les apports externes. Comme l'ont montré les résultats du chapitre 4, la culture avec une communauté bactérienne complexe et l'ajout de bactéries productrices de vitamine B₁₂ dans des culture de *T. lutea* n'ont pas permis d'obtenir une biomasse importante de la microalgue lors d'une carence en ce cofacteur.

Néanmoins, nos résultats apportent des informations importantes sur les modalités d'interactions entre microalgues et bactéries productrices de cobalamine. Tout d'abord, la comparaison de nos résultats de co-culture avec une bactérie capable de soutenir la croissance de certaines microalgues en carence en B₁₂ avec les données de la littérature nous

amènent à conclure que certaines bactéries productrices de la vitamine semblent délivrer le cofacteur à certaines espèces de microalgues dans des interactions espèces-spécifiques. Nous émettons l'hypothèse que ces interactions pourraient être liées à l'attachement des bactéries aux microalgues et/ou à la production de molécules d'information chimique donnant lieu à des échanges de nutriments. L'étude des molécules organiques excrétées par les Haptophytes en carence et en limitation en vitamine B₁₂ permettrait d'identifier si des facteurs de croissance particuliers peuvent être rendus disponibles pour des bactéries et favoriser des interactions directes.

D'autre part, nous avons exploré le potentiel de transfert indirect de la vitamine des bactéries à *T. lutea*. Nos cultures sur extrait bactérien riche en cobalamine ont montré une croissance significative de *T. lutea*, ce qui démontre que la microalgue est capable d'assimiler la vitamine provenant de bactéries détruites. Bien que nous n'ayons pas observé de lyse des bactéries en co-culture avec la microalgue, nous proposons que la lyse des bactéries hétérotrophes suite à une infection virale et/ou l'émission de composés lytiques pourrait constituer un moyen pour certaines Haptophytes d'acquérir la vitamine. Des co-cultures de microalgues haptophytes appartenant à différents ordres taxonomiques avec les bactéries sélectionnées dans le chapitre 4 permettraient d'éclaircir le niveau de spécificité des interactions microbiennes pour la cobalamine. En effet, si la croissance de certaines espèces d'Haptophytes était favorisée par rapport à d'autres, cela signifierait que les interactions mutualistes peuvent être espèces-spécifiques.

Il a été montré que les microorganismes capables de mixotrophie sont répartis de façon cosmopolite dans les océans (Faure et al., 2019). Les Haptophytes sont des microalgues capables de réaliser la mixotrophie et plus particulièrement la phagotrophie d'autres microorganismes, dont des bactéries. Nous suggérons que la consommation de bactéries et/ou d'Archées par phagotrophie pourrait constituer une source de vitamine B₁₂ potentielle pour certaines microalgues haptophytes, leur permettant de survivre dans les environnements carencés en ce cofacteur. Les futurs travaux visant à étudier les interactions Haptophytes-procaryotes pour la vitamine devraient donc prendre en considération les aspects suivants : suivre l'évolution des concentrations des bactéries et/ou Archées en plus de celle des microalgues, quantifier la mortalité cellulaire des espèces, mesurer les flux de vitamine dans les cultures avec, par exemple, l'utilisation d'une source de cobalt marquée (type ⁵⁷Co) et vérifier si les bactéries sont retrouvées attachées aux microalgues voire dans des vésicules d'endocytose.

5.3 Un manque de vitamine B₁₂ pourrait impacter la contribution globale des Haptophytes à la production primaire et au cycle du soufre

Par la suite, nous avons observé que l'expression des gènes du cycle de la méthionine, le métabolisme clé nécessitant la vitamine B₁₂, était finement régulée en fonction du quota en vitamine (chapitre 2). Nous avons procédé à la caractérisation de la réponse physiologique de *T. lutea* limité en cobalamine en couplant des approches d'analyse de métabolites avec de la protéomique (chapitre 3). Ces analyses nous ont permis de faire le lien entre les modifications phénotypiques et les changements analysés au niveau du protéome. En particulier, un effet important du manque de cobalamine sur l'allocation du carbone entre les différents compartiments biochimiques, et potentiellement sur l'activité photosynthétique, a été observé. Lors de la limitation en vitamine B₁₂, la sous-accumulation de nombreuses protéines de la glycolyse/néoglucogenèse et du cycle de Krebs semblent induire une surproduction des lipides au détriment des sucres.

Des informations importantes sont encore manquantes pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse physiologique des Haptophytes à un manque de vitamine B₁₂. L'identification d'une protéine d'acquisition de la cobalamine, qui n'a été effectuée que chez les Straménopiles. Chez les Haptophytes, l'identification d'une telle protéine permettrait de comprendre comment la B₁₂ est transportée dans la cellule, et si ce transport est régulé selon l'apport externe de la vitamine. Nous avons proposé une liste de protéines candidates dont la fonction nécessite d'être étudiée par des approches fonctionnelles. Par exemple, l'utilisation de mutants générés par une méthodologie CRISPR/Cas9 n'exprimant plus ces protéines permettrait de mieux comprendre leur fonction.

La vitamine B₁₂ est liée indirectement aux réactions de transferts de groupements méthyle dans la cellule par son implication dans la production de S-adenosyl méthionine, un métabolite donneur de groupements méthyle. La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique qui contrôle l'expression des gènes. Une étude récente sur la Diatomée *Phaeodactylum tricornutum* a montré que des mécanismes épigénétiques, tels que la régulation des niveaux d'expression des histones et des éléments transposables, pouvaient jouer un rôle important dans la réponse physiologique de l'algue aux variations

de son environnement (Huang et al., 2019). Il a été suggéré que la mobilité des éléments transposables de cette algue pourrait être largement influencée par des phénomènes de méthylation de leur séquence d'ADN (Veluchamy et al., 2013). L'étude de Bertheliet al. (2018) sur *T. lutea* a montré que près de 20 % du génome de l'algue étaient composés d'éléments transposables et que plusieurs de ces familles étaient transcrites et traduites chez cette espèce. Ces informations nous amènent à proposer que les variations physiologiques de *T. lutea* en fonction de la disponibilité en vitamine B₁₂ pourraient être finement liées à des modifications épigénétiques. L'étude du méthylome de *T. lutea* permettrait d'identifier les gènes dont les niveaux de méthylation varient en fonction du quota de B₁₂, et dont la fonction pourrait être liée aux modifications physiologiques observées. Des mesures du contenu en S-adenosyl méthionine, comme cela a été fait par des approches de métabolomique lors des travaux de Heal et al. (2019), couplées avec l'analyse des niveaux d'expression des méthyltransférases utilisant ce métabolite comme donneur de groupement méthyle apporterait également un autre niveau d'information sur le lien entre l'allocation de la méthionine et les fonctions cellulaires afférentes.

Nous avons démontré expérimentalement qu'une limitation en vitamine B₁₂ affecte les patrons d'allocation de la méthionine entre la synthèse des protéines et du DMSP et réduisait significativement la synthèse de ce dernier. La production du DMSP reste cependant active. Les Haptophytes sont ubiquistes et sont parmi les principales espèces de microalgues produisant du DMSP. Étendues plus largement au groupe des Haptophytes, nos résultats indiquent que le niveau de disponibilité de vitamine B₁₂ régulerait la contribution de ces microalgues à la production primaire et au cycle du soufre. Les protéines impliquées dans la synthèse du DMSP à partir de méthionine sont très mal connues chez les microalgues. Dans nos travaux, nous avons tenté d'identifier des protéines candidates potentiellement impliquées dans des étapes de la synthèse de ce métabolite mais leur fonction n'a pas pu être validée. L'utilisation d'approches permettant la surexpression de ces protéines combinées à des approches enzymatiques pourraient permettre de confirmer leur fonction putative. Des expériences supplémentaires, telles que l'étude de l'expression des gènes encodant ces protéines à différents niveaux de limitation en vitamine B₁₂ ou l'analyse de la production de DMSP par des mutants sous-exprimant ces gènes, pourrait permettre de vérifier leur rôle dans la synthèse de ce métabolite ainsi que d'améliorer notre compréhension du rôle physiologique du DMSP chez les microalgues.

5.4 Notre étude suggère un lien entre la synthèse de DMSP par les Haptophytes et l'auxotrophie pour la vitamine B₁₂

Sachant que l'auxotrophie pour la cobalamine chez les microalgues implique l'obtention du cofacteur à partir d'une source procaryotique, de façon directe ou indirecte, nous proposons que la production de DMSP par les Haptophytes serait régulée par les communautés de bactéries et d'Archées associées à ces microalgues. En conséquence, la composition taxonomique de la communauté bactérienne et sa productivité seraient des facteurs clé contrôlant l'export de DMSP par les Haptophytes. Un autre groupe de microalgues présente des caractéristiques similaires. En effet, les Dinoflagellés seraient en majorité (estimée à plus de 90 %) auxotrophes pour la B₁₂ et produisent de grandes quantités de DMSP (Tang et al., 2010). À première vue, dépendre de la phagotrophie, de l'excrétion ou de la lyse bactérienne pour accéder à un élément nutritif vital semblerait être un désavantage dans les systèmes oligotrophes. Cependant, le succès écologique des Haptophytes et des Dinoflagellés n'est plus à démontrer, ces deux groupes étant retrouvés dans la plupart des systèmes océaniques et côtiers et contribuant grandement à la production primaire.

Les travaux récents d'analyse des communautés planctoniques issues des données Tara Océans ont montré que les exclusions mutuelles d'organismes étaient largement minoritaires par rapport aux co-occurrences (Lima-Mendez et al., 2015). Les interactions entre organismes planctoniques sont donc un point clé dans le façonnement et la structuration des communautés. Si nous nous référons à la théorie de la Reine Noire telle qu'expliquée précédemment, nous pouvons avancer l'hypothèse que les Haptophytes et les Dinoflagellés, ou leurs ancêtres, auraient potentiellement vécu en association avec des bactéries et/ou Archées capables de synthétiser la vitamine B₁₂. Ceci aurait permis à ces microalgues de s'affranchir du coût métabolique élevé (Bertrand et al., 2012) associé à l'activité d'une méthionine synthase B₁₂-indépendante. Les synthèses de méthionine et de DMSP pour ces groupes seraient potentiellement moins coûteuses que pour les espèces avec le gène *metE*. En conséquence, l'auxotrophie pour la vitamine B₁₂ pourrait être un avantage chez les Haptophytes et Dinoflagellés.

5.5 Proposition d'un modèle d'interactions microbiennes entre les Haptophytes et les procaryotes à travers la vitamine B₁₂ et le DMSP

Le couplage des outils de métabolomique et des approches prédictives basées sur les données de métagénomique permet de caractériser de façon globale les potentialités des communautés microbiennes, leurs besoins en éléments nutritifs et les capacités de biosynthèse des membres les composant. Ainsi, les études récentes sur le fonctionnement de ces communautés mettent de plus en plus en avant la complémentarité réciproque en facteurs de croissance des microorganismes composant ces populations (Garcia et al., 2015 ; Romine et al., 2017).

En ce qui concerne les microalgues Haptophytes, leur forte production de DMSP est d'autant plus intéressante que ce métabolite est une molécule de communication chimique impliquée dans la médiation des interactions microbiennes dans le milieu marin. D'autre part, de nombreuses études ont montré que le DMSP est une source de carbone et de soufre consommée préférentiellement par certaines Protéobactéries et plus particulièrement les clades d'Alpha-protéobactéries ubiquistes SAR11 et SAR86 (Kiene et al., 1999 ; Tripp et al., 2008 ; Dupont et al., 2012 ; Del Valle et al., 2015), ainsi que les *Rhodobacteraceae* (González et al., 1999, 2000 ; Howard et al., 2008 ; Zeng et al., 2016). La plupart des espèces des clades SAR86 et des *Roseobacter* encodent des voies de biosynthèse de la vitamine B₁₂ (Luo and Moran, 2014).

Ces informations nous conduisent à poser la question suivante : la production de B₁₂ et la dégradation de DMSP par les bactéries sont-elles liées ? En d'autres termes, est-ce que les taxons procaryotes ayant la capacité d'assimiler le DMSP produit par les microalgues sont aussi producteurs de cobalamine ? Le DMSP pourrait potentiellement être impliqué dans la régulation des échanges entre microalgues auxotrophes pour la cobalamine et organismes procaryotes capables de produire la vitamine B₁₂.

En conséquence, nous proposons un modèle d'interactions entre les Haptophytes et les communautés de procaryotes en posant l'hypothèse que certains procaryotes associés à ces microalgues pourraient bénéficier de l'excrétion du DMSP. Ainsi, l'association continue de ces bactéries et/ou Archées avec les Haptophytes et leur ancêtre commun au cours de l'évolution aurait pu constituer une source récurrente de B₁₂. Il est

possible que les communautés de procaryotes ainsi liées aux Haptophytes puissent leur apporter d'autres éléments nutritifs, augmentant ainsi leur fitness.

Notre hypothèse pourrait être vérifiée en commençant tout d'abord par identifier les communautés de bactéries et d'Archées retrouvées en association avec les Haptophytes. Ceci pourrait être réalisé en explorant les données environnementales issues par exemple du projet Tara Océans, ce qui permettrait d'obtenir une cartographie globale des associations (voir les exemples de cartographie des taxons présentés dans [Swan et al. \(2013\)](#) et [Faure et al. \(2019\)](#) et les exemples d'associations décrits par [Lima-Mendez et al. \(2015\)](#)). L'utilisation d'approches prédictives, telles que celles appliquées lors des travaux de [Romaine et al. \(2017\)](#), permettrait d'identifier les potentialités métaboliques (synthèse d'hormones, de cofacteurs, diazotrophie) de ces communautés, dont la répartition de leur capacité à assimiler le DMSP.

Ces approches *in silico* devront être validées et affinées par des approches culturelles. Les interactions entre les microorganismes sont souvent caractérisées par la diffusion de composés dans le milieu extracellulaire. Les outils d'exométabolomique permettent d'identifier et de quantifier les composés extracellulaires. En conjonction avec des analyses génomiques, il devient ainsi possible de relier les composés aux organismes disposant de l'équipement génétique pour les synthétiser ([Wienhausen et al., 2017](#)). L'ajout de mesures ciblées de composés d'intérêt utilisant, par exemples, des marqueurs (fluorescents, isotopiques, etc.) permettrait de suivre les flux des métabolites dans les systèmes. Les résultats obtenus apporteraient des éléments de réponse importants sur le fonctionnement et l'évolution des associations Haptophytes-procaryotes dans le milieu naturel ainsi que plus largement sur la structuration des communautés microbiennes.

Références bibliographiques

- Abreu-Goodger, C. and Merino, E. (2005). RibEx : a web server for locating riboswitches and other conserved bacterial regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, 33 :690–692.
- Alcock, S. C., Fingals, P. M., and Morgan, M. R. (1992). Production and purification of an R-protein-enzyme conjugate for use in a microtitration plate protein-binding assay for vitamin b₁₂ in fortified food. *Food Chemistry*, 45 :199–203.
- Alipanah, L., Rohloff, J., Winge, P., Bones, A. M., and Brembu, T. (2015). Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Experimental Botany*, 66 :6281–6296.
- Allen, A. E., Dupont, C. L., Obornik, M., et al. (2011). Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature*, 473 :203–209.
- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59 :143–169.
- 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., Djunaedi, B., Ingalls, A. E., Parsek, M. R., Moran, M. A., and Armbrust, E. V. (2015). Interactions and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and its associated bacteria. *Nature*, 522 :98–101.
- Amin, S. A., Parker, M. S., and Armbrust, E. V. (2012). Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76 :667–684.
- Andersen, R. A. (2004). Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. *American journal of Botany*, 91 :1508–1522.
- Andersen, R. A. (2005). Algae and the vitamin mosaic. *Nature*, 438 :33–35.
- Anderson, R., Charvet, S., and Hanse, P. J. (2018). Mixotrophy in chlorophytes and haptophytes-effect of irradiance, macronutrient, micronutrient and vitamin limitation. *Frontiers in Microbiology*, 9 :1–13.

- Arsalane, W., Rousseau, B., and Duval, J.-C. (2011). Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom : competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochemistry and Photobiology*, 30 :237–243.
- Azam, F. and Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5 :782–791.
- Banerjee, R. V. (2006). B₁₂ trafficking in mammals : a case for coenzyme escort service. *ACS Chemical Biology*, 1 :149–159.
- Banerjee, R. V. and Matthews, R. G. (1990). Cobalamin-dependent methionine synthase. *The FASEB Journal*, 5 :1450–1459.
- Banerjee, R. V. and Ragsdale, S. W. (2003). The many faces of vitamin B₁₂ : catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 72 :209–247.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulilov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prijbelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., and Pevzner, P. A. (2012). SPAdes : a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19 :455–477.
- Barak-Gavish, N., Frada, M. J., Ku, C., Lee, P. A., DiTullio, G. R., Malitsky, S., Aharoni, A., Green, S. J., Rotkopf, R., Kartvelishvily, E., Sheyn, U., Schatz, D., and Vardi, A. (2018). Bacterial virulence against an oceanic bloom-forming phytoplankter is mediated by algal dmsp. *Science Advances*, 4 :1–12.
- Barclay, W. R. and Meager, K. M. and Abril, J. R. (1994). Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 6 :123–129.
- Baroukh, C., Muñoz Tamayo, R., Steyer, J.-P., and Bernard, O. (2014). DRUM : a new framework for metabolic modeling under non-balanced growth. Application to the carbon metabolism of unicellular microalgae. *Plos One*, 9 :e104499.
- Bell, W. and Mitchell, R. (1972). Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *The Biological Bulletin*, 143 :265–277.

- Bender, S. J., Parker, M. S., and Armbrust, E. V. (2012). Coupled effects of light and nitrogen source on the urea cycle and nitrogen metabolism over a diel cycle in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Protist*, 163 :232–251.
- Bendif, E., Probert, I., Schroeder, D. C., and de Vargas, C. (2013). On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta). *Journal of Applied Phycology*, 25 :1763–1776.
- Bendif, E. M., Probert, I., Hervé, A., Billard, C., Goux, D., Lelong, C., Cadoret, J.-P., and Véron, B. (2011). Integrative taxonomy of the Pavlovophyceae (Haptophyta) : a reassessment. *Protist*, 162 :738–761.
- Bengert, P. and Dandekar, T. (2004). Riboswitch finder - a tool for identification of riboswitch RNAs. *Nuclei Acids Research*, 32 :154–159.
- Benner, S. A., Ellington, A. D., and Thauer, A. (1989). Modern metabolisms as a palimpsest of the RNA world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86 :7054–7058.
- Berthelie, J., Casse, N., Daccord, N., Jamilloux, V., Saint-Jean, B., and Carrier, G. (2018). A transposable element annotation pipeline and expression analysis reveal potentially active elements in the microalgae *Tisochrysis lutea*. *BMC Genomics*, 19.
- Bertrand, E. M. and Allen, A. E. (2012). Influence of vitamin B auxotrophy on nitrogen metabolism in eukaryotic phytoplankton. *Frontiers in Microbiology*, 3 :1–16.
- Bertrand, E. M., Allen, A. E., Dupont, C. L., Norden-Krichmar, T. M., Bai, J., Valas, R. E., and Saito, M. A. (2012). Influence of cobalamin scarcity on diatom molecular physiology and identification of a cobalamin acquisition protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pages 1762–1771.
- Bertrand, E. M., Saito, M. A., Jeon, Y. J., and Neilan, B. A. (2011). Vitamin B₁₂ biosynthesis gene diversity in the Ross sea : the identification of a new group of putative polar B₁₂ biosynthesizers. *Environmental Microbiology*, 13 :1285–1298.
- Bertrand, E. M., Saito, M. A., Rose, J. M., Riesselman, C. R., Lohan, M. C., Noble, A. E., Lee, P. A., and DiTullio, G. R. (2007). Vitamin B₁₂ and iron colimitation of phytoplankton growth in the Ross Sea. *Limnology and Oceanography*, 52 :1079–1093.

- Betrand, E. M., Moran, D. M., McIlvin, M. R., Hoffman, J. M., Allen, A. E., and Saito, M. A. (2013). Methionine synthase interreplacement in diatom cultures and communities : Implications for the persistence of B₁₂ use by eukaryotic phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 58 :1431–1450.
- Bik, H. M., Porazinska, D. L., Creer, S., Caporaso, J. G., Knight, R., and Thomas, W. K. (2012). Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 27 :233–243.
- Bird, D. F. and Kalff, J. (1984). Empirical relationships between bacterial abundance and chl_a concentration in fresh and marine waters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41 :1015–1023.
- Blackwell, J. R. and Gilmour, D. J. (1991). Physiological response of the unicellular green alga *Chlorococcum submarinum* to rapid changes in salinity. *Archives in Microbiology*, 157 :86–91.
- Blein-Nicolas, M. and Zivy, M. (2016). Thousand and one ways to quantify and compare protein abundances in label-free bottom-up proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864 :883–895.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30 :2114–2120.
- Bonnet, S., Tovar-Sanchez, A., Panzeca, C., Duarte, C. M., Ortega-Retuerta, E., and Sañudo-Willelmy, S. A. (2013). Geographical gradients of dissolved vitamin B₁₂ in the Mediterranean Sea. *Frontiers in Microbiology*, 4 :1–10.
- Bonnet, S., Webb, E. A., Panzeca, C., Karl, D. M., Capone, D. G., and Sañudo-Willelmy, S. A. (2010). Vitamin B₁₂ excretion by cultures of the marine cyanobacteria *Crocosphaera* and *Synechococcus*. *Limnology and Oceanography*, 55 :1959–1964.
- Borovok, I., Gorovitz, B., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., and Cohen, G. (2006). Coenzyme B₁₂ controls transcription of the *Streptomyces* class Ia ribonucleotide reductase *nrdABS* operon via a riboswitch mechanism. *Journal of Bacteriology*, 188 :2512–2520.
- Borowitzka, M. A. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7 :3–15.

- Bosi, E., Donati, B., Galardini, M., Brunetti, S., Sagot, M. F., Lio, P., Crescenzi, P., Fani, R., and Fondi, M. (2015). MeDuSa : a multi-draft based scaffolder. *Bioinformatics*, 15 :2443–2451.
- Bougaran, G., Rouxel, C., Dubois, N., Kaas, R., Grouas, S., Lukomska, E., Le Coz, J.-R., and Cadoret, J.-P. (2012). Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga *Isochrysis affinis galbana* (T-Iso) by a mutation-selection procedure. *Biotechnology and Bioengineering*, 109 :2737–2745.
- Breaker, R. R. (2012). Riboswitches and the RNA World. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4 :1–15.
- Breider, S., Freese, H. M., Sproer, C., Simon, M., Overmann, J., and Brinkhoff, T. (2017). *Phaeobacter porticola* sp. nov., an antibiotic-producing bacterium isolated from a sea harbour. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67 :2153–2159.
- Brembu, T., Winge, P., Tooming-Klunderud, A., Nederbragt, A. J., Jakobsen, K. S., and Bones, A. M. (2014). The chloroplast genome of the diatom *Seminavirus robusta* : new features introduced through multiple mechanisms of horizontal gene transfer. *Marine Genomics*, 16 :17–27.
- Brindley, A. A., Rayx, E., Leech, H. K., Schubert, H. L., and Warren, M. J. (2003). A story of chelatase evolution. *Journal of Biological Chemistry*, 278 :22388–22395.
- Brocks, J. J., Logan, G. A., Buick, R., and Summons, R. E. (1999). Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science*, 285 :1033–1036.
- Brown, K. L. (2005). Chemistry and enzymology of vitamin B₁₂. *Chemical Reviews*, 105 :2075–2149.
- Brune, D. E., Lundquist, T. J., and Benemann, J. R. (2009). Microalgal biomass for greenhouse gas reductions : potential replacement of fossil fuels and animal feeds. *Journal of Environmental Engineering*, 135 :1136–1144.
- Buchanan, R. E. (1918). Life phases in a bacterial culture. *The Journal of Infectious Diseases*, 23 :109–125.
- Bull, A. T. (2010). The renaissance of continuous culture in the post-genomics age. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37 :993–1021.

- Burke, S. and Krzycki, J. (1995). Involvement of the "A" isozyme of methyltransferase II and the 29 kilodalton corrinoid protein in methanogenesis from monomethylamine. *Journal of Bacteriology*, 177 :4410–4416.
- Burnham, J. C., Stetak, T., and Locher, G. (1976). Extracellular lysis of the blue-green alga *Phormidium luridum* by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Phycology*, 12 :306–313.
- Butzin, N. C., Secinaro, M. A., Swithers, K. S., Gogarten, J. P., and Noll, K. M. (2013). *Thermotoga lettingae* can salvage cobinamide to synthesize vitamin B₁₂. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 :7006–7012.
- Cadoret, J.-P., Bougaran, G., Bérard, J.-B., Carrier, G., Charrier, A., Coulombier, N., Garnier, M., Kaas, R., Le Déan, L., Lukomska, E., Nicolau, E., Rouxel, C., Saint-Jean, B., and Schreiber, N. (2014). Chapter 2 microalgae and biotechnology. In *Development of Marine Resources*, pages 57–116. Monaco, A. and Prouzet, P.
- Carlucci, A. F. and Silbernagel, S. B. (1966). Bioassay of seawater. III. Distribution of vitamin B₁₂ in the Northeast Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography*, 11 :642–646.
- Carrier, G. C., Baroukh, C., Rouxel, C., Duboscq-Bidot, L., Schreiber, N., and Bougaran, G. (2018). Draft genome and phenotypic characterization of *Tisochrysis lutea* strains. toward the production of domesticated strains with high added value. *Algal Research*, 29 :1–11.
- Carrier, G. C., Garnier, M., Le Cunff, L., Bougaran, G., Probert, I., De Vargas, C., Corre, E., Cadoret, J.-P., and Saint-Jean, B. (2014). Comparative transcriptome of wild type and selected strains of the microalgae *Tisochrysis lutea* provides insights into the genetic basis, lipid metabolism and the life cycle. *Plos One*, 9 :1–12.
- Caruana, A. M. N. and Amzil, Z. (2018). Chapter 13 microalgae and toxins. In *Microalgae in Health and Disease Prevention*, pages 1–44. Levine, I. and Fleurence, J.
- Challenger, F. (1951). Biological methylation. *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology*, 12 :429–491.
- Chamlagain, B., Edelmann, M., Kariluoto, S., Ollilainen, V., and Piironen, V. (2015). Ultra-high performance liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of active vitamin B₁₂ in cells of *Propionibacterium* and fermented cells. *Food Chemistry*, 166 :630–638.

- Charlson, R. J., Lovelock, J. E., Andreae, M. O., and Warren, S. G. (1987). Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature*, 326 :655–661.
- Charrier, A., Bérard, J.-B., Bougaran, G., Carrier, G., Lukomska, E., Schreiber, N., Fournier, F., Charrier, A. F., Rouxel, C., Garnier, M., Cadoret, J.-P., and Saint-Jean, B. (2015). High-affinity nitrate/nitrite transporter genes (*Nrt2*) in *Tisochrysis lutea* : identification and expression analyses reveal some interesting specificities of haptophyta microalgae. *Physiologia Plantarum*, 154 :572–590.
- Cheng, Z., Li, K., Hammad, L. A., Karty, J. A., and Bauer, C. E. (2014). Vitamin B₁₂ regulates photosystem gene expression via the CrtJ antirepressor AerR in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular Microbiology of Bacteriology*, 91 :649–664.
- Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B. P., Pardhasaradhi, K., and McCann, P. P. (1996). S-adenosylmethionine and methylation. *The FASEB Journal*, 10 :471–480.
- Cho, J.-Y., Choi, J.-S., Kong, I.-S., Park, S.-I., Kerr, R. G., and Hong, Y.-K. (2002). A procedure for axenic isolation of the marine microalga *Isochrysis galbana* from heavily contaminated mass cultures. *Journal of Applied Phycology*, 14.
- Cole, J. J. (1982). Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 13 :291–314.
- Cole, J. J., Findlay, S., and Pace, M. L. (1988). Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems : a cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series*, 43 :1–10.
- Cole, J. J., Likens, G. E., and Strayer, D. L. (1982). Photosynthetically produced dissolved organic carbon : an important carbon source for planktonic bacteria. *Limnology and Oceanography*, 27 :1080–1090.
- Cooper, M. B., Kazamia, E., Helliwell, K. E., Kudhal, U. J., Sayer, A., Wheeler, G. L., and Smith, A. G. (2019). Cross-exchange of B-vitamins underpins a mutualistic interaction between *Ostreococcus tauri* and *Dinoroseobacter shibae*. *The ISME Journal*, 2 :333–345.
- Corner, E. D. S. and Davies, A. G. (1971). Plankton as a factor in the nitrogen and phosphorus cycles in the sea. *Advances in Marine Biology*, 9 :101–204.

- Crenn, K. (2016). *Interactions entre microalgues et bactéries dans l'environnement marin*, page 303. Université Pierre et Marie Curis - Paris VI.
- Crenn, K., Duffieux, D., and Jeanthon, C. (2018). Bacterial epibiotic communities of ubiquitous and abundant marine diatoms are distinct in short- and long-term associations. *Frontiers in Microbiology*, 9 :1–12.
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., and Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 433 :90–93.
- Croft, M. T., Warren, M. J., and Smith, A. G. (2006). Algae need their vitamins. *Eukaryotic Cell*, 5 :1175–1183.
- Crowfoot-Hodgkin, D., , Pickworth, J., Robertson, J. H., Trueblood, K. N., Prosen, R. J., and White, J. G. (1955). Structure of vitamin B₁₂ : the crystal structure of the hexacarboxylic acid derived from B₁₂ and the molecular structure of the vitamin. *Nature*, 176 :325–328.
- Cruz-López, R., Maske, H., Yarimizu, K., and Holland, N. A. (2018). The B-vitamin mutualism between the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* and the bacterium *Dinoroseobacter shibae*. *Frontiers in Marine Science*, 5 :1–12.
- Cuvelier, M. L., Allen, A. E., Monier, A., McCrow, J. P., Messié, M., Tringe, S. G., Woyke, T., Welsh, R. M., Ishoey, T., Lee, J.-H., Binder, B. J., DuPont, C. L., Latasa, M., Guigand, C., Buck, K. R., Hilton, J., Thiagarajan, M., Caler, E., Read, B., Lasken, R. S., Chavez, F. P., and Worden, A. Z. (2010). Targeted metagenomics and ecology of globally important uncultured eukaryotic phytoplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 :14679–14684.
- Daisley, K. W. (1958). A method for the measurement of vitamin B₁₂ concentration in sea water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 37 :673–681.
- Dambach, M., Sandoval, M., Updegrove, T. B., Anantharaman, V., Aravind, L., Waters, L. S., and Storz, G. (2015). The ubiquitous *yybp-ykoy* riboswitch is a manganese-responsive regulatory element. *Molecular Cell*, 57 :1099–1109.
- Day, J. G., Gong, Y., and Hu, Q. (2017). Microzooplankton grazers - a potentially devastating threat to the commercial success of microalgal mass culture. *Algal Research*, 27 :356–365.

- de Vargas, C., Audie, S., Henry, N., Decelle, J., et al. (2015). Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348.
- De Veaux, L. C., Clevenston, D. S., Bradbeer, C., and Kadner, R. J. (1986). Identification of the BtuCED polypeptides and evidence for their role in vitamin B₁₂ transport in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 167 :920–927.
- Decelle, J., Probert, I., Bittner, L., Desdevises, Y., Colin, S., de Vargas, C., Galí, M., Simó, R., and Not, F. (2012). An original mode of symbiosis in open ocean plankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 :18000–18005.
- Deeds, J. R., Landsberg, J. H., Etheridge, S. M., Pitcher, G. C., and Longan, S. W. (2008). Non-traditional vectors for paralytic shellfish poisoning. *Marine Drugs*, 6 :308–348.
- Del Valle, D. A., Martínez-García, S., Sañudo Wilhelmy, S. A., Kiene, R. P., and Karl, D. M. (2015). Methionine and dimethylsulfoniopropionate as sources of sulfur to the microbial community of the North Pacific Subtropical Gyre. *Aquatic Microbial Ecology*, 75 :103–116.
- Dobson, C. M., Wai, T., Leclerc, D., Kadir, H., Narang, M., Lerner-Ellis, J. P., Hudson, T., Rosenblatt, D. S., and Gravel, R. A. (2002a). Identification of the gene responsible for the *cblB* complementation group of vitamin B₁₂-dependent methylmalonic aciduria. *Human Molecular Genetics*, 11 :3361–3369.
- Dobson, C. M., Wai, T., Leclerc, D., Wilson, A., Wu, X., Doré, C., Hudson, T., Rosenblatt, D. S., and Gravel, R. A. (2002b). Identification of the gene responsible for the *cblA* complementation group of vitamin B₁₂-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 :15554–15559.
- Dong, H.-P., Williams, E., Wang, D.-Z., Xie, Z.-X., Hsia, R.-C., Jenck, A., Halden, R., Li, J., Chen, F., and Place, A. R. (2013). Response of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to long-term nitrogen starvation and recovery. *Plant Physiology*, 162 :1110–1126.
- Doxey, A. D., Kurtz, D. A., Lynch, M. D. J., Sauder, L. A., and Neufeld, J. D. (2015). Aquatic metagenomes implicate *Thaumarchaeota* in global cobalamin production. *The ISME Journal*, 9 :461–471.

- Droop, M. (1955). A pelagic marine diatom requiring cobalamin. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 34 :229–231.
- Droop, M. (1968). Vitamin B₁₂ and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 48 :689–733.
- Droop, M. (1970). Vitamin B₁₂ and marine ecology. *Helgoländer wiss. Meeresunters*, 20 :629–636.
- Droop, M. (1974). The nutrient status of algal cells in continuous culture. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 54 :825–855.
- Droop, M. R. (2007). Vitamins, phytoplankton and bacteria : symbiosis or scavenging ? *Journal of Plankton Research*, 29 :107–113.
- Drummond, J. T., Huang, S., Blumenthal, R. M., and Matthews, R. G. (1993). Assignment of enzymatic function to specific protein regions of cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 32 :9290–9295.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 :350–356.
- Duda, J., Pedziwilk, Z., and Zodrow, K. (1967). Studies on the vitamin B₁₂ content of the leguminous plants. *Acta Microbiologica Polonica*, 6 :233–238.
- Dupont, C. L., Rusch, D. B., Yooseph, S., Lombardo, M.-J., Richter, R. A., Valas, R., Novotny, M., Yee-Greenbaum, J., Selengut, J. D., Haft, D. H., Halpern, A. L., Lasken, R. S., Neilson, K., Friedman, R., and Venter, J. C. (2012). Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage. *The ISME Journal*, 6 :1186–1199.
- 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., Kujawinski, E. B., Armbrust, E. V., and Moran, M. A. (2015). Cryptic carbon and sulfur cycling between surface ocean plankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 :453–457.

- Edwardsen, B., Egge, E. S., and Vaulot, D. (2016). Diversity and distribution of haptophytes revealed by environmental sequencing and metabarcoding. *Perspectives in Phycology*, 3 :77–91.
- Eikrem, W., Medlin, L. K., Henderiks, J., Rokitta, S., Rost, B., Probert, I., Throndsen, J., and Edwardsen, B. (2016). *Haptophyta*, pages 1–61. Springer International Publishing, Switzerland.
- Eixler, S., Karsten, U., and Selig, U. (2005). Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. 53–60 :1–27.
- Ellis, K. A., Cohen, N. R., Moreno, C., and Marchetti, A. (2017). Cobalamin-independent methionine synthase distribution and influence on vitamin B₁₂ growth requirements in marine diatoms. *Protist*, 168 :32–47.
- Endo, H., Hanawa, Y., Araie, H., Suzuki, I., and Shiraiwa, Y. (2018). Overexpression of *Ti-sochrysis lutea* Adk1 identifies a key cold-induced alkenone desaturase enzyme. *Scientific Reports*, 8 :1–10.
- Epstein, S. S., Burkovsky, I. V., and Shiaris, M. P. (1992). Ciliate grazing on bacteria, flagellates, and microalgae in temperate zone sandy tidal flat : ingestion rates and food niche partitioning. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 165 :103–123.
- Escalante-Semerena, J. C. (2007). Conversion of cobinamide into adenosylcobamide in bacteria and archaea. *Journal of Bacteriology*, 189 :4555–4560.
- Eschenmoser, A. (1974). Organische Naturstoffsynthese heute, Vitamin B₁₂ als Beispiel, journal = Naturwissenschaften. 61 :513–525.
- Eschenmoser, A. (1988). Vitamin B₁₂ experiments concerning the origin of its molecular structure. *Angewandte Chemie*, 27 :5–39.
- Falaise, C., François, C., Travers, M.-A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., and Mouget, J.-L. (2016). Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine Drugs*, 14 :1–27.

- Falkowski, P. G. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis research*, 39 :235–258.
- Falkowski, P. G. (2002). The ocean's invisible forest. *Scientific American*, 287 :54–61.
- Falkowski, P. G., Barber, R. T., and Smetacek, V. (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary productivity. *Science*, 281 :200–207.
- Faure, E., Not, F., Benoiston, A.-S., Labadie, K., Bittner, L., and Ayata, S.-D. (2019). Mixotrophic protists display contrasted biogeographies in the global ocean. *The ISME Journal*, 13 :1072–1083.
- Faust, K. and Raes, J. (2012). Microbial interactions : from networks to models. *Nature Reviews*, 10 :538–550.
- Ferry, J. (1992). Methane from acetate. *Journal of Bacteriology*, 174 :5489–5495.
- Fiala, M. and Oriol, L. (1984). Vitamin B₁₂ and phytoplankton in the Antarctic Ocean. Distribution and experimental approach. *Marine Biology*, 79 :325–332.
- Foster, M. A., Dilworth, M. J., and Woods, D. D. (1964). Cobalamin and the synthesis of methionine by *Escherichia coli*. *Nature*, 201 :39–42.
- Fournier, M. L., Paulson, A., Pavelka, N., Mosley, A. L., Gaudenz, K., Bradford, W. D., Glynn, E., Li, H., Sardi, M. E., Fleharty, B., Seidel, C., Florens, L., and Washburn, M. P. (2010). Delayed correlation of mRNA and protein expression in rapamycin-treated cells and a role for Ggc1 in cellular sensitivity to rapamycin. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9 :271–284.
- Franklin, D. J., Steinke, M., Young, J., Probert, I., and Malin, G. (2010). Dimethylsulphonio-propionate (dmSP), dmSP-lyase activity (dla) and dimethylsulphide (dms) in 10 species of coccolithophore. *Journal of Phycology*, 410 :13–23.
- Fuller, N. J., Tarran, G. A., Cummings, D. G., Woodward, E. M. S., Orcutt, K. M., Yallop, M., Le Gall, F., and Scanlan, D. J. (2006). Molecular analysis of photosynthetic picoeukaryote community structure along an Arabian Sea transect. *Limnology and Oceanography*, 51 :2502–2514.
- Furusawa, G., Yoshikawa, T., Yasuda, A., and Sakata, T. (2003). Algicidal activity and gliding motility of *Saprospira* sp. ss98-5. *Canadian Journal of Microbiology*, 49 :92–100.

- Furusawa, G., Yoshikawa, T., Yasuda, A., and Sakata, T. (2012). *Aquimarina salinaria* sp. nov., a novel algicidal bacterium isolated from a saltpan. *Archives of Microbiology*, 194 :103–112.
- Gage, D. A., Rhodes, D., Nolte, K. D., Hicks, W. A., Leustek, T., Cooper, A. J. L., and Hansen, A. D. (1997). A new route for synthesis of dimethylsulphoniopropionate in marine algae. *Nature*, 387 :891–894.
- Gagez, A.-L., Thiery, V., Pasquet, V., Cadoret, J.-P., and Picot, L. (2012). Epoxycarotenoid and cancer. review. *Current Bioactive Compounds*, 8 :109–141.
- Gao, Y., Guo, F., Gokavi, S., Chow, A., Sheng, Q., and Guo, M. (2008). Quantification of water-soluble vitamins in milk-based infant formulae using biosensor-based assays. *Food Chemistry*, 110 :769–776.
- Garcia, S. L., Buck, M., Mc Mahon, K. D., Grossart, H.-P., Eiler, A., and Warnecke, F. (2015). Auxotrophy and intrapopulation complementarity in the "interactome" of a cultivated freshwater model community. *Molecular Ecology*, 24 :4449–4459.
- Garnier, M. (2016). *Allocation du carbone et métabolisme azoté chez l'haptophyte Tisochrysis lutea*. PhD thesis, Université de Nantes.
- Garnier, M., Bougaran, G., Pavlovic, M., Bérard, J.-B., Carrier, G., Charrier, A., Le Grand, F., Lukomska, E., Rouxel, C., Schreiber, N., Cadoret, J.-P., and Saint-Jean, B. (2016). Use of a lipid rich strain reveals mechanisms of nitrogen limitation and carbon partitioning in the haptophyte *Tisochrysis lutea*. *Algal Research*, 20 :229–248.
- Garnier, M., Carrier, G., Rogniaux, H., Nicolau, E., Bougaran, G., Saint-Jean, B., et al. (2014). Comparative proteomics reveals proteins impacted by nitrogen deprivation in wild-type and high lipid-accumulating mutant strains of *Tisochrysis lutea*. *Journal of Proteomics*, 105 :107–120.
- Gast, R. J., McDonnell, T. A., and Caron, D. A. (2000). srDNA-based taxonomic affinities of algal symbionts from a planktonic foraminifer and a solitary radiolarian. *Journal of Phycology*, 36 :172–177.
- Ge, F., Huang, W., Chen, Z., Zhang, C., Xiong, Q., Bowler, C., Yang, J., Xu, J., and Hu, H. (2014). Methylcrotonyl-coa carboxylase regulates triacylglycerol accumulation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *The Plant Cell*, 26 :1681–1697.

- Gebser, B. and Ponhert, G. (2013). Synchronized regulation of different zwitterionic metabolites in the osmoadaptation of phytoplankton. *Marine Drugs*, 11 :2168–2182.
- Geider, R. J., Delucia, E. H., Falkowski, P. G., Finzi, A. C., Crime, J. P., Grace, J., Kana, T. M., La Roche, J., Long, S. P., Osborne, B. A., Platt, T., Prentice, I. C., Raven, J. A., Schlesinger, W. H., Smetacek, V., Stuart, V., Sathyendranath, S., Thomas, R. B., Vogelmann, T. C., Williams, P., and Woodward, F. I. (2001). Primary productivity on planet earth : biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. *Global Change Biology*, 7 :849–882.
- Gelfand, M. S. (2006). Bacterial *cis*-regulatory RNA structures. *Molecular Biology*, 40 :514–550.
- Gleason, F. K. and Wood, J. M. (1976). Ribonucleotide reductase in blue-green algae : dependence on adenosylcobalamin. *Science*, 192 :1343–1344.
- Gobler, C. J., Norman, C., Panzeca, C., Taylor, G. T., and Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2007). Effect of B-vitamins (B₁, B₁₂) and inorganic nutrients on algal bloom dynamics in a coastal ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology*, 49 :181–194.
- Godos, I., Blanco, S., Garía-Encina, P. A., Becares, E., and Muñoz, R. (2009). Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggyery wastewaters at high loading rates. *Bioresource Technology*, 100 :4332–4339.
- Golterman, H. L. (1964). Mineralization of algae under sterile conditions or by bacterial breakdown. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, 15 :544–548.
- Gómez-Consarnau, L., Sachdeva, R., Gifford, S. M., Cutter, L. S., Fuhrman, J. A., Sañudo Wilhelmy, S. A., and Moran, M. A. (2018). Mosaic patterns of B-vitamin synthesis and utilization in a natural microbial community. *Environmental Microbiology*, 20 :2809–2823.
- González, J. C., Banerjee, R. V., Huang, S., Sumner, J. S., and Matthews, R. G. (1992). Comparison of cobalamin-independent and cobalamin-dependent methionine synthases from *Escherichia coli* : two solutions to the same chemical problem. *Biochemistry*, 31 :6045–6056.

- González, J. M., Kiene, R. P., and Moran, M. A. (1999). Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacterium in the α -subclass of the class *Proteobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 :3810–3819.
- González, J. M., Simó, R., Massana, R., Covert, J. S., Casamayor, E. O., Pedrós-Alió, C., and Moran, M. A. (2000). Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing north atlantic algal bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 :4237–4246.
- Gould, S. B., Waller, R. F., and McFadden, G. I. (2008). Plastid evolution. *Annual Reviews of Plant Biology*, 59 :491–517.
- Gould, S. V. (2012). Algae's complex origins. *Nature*, 492 :46–48.
- Goyer, A. (2010). Thiamine in plants : aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*, 71 :1615–1624.
- Grant, M. A., Kazamia, E., Cicunta, P., and G., S. A. (2014). Direct exchange of vitamin B₁₂ is demonstrated by modelling the growth dynamics of algal-bacterial cocultures. *The ISME Journal*, 8 :1418–1427.
- Green, J. C. and Parke, M. (1975). New observations upon members of the genus *Chrysotila* anand, with remarks upon their relationships within the haptophyceae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 55 :109–121.
- Gröne, T. and KIRST, G. O. (1992). The effect of nitrogen deficiency, methionine and inhibitors of methionine metabolism on the dmSP content of *Tetraselmis subcordiformis* (stein). *Marine Biology*, 112 :497–503.
- 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. *Aquatic Microbial Ecology*, 19 :1–11.
- Guan, C., Guo, X., Cai, G., Zhang, H., Li, Y., Zheng, W., and Zheng, T. (2014). Novel algicidal evidence of a bacterium *Bacillus* sp. lp-10 killing *Phaeocystis globosa*, a harmful algal bloom causing species. *Biological Control*, 76 :79–86.

- Guan, C., Guo, X., Li, Y., Zhang, H., Lei, X., Cai, G., Guo, J., Yu, Z., and Zheng, T. (2015). Photoinhibition of *Phaeocystis globosa* resulting from oxidative stress induced by a marine algicidal bacterium *Bacillus* sp. lp-10. *Scientific Reports*, 5 :164–176.
- Hallegraeff, G. M. (2010). Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms : a formidable predictive challenge. *Journal of Phycology*, 46 :220–235.
- Hamilton, F. D. (1974). Ribonucleotide reductase from *Euglena gracilis*. a 5'-deoxyadenosylcobalamin-dependent enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 249 :4428–4434.
- Hardin, G. (1960). The competitive exclusion principle. *Science*, 131 :1292–1297.
- Harvey, E. L., Deering, R. W., Rowley, D. C., El Gamal, A., Schorn, M., Moore, B. S., Johnson, M. D., Mincer, T. J., and Whalen, K. E. (2016). A bacterial quorum-sensing precursor induces mortality in the marine coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Havill, J. T., Bhatiya, C., Johnson, S. M., Sheets, J. D., and Thompson, J. S. (2014). A new approach for detecting riboswitches in DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 30 :3012–3019.
- Heal, K. R., Carlson, L. T., Devol, A. H., Armbrust, E. V., Moffet, J. W., Stahl, D. A., and Ingalls, A. E. (2014). Determination of four forms of vitamin B₁₂ and other B vitamins in seawater by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28 :2398–2404.
- Heal, K. R., Kellogg, N. A., Carlson, L. T., Lionheart, R. M., and Ingalls, A. E. (2019). Metabolic consequences of cobalamin scarcity in the diatom *Thalassiosira pseudonana* as revealed through metabolomics. *Protist*, 170 :328–348.
- Heal, K. R., Qin, W., Ribalet, F., Bertagnolli, A. D., Coyote-Maestras, W., Hmelo, L. R., Moffet, J. W., Devol, A. H., Armbrust, E. V., Stahl, D. A., and Ingalls, A. E. (2017). Two distinct pools of B₁₂ analogues reveal community interdependencies in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 :364–369.

- Helliwell, E. K., Wheeler, G. L., Leptos, K. C., Goldstein, R. E., and Smith, A. G. (2011). Insights into the evolution of vitamin B₁₂ auxotrophy from sequenced algal genomes. *Trends in Genetics*, 29 :469–478.
- Helliwell, E. K., Wheeler, G. L., and Smith, A. G. (2013). Widespread decay of vitamin-related pathways : coincidence or consequence? *Trends in Genetics*, 29 :469–478.
- Helliwell, K. E., Collins, S., Kazamia, E., Wheeler, G. L., and Smith, A. G. (2015). Fundamental shift in vitamin B₁₂ eco-physiology of a model alga demonstrated by experimental evolution. *The ISME Journal*, 9 :1446–1455.
- Helliwell, K. E., Lawrence, A. D., Holzer, A., Kudahl, U. J., Sasso, S., Kräutler, B., Scanlan, D. J., and Warren, M. J. and Smith, A. G. (2016). Cyanobacteria and Eukaryotic Algae Use Different Chemical Variants of Vitamin B₁₂. *Current Biology*, 26 :999–1008.
- Helliwell, K. E., Pandhal, J., Cooper, M. B., Longworth, J., Kudahl, U. J., Russo, D. A., Tomsett, E. V., Bunbury, F., Salmon, D. L., Smirnoff, N., Wright, P. C., and Smith, A. G. (2018). Quantitative proteomics of a B₁₂ -dependent alga grown in coculture with bacteria reveals metabolic tradeoffs required for mutualism. *New Phytologist*, 217 :599–612.
- Helliwell, K. E., Scaife, M. A., Sasso, S., Ulian Araujo, A. P., Purton, S., and Smith, A. G. (2014). Unraveling vitamin B₁₂-responsive gene regulation in algae. *Plant Physiology*, 165 :388–397.
- Hermoso, M. (2014). Coccolith-derived isotopic proxies in palaeoceanography : where geologists need biologists. *Cryptogamie, Algologie*, 35 :323–351.
- Herrmann, W. and Obeid, R. (2008). Causes and early diagnosis of vitamin B₁₂ deficiency. *Deutsches Ärzteblatt International*, 105 :680–685.
- Hinder, S. L., Hays, G. C., Brooks, C. J., Davies, A. P., Edwards, M., Walne, A. W., and Gravenor, M. B. (2011). Toxic marine microalgae and shellfish poisoning in the british isles : history, review of epidemiology, and future implications. *Environmental Health*, 10 :1–12.
- Hirashima, T., Toyoshima, M., Moriyama, T., and Nakamura, Y. (2017). Characterization of phosphoethanolamine-*n*-methyltransferases in green algae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 488 :141–146.

- Hodgson, G. W. and Ponnampereuma, C. (1968). Prebiotic porphyrin genesis : porphyrins from electric discharge in methane, ammonia and water vapor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 59 :22–28.
- Hoskisson, P. A. and Hobbs, G. (2005). Continuous culture - making a comeback ? *Microbiology*, 151 :3153–3159.
- Howard, E. C., Sun, S., Biers, E. J., and Moran, M. A. (2008). Abundant and diverse bacteria involved in dmSP degradation in marine surface waters. *Environmental Microbiology*, 10 :2397–2410.
- Huang, R., Ding, J., Gao, K., Cruz de Carvalho, M. H., Tirichine, L., Bowler, C., and Lin, X. (2019). A potential role for epigenetic processes in the acclimation response to elevated pCO₂ in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Islam, M. A., Heimann, K., and Brown, R. J. (2017). Microalgae biodiesel : current status and future needs for engine performance and emissions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79 :1160–1170.
- Jahn, D., Verkamp, E., and Söll, D. (1992). Glutamyl-transfer RNA : a precursor of the heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 6 :215–218.
- Jannash, H. W. (1967). Growth of marine bacteria at limiting concentrations of organic carbon in seawater. *Limnology and Oceanography*, 12 :264–271.
- Jardillier, L., Zubkov, M. V., Pearman, J., and Scanlan, D. J. (2010). Significant CO₂ fixation by small prymnesiophytes in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean. *The ISME Journal*, 4 :131–152.
- Jordan, R. W. and Chamberlain, A. H. L. (1997). Biodiversity among haptophyte algae. *Biodiversity and Conservation*, 6 :131–152.
- Jordan, R. W., Cros, L., and Young, J. R. (2004). A revised classification scheme for living haptophyte. *Micropaleontology*, 50 :55–79.
- Juzeniene, A. and Nizauskaite, Z. (2013). Photodegradation of cobalamins in aqueous solutions in human blood. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 122 :7–14.

- Kawachi, M. and Inouye, I. (1995). Functional roles of the haptonema and the spine scales in the feeding process of *Chrysochromulina spinifera* (Fournier) Pienaar et Norris (Haptophyta = Prymnesiophyta). *Phycologia*, 34 :193–200.
- Kazamia, E., Czesnick, H., Van Nguyen, T. T., Croft, M. T., Sherwood, E., Sasso, S., Hodson, S. J., Warren, M. J., and Smith, A. G. (2012). Mutualistic interactions between vitamin B₁₂-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environmental Microbiology*, 14 :1466–1476.
- Keeling, P. J. (2013). The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annual Reviews of Plant Biology*, 64 :583–607.
- Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D. G., F., L. B., Lee, R. W., Pearlman, R. E., Roger, A. J., and Gray, M. W. (2005). The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution*, 20 :670–676.
- Keller, M. D. (1989). Dimethyl sulfide production and marine phytoplankton : the importance of species composition and cell size. *Biological Oceanography*, 6 :375–382.
- Keller, M. D., Kiene, R. P., Matrai, P. A., and Bellows, W. K. (1999). Production of glycine betaine and dimethylsulfoniopropionate in marine phytoplankton. *Marine Biology*, 135 :237–248.
- Keller, M. D., Matrai, P. A., Kiene, R. P., and Bellows, W. K. (2004). Response of coastal phytoplankton populations to nitrogen additions : dynamics of cell-associated dimethylsulfoniopropionate (dmSP), glycine betaine (gBT), and homarine. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61 :685–699.
- Keltjens, J. and Vogels, G. (1993). Conversion of methanol and methylamines to methane and carbon dioxide. In *Methanogenesis : ecology, physiology, biochemistry and genetics*, pages 253–302. Chapman & Hall, New-York.
- Kessler, R. W., Weiss, A., Kuegler, S., Hermes, C., and Wichard, T. (2018). Microalgal-bacterial interactions : role of dimethylsulfoniopropionate in microbial gardening by *ulva* (chlorophyta). *Molecular Ecology*, 27 :1808–1819.
- Kiene, R. P., Linn, L. J., and Bruton, J. D. (2000). New and important roles for dmSP in marine microbial communities. *Journal of Sea Research*, 43 :209–224.

- Kiene, R. P., Linn, L. J., González, J. M., Moran, M. A., and Bruton, J. D. (1999). Dimethylsulfoniopropionate and methanethiol are important precursors of methionine and protein-sulfur in marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 :4549–4558.
- Kirchman, D. L. and Wheeler, P. A. (1998). Uptake of ammonium and nitrate by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the sub-Arctic Pacific. *Deep-sea Research*, 43 :347–365.
- Kirkham, A. R., Jardillier, L. E., Holland, R., Zubkov, M. V., and Scanlan, D. J. (2011). Analysis of photosynthetic picoeukaryote community structure along an extended Ellett Line transect in the northern North Atlantic reveals a dominance of novel prymnesiophyte and prasinophyte phylotypes. *Deep-sea Research I*, 58 :733–744.
- Kirkham, A. R., Lepère, C., Jardillier, L. E., Not, F., Bouman, H., Mead, A., and Scanlan, D. J. (2013). A global perspective on marine photosynthetic picoeukaryote community structure. *The ISME Journal*, 7 :922–936.
- Koch, F., Hattenrath-Lehman, T. K., Goleski, J. A., Sañudo-Wilelhmy, S. A., Fisher, N. S., and Gobler, C. J. (2012). Vitamin B₁ and B₁₂ uptake and cycling by plankton communities in coastal ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 3 :1–11.
- Koch, F., Marcoval, M. A., Panzeca, C., Bruland, K. W., Sañudo-Wilelhmy, S. A., and Gobler, C. J. (2011). The effect of vitamin B₁₂ on phytoplankton growth and community structure in the Gulf of Alaska. *Limnology and Oceanography*, 56 :1023–1034.
- Köger, N. and Poulsen, N. (2008). Diatoms-from cell wall biogenesis to nanotechnology. *The Annual Review of Genetics*, 42 :83–107.
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M., and Divanach, P. (2012). Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43 :1520–1527.
- Koutmos, M., Datta, S., Pattridge, K. A., Smith, J. L., and Matthews, R. G. (2009). Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Biochemistry*, 106 :18527–18532.
- Kouzuma, A. and Watanabe, K. (2015). Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Environmental Biotechnology*, 33 :125–129.

- Kozbial, P. Z. and Mushegian, A. R. (2005). Natural history of s-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC Structural Biology*, 5 :1–26.
- Kumar, S. S., Chouhan, R. S., and Thakur, M. S. (2009). Enhancement of chemiluminescence for vitamin B₁₂ analysis. *Analytical Biochemistry*, 388 :312–316.
- Kumar, S. S., Chouhan, R. S., and Thakur, M. S. (2010). Trends in analysis of vitamin B₁₂. *Analytical Biochemistry*, 398 :139–149.
- Landsberg, J. H. (2002). The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science*, 10 :113–390.
- Le Chevanton, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J.-B., Fouilland, E., Bernard, O., and Cadoret, J.-P. (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research*, 2 :212–222.
- Le Chevanton, M., Garnier, M., Lukomska, E., Schreiber, N., Cadoret, J.-P., Saint-Jean, B., and Bougaran, G. (2016). Effects of nitrogen limitation on *Dunaliella* sp.-*Alteromonas* sp. interactions : from mutualistic to competitive relationships cultures. *Frontiers in Marine Science*, 3 :212–222.
- Lee, J. J., Freudenthal, H. D., Muller, W. A., Kossoy, V., Pierce, S., and Grossman, R. (1963). Growth and physiology of foraminifera in the laboratory : part 3 : initial studies of *Rosalina floridana* (cushman). *Micropaleontology*, 9 :449–466.
- Lee, S.-O., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ikeda, T., Mitsutani, A., and Ohtake, H. (2000). Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain a28. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 :4334–4339.
- Lee, S.-O., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ikeda, T., Mitsutani, A., and Ohtake, H. (2016). Chitinase producing bacteria with direct algicidal properties activity on marine diatoms. *Scientific Reports*, 6.
- Lenz, G. (2005). The RNA interference revolution. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38 :1749–1757.

- Lepere, C., Vaultot, D., and Scanlan, D. J. (2009). Photosynthetic picoeukaryote community structure in the South East Pacific Ocean encompassing the most oligotrophic waters on earth. *Environmental Microbiology*, 11 :3105–3117.
- Li, H.-B. and Chen, F. (2000). Determination of vitamin B₁₂ in pharmaceutical preparations by a highly-sensitive fluorimetric method. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 368 :836–838.
- Li, Y., Zhu, H., Lei, X., Zhang, H., Guan, C., Chen, Z., Zheng, W., Xu, H., Tian, Y., Yu, Z., and Zheng, T. (2015). The first evidence of deinoxanthin from *Deinococcus* sp. y35 with strong algicidal effect on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Journal of Hazardous Materials*, 290 :87–95.
- Lidie, K. B., Ryan, J. C., Barbier, M., and Van Dolah, F. M. (2005). Gene expression in Florida Red Tide Dinoflagellate *Karenia brevis* : analysis of an expressed sequence Tag library and development of DNA microarray. *Marine Biotechnology*, 7 :481–493.
- Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., Chaffron, S., Ignacio-Espinosa, J. C., Roux, S., Vincent, F., Bittner, L., Darzi, Y., et al. (2015). Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*, 348.
- Lin, S. (2011). Genomic understanding of dinoflagellates. *Research in Microbiology*, 162 :551–569.
- Liu, C.-H., Shih, M.-C., and Lee, T.-M. (2000). Free proline levels in *Ulva* (chlorophyta) in response to hypersalinity : elevated nacl in seawater versus concentrated seawater. *Journal of Phycology*, 36 :118–119.
- Liu, H., Aris-Brosou, S., Probert, I., and De Vargas, C. (2010). A time line of the environmental genetics of the haptophytes. *Molecular Biology and Evolution*, 27 :161–176.
- Liu, H., Probert, I., Uitz, J., Claustre, H., Aris-Brosou, S., Frada, M., Not, F., and De Vargas, C. (2009). Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains major pigment paradox in open oceans. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 31 :1–6.
- Loew, D., Wanitschke, R., and Schroedter, A. (1999). Studies on vitamin B₁₂ status in the elderly-prophylactic and therapeutic consequences. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 69 :228–233.

- Lovejoy, C., Bowman, J. P., and Hallegraeff, G. M. (1998). Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class *Proteobacteria*, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chatonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 :2806–2813.
- Lovelock, J. E., Maggs, R. J., and Rasmussen, R. A. (1972). Atmospheric dimethyl sulphide and the natural sulphur cycle. *Nature*, 237 :452–453.
- Luo, H. and Moran, M. A. (2014). Evolutionary ecology of the marine *Roseobacter* clade. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78 :573–587.
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., Liu, Y., Tang, J., Wu, G., Zhang, H., Shi, Y., Liu, Y., Yu, C., Wang, B., Lu, Y., Han, C., Cheung, D. W., Yiu, S.-M., Peng, S., Xiaoqian, Z., Liu, G., Liao, X., Li, Y., Yang, H., Wang, J., Lam, T.-W., and Wang, J. (2012). SOAPdenovo2 : an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *GigaScience*, 1 :1–18.
- Luo, X., Chen, B., Ding, L., Tang, F., and Yao, S. (2006). HPLC-ESI-MS analysis of vitamin B₁₂ in food products and in multivitamins-multimineral tablets. *Analytica Chimica Acta*, 562 :185–189.
- Ma, A. T., Beld, J., and Brahalsha, B. (2017). An amoebal grazer of cyanobacteria requires cobalamin produced by heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 83 :1–13.
- Malin, G. and Kirst, G. O. (1997). Algal production of dimethyl sulfide and its atmospheric role. *Journal of Phycology*, 33 :889–896.
- Malin, G. and Steinke, M. (2004). Dimethyl sulfide production : what is the contribution of the coccolithophores? In *Coccolithophores : from molecular processes to global impact*, pages 127–164. Thierstein, H. R. and Young, J. R.
- Marchant, H. J. and Thomsen, H. A. (1994). Haptophytes in polar waters. In *The Haptophyte Algae*, pages 209–228. Clarendon Press, Oxford.
- Marchetti, J., Bougaran, G., Jauffrais, T., Lefebvre, S., Rouxel, C., Saint-Jean, B., Lukomska, E., Robert, R., and Cadoret, J. P. (2018). Effect of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (t-iso). *BMC Genomics*, 19.

- Margulis, L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles ; criteria for proof. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 29 :21–38.
- Marlowe, I. T., Green, J. C., Neal, A. C., and Brassell, S. C. (1984). Long-chain (n-c37-c39) alkenones in the prymnesiophyceae. distribution of alkenones and their taxonomic significance. *British Phycological Journal*, 19 :203–216.
- Marsh, E. N. G. (1999). Coenzyme B₁₂ (cobalamin)-dependent enzymes. *Journal of Bacteriology*, 34 :139–154.
- Martens, J.-H., Barg, H., Warren, M. J., and Jahn, D. (2002). Microbial production of vitamin B₁₂. *Applied Microbial Biotechnology*.
- Martens, T., Heidorn, T., Pukall, R., Simon, M., Tindall, B. J., and Brinkhoff, T. (2006). Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte et al. 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay et al. 1995) Uchino et al. 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56 :1293–1304.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., and Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants : challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, 105 :1141–1157.
- Matrai, P. A. and Keller, M. D. (1994). Total organic sulfur and dimethylsulphoniopropionate in marine phytoplankton : intracellular variations. *Nature*, 119 :61–68.
- McCutcheon, J. P., McDonald, B. R., and Moran, N. A. (2009). Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 :15394–15399.
- McRose, M., Guo, J., Monier, A., Sudek, S., Wilken, S., Yan, S., Mock, T., Archibald, J. M., Begley, T. P., Reyes-Prieto, A., and Worden, A. Z. (2014). Alternatives to vitamin B₁ uptake revealed with discovery of riboswitches in multiple marine eukaryotic lineages. *The ISME Journal*, 8 :2517–2529.
- Mebs, S., Henn, J., Dittrich, B., Paulmann, C., and Luger, P. (2009). Electron densities of the B₁₂ vitamins. *The Journal of Physical Chemistry A*, 113 :8366–8378.

- Menzel, D. and Spaeth, J. P. (1962). Occurrence of vitamin B₁₂ in the Sargasso Sea. *Limnology and Oceanography*.
- Mereschkowsky, C. (1910). Theorie der zwei plasmaarten als grundlage der symbiogenesis, einer neuen lehre von der entstehung der organismen. *Biologisches Centralblatt*, 30 :278–288.
- Milliman, J. D. (1993). Production and accumulation of calcium carbonate in the ocean : budget of a nonsteady state. *Global Biogeochemistry*, 7 :927–957.
- Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., Bougaran, G., Cadoret, J.-P., Morant-Manceau, A., and Schoefs, B. (2012). The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13 :2377–2750.
- Minot, G. R. and Murphy, L. P. (1926). Treatment of pernicious anaemia by a special diet. *Journal of the American Medical Association*, 87 :470–476.
- Miyamoto, E., Watanabe, F., Yamaguchi, Y., Takenaka, H., and Nakano, Y. (2004). Purification and characterization of methylmalonyl-coa mutase from a photosynthetic coccolithophorid alga, *Pleurochrysis carterae*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 138 :163–167.
- Monod, J. (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. PhD thesis, Université de Paris.
- Moon-van der Staay, S. Y., De Wachter, R., and Vaultot, D. (2001). Oceanic 18 S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 409 :607–610.
- Moore, C., Mills, M. M., Arrigo, K. R., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P. W., Galbraith, E. D., Geider, R. J., Guieu, C., Jaccard, S. L., Jickells, T. D., La Roche, J., Lenton, T. M., Mahowald, N. M., Marañón, E., Marinov, I., Moore, J. K., Nakatsuka, T., Oschlies, A., Saito, M. A., Thingstad, T. F., Tsuda, A., and Ulloa, O. (2013). Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geosciences*, 6 :701–710.
- Morelli, B. (1995). Determination of quaternary mixture of vitamins B₆, B₁ and B₁₂ and uridine 5'-trophosphate by derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84 :34–37.

- Morris, J. J., Lenski, R. E., and Zinser, E. R. (2012). The black queen hypothesis : evolution of dependencies through adaptative gene loss. *American Society for Microbiology*, 3.
- Moszczyński, K., Mackiewicz, P., and Bodył, A. (2011). Evidence for horizontal gene transfer from bacteroidetes bacteria to dinoflagellate minicircles. *Molecular Biology and Evolution*, 16 :887–892.
- Mukherjee, S. and Sengupta (2016). Riboswitch Scanner : an efficient phmm-based web-server to detect riboswitches in genomic sequences. *Bioinformatics*, 32 :776–778.
- Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture : situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12 :527–534.
- Nahvi, A., Barrick, J. E., and Breaker, R. R. (2004). Coenzyme b₁₂ riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 32 :143–150.
- Naville, M. and Gautheret, D. (2009). Transcription attenuation in bacteria : theme and variations. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 8 :482–492.
- Nef, C., Jung, S., Mairet, F., Kaas, R., Grizeau, D., and Garnier, M. (2019). How haptophytes microalgae mitigate vitamin B₁₂ limitation. *Scientific Reports*, 9 :1–11.
- Not, F., Latasa, M., Scharek, R., Viprey, M., et al. (2008). Protistan assemblages across the Indian Ocean, with specific emphasis on the picoeukaryotes. *Deep-Sea Research I*, 55 :1456–1473.
- Not, F., Siano, R., Kooistra, W. H. C. F., Simon, N., Vaultot, D., and Probert, I. (2012). Chapter one - diversity and ecology of eukaryotic marine phytoplankton. In *Genomic Insights into the Biology of Algae*, volume 64. Elsevier BV.
- O'Brien, C. J., Peloquin, J. A., Vogt, M., Heinle, M., Gruber, N., Ajani, P., et al. (2013). Global marine plankton functional type biomass distributions : coccolithophores. *Earth System Science Data*, 9 :259–276.
- Okbami, M. and Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2004). A new method for the determination of vitamin B₁₂ in seawater. *Analytica Chimica Acta*, 517 :33–38.
- Panzeca, C., Beck, A. J., Taylor, G. T., Hutchins, D. A., and Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2008). Potential cobalt limitation of vitamin B₁₂ synthesis in the North Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 22 :1–7.

- Panzeca, C., Beck, A. J., Tovar-Sanchez, A., Segovia-Zavala, J., Taylor, G. T., Gobler, C. J., and Sañudo-Wilelhmy, S. A. (2009). Distributions of dissolved vitamin B₁₂ and Co in coastal and open-ocean environments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 85 :223–230.
- Panzeca, C., Tovar-Sanchez, A., Agusti, S., Reche, I., Duarte, C. M., Taylor, G. T., and Sañudo-Wilelhmy, S. A. (2006). B vitamins as regulators of phytoplankton dynamics. *Eos Transactions American Geophysical Union*, 49 :594–596.
- Parfrey, L. W., Lahr, D. J. G., Knoll, A. H., and Katz, L. (2011). Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 :13624–13629.
- Pejchal, R. and Ludwig, M. L. (2005). Cobalamin-independent methionine synthase (metE) : a face-to-face double barrel that evolved by gene duplication. *PLoS Biology*, 3 :1–12.
- Pérez, A. A., Liu, Z., Rodionov, D. A., Li, Z., and Bryant, D. A. (2016). Complementation of cobalamin auxotrophy in *Synechococcus* sp. strain pcc 7002 and validation of a putative cobalamin riboswitch *in vivo*. *Journal of Bacteriology*, 198 :2743–2752.
- Petrou, K. and Nielsen, D. A. (2018). Uptake of dimethylsulphonioacetate (dmSP) by the diatom *Thalassiosira weissflogii* : a model to investigate the cellular function of dmSP. *Biogeochemistry*, 141 :265–271.
- Picot, L., Cadoret, J.-P., and Piot, J.-M. (2009). Research of anticancer molecules in marine biomasses. In *Added value to Fisheries Waste*, pages 211–224. Transworld Research Network.
- Polaski, J. T., Holmstrom, E. D., Nesbitt, D. J., and Batey, R. T. (2016). Mechanistic insights into cofactor-dependent coupling of RNA folding and mRNA transcription/translation by a cobalamin riboswitch. *Cell Reports*, 15 :1100–1110.
- Polaski, J. T., Webster, S. M., Johnson, J. E., and Batey, R. T. (2017). Cobalamin riboswitches exhibit a broad range of ability to discriminate between methylcobalamin and adenosylcobalamin. *Journal of Biological Chemistry*, 292 :11650–11658.
- Price, I. R., Gaballa, A., Ding, F., Helmann, J. D., and Ke, A. (2015). Mn²⁺-sensing mechanisms of *yybP-ykoY* orphan riboswitches. *Molecular Cell*, 57 :1110–1123.

- Pujot-Pay, M. and Raimbault, P. (1994). Improvement of the wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters. *Marine Ecology Progress Series*, 105 :203–207.
- Raux, E., Schubert, H. L., Roper, J. M., Wilson, K. S., and Warren, M. J. (1999). Vitamin B₁₂ : insight into biosynthesis's mount improbable. *Bioorganic Chemistry*, 27 :100–118.
- Raux, E., Schubert, H. L., and Warren, M. J. (1996). *Salmonella typhimurium* cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes : functional studies in *S. typhimurium* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178 :753–767.
- Raux, E., Schubert, H. L., and Warren, M. J. (2000). Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂) : a bacterial conundrum. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57 :1880–1893.
- Renuka, N., Sood, A., Prasanna, R., and Ahluwalia, A. S. (2015). Phycoremediation of wastewaters : a synergistic approach using microalgae for bioremediation and biomass generation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12 :1443–1460.
- Reynolds, C. S. (2006). Ecology of phytoplankton. In *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A., and Gelfand, M. S. (2003). Comparative genomics of vitamin B₁₂ metabolism and regulation in prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 42 :41148–41159.
- Romine, M. F., Rodionov, D. A., Maezato, Y., Osterman, A. L., and Nelson, W. C. (2017). Underlying mechanisms for syntrophic metabolism of essential enzyme cofactors in microbial communities. *The ISME Journal*, 11 :1434–1446.
- Rost, B. and Riebesell, U. (2004). Coccolithophores and the biological pump : responses to environmental changes. In *Coccolithophores : from molecular processes to global impact*, pages 99–125. Thierstein, H. R. and Young, J. R.
- Roth, J. R., Lawrence, J. G., and Bobik, T. A. (1996). Cobalamin (coenzyme B₁₂) : synthesis and biological significance, journal = Annual Reviews of Microbiology. 50 :137–181.
- Roth, J. R., Lawrence, J. G., Rubenfield, M., Kieffer-Higgins, S., and Church, G. M. (1993). Characterization of the cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 175 :3303–3316.

- Ruiz-Ponte, C., Cilia, V., Lambert, C., and Nicolas, J.-L. (1998). *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 67 :537–542.
- Sañudo-Wilhelmy, S. A., Cutter, L. S., Durazo, R., Smail, E. A., Gómez-Consarnau, L., Webb, E. A., Prokopenko, M. G., Berelson, W. M., and Karl, D. M. (2012). Multiple B-vitamin depletion in large areas of the coastal ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 :14041–14045.
- Sañudo-Wilhelmy, S. A., Gobler, C. J., Obkamichael, M., and Taylor, G. T. (2006). Regulation of phytoplankton dynamics by vitamin B₁₂. *Geophysical Research Letter*, 33 :1–4.
- Sañudo-Wilhelmy, S. A., Gómez-Consarnau, L., Suffridge, C., and Webb, E. A. (2014). The role of B-vitamins in marine biogeochemistry. *The Annual Review of Marine Science*, 6 :339–367.
- Sahni, M. K., Spanos, S., Wahrman, M. Z., and Sharma, G. M. (2001). Marine corrinoid-binding proteins for the direct determination of vitamin B₁₂ by radioassay. *Analytical Biochemistry*, 289 :68–76.
- Sapp, M., Schwaderer, A. S., Wiltshire, K. H., Hoppe, H.-G., Gerdtz, G., and Wichels, A. (2007). Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? *Microbial Ecology*, 53 :683–699.
- Sauter, M., Moffatt, B., Saechao, M. C., Hell, R., and Wirtz, M. (2013). Methionine salvage and s-adenosylmethionine : essential links between sulfur, ethylee and polyamine biosynthesis. *Biochemichal Journal*, 451 :145–154.
- Schmittgen, T. D., Jiang, J. M., Liu, Q., and Yang, L. Q. (2004). A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Research*, 32 :1–10.
- Schneider, M. J., Ulland, M., and Sloboda, R. D. (2008). A protein methylation pathway in *Chlamydomonas* flagella is active during flagellar resorption. *Molecular Biology of the Cell*, 19 :4319–4327.
- Schobert, B. (1974). The influence of water stress on the metabolism of diatoms I. Osmotic resistance and proline accumulation in *Cyclotella meneghiniana*. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 74 :106–120.

- Scott, J. M. (1999). Folate and vitamin B₁₂. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58 :441–448.
- Segev, E., Wyche, T. P., Kim, K. H., Petersen, J., Ellebrandt, C., Vlamakis, H., Barteneva, N., Paulson, J. N., Chai, L., Clardy, J., and Kolter, R. (2016). Dynamic metabolic exchange governs a marine algal-bacterial interaction. *eLife*, 5 :1–28.
- Sengupta, R. (2014). Thioredoxin and glutaredoxin-mediated redox regulation of ribonucleotide reductase. *World Journal of Biological Chemistry*, 5 :68–74.
- Serive, B., Nicolau, N., Bérard, J.-B., Kaas, R., Pasquet, V., Picot, L., and Cadoret, J.-P. (2017). Community analysis of pigment patterns from 37 microalgae strains reveals new carotenoids and porphyrins characteristic of distinct strains and taxonomic groups. *Plos One*, 12 :1–35.
- Seyedsayamdost, M. R., Carr, G., Kolter, R., and Clardy, J. (2011a). Roseobacticides : small molecule modulators of an algal-bacterial symbiosis. *Journal of the American Chemical Society*, 133 :18343–18349.
- Seyedsayamdost, M. R., Case, R. J., Kolter, R., and Clardy, J. (2011b). The jekyll-and-hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nature Chemistry*, 3 :331–335.
- Seymour, J. R., Amin, S. A., Raine, J.-B., and Stocker, R. (2017). Zooming in the phycosphere : the ecological interface for phytoplankton-bacteria relationships. *Nature Microbiology*, 2 :1–12.
- Seymour, J. R., Simó, R., Ahmed, T., and Stocker, R. (2011). Chemoattraction to dimethylsulfoniopropionate throughout the marine microbial food web. *Science*, 329 :342–345.
- Shaw, G. E. (1949). *Lactobacillus lactis* Dorner for the assay of vitamin B₁₂. *Nature*, 30 :186–187.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., and Roessler, P. (1998). In *A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program : biodiesel from algae*, pages 1–328. National Renewable Energy Laboratory.
- Shelford, E. J. and Suttle, C. A. (2018). Virus-mediated transfer of nitrogen from heterotrophic bacteria to phytoplankton. *Biogeosciences*, 15.

- Shi, X. L., Lepère, C., Scanlan, D. J., and Vaulot, D. (2011). Plastid 16S rRNA diversity among eukaryotic picophytoplankton sorted by flow cytometry from the South Pacific Ocean. *Plos One*, 6 :1–13.
- Shorb, M. S. (1947a). Unidentified essential growth factors for *Lactobacillus lactis* found in refined liver extracts in certain natural materials. *Journal of Bacteriology*, 53 :669–669.
- Shorb, M. S. (1947b). Unidentified growth factors for *Lactobacillus lactis* in refined liver extracts. *Journal of Biological Chemistry*, 169 :455–456.
- Shorb, M. S. (1948). Activity of vitamin B₁₂ for the growth of *Lactobacillus lactis*. *Science*, 107 :397–398.
- Shorb, M. S. and Briggs, G. M. (1948). The effect of dissociation in *Lactobacillus lactis* cultures on the requirement for vitamin B₁₂. *Journal of Biological Chemistry*, 176 :1463–1464.
- Simon, N., Cras, A.-L., Foulon, E., and Lemée, R. (2009). Diversity and evolution of marine phytoplankton. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences Biologies*.
- 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. *The ISME Journal*, 8 :63–76.
- Skovgaard, A., Legrand, C., Hansen, P. J., and Granéli, E. (2003). Effect of nutrient limitation on food uptake in the toxic haptophyte *Prymnesium parvum*. *Aquatic Microbial Ecology*, 31 :259–265.
- Smith, A. G., Croft, M. T., Moulin, M., and Webb, M. E. (2007). Plants need their vitamins too. *Current Opinion in Plant Biology*.
- Smith, E. L. (1948). Purification of the anti-pernicious anaemia factor. *Nature*, 161 :638.
- Spiese, C. and Tatarkov, E. (2014). Dimethylsulfoxide reduction activity is linked to nutrient stress in *Thalassiosira pseudonana*. *Marine Ecology Progress Series*, 507 :31–38.
- Stefels, J. (2000). Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *Journal of Sea Research*, 43 :183–197.

- Steinke, M., Wolfe, G. V., and Kirst, G. O. (1998). Partial characterization of dimethylsulphoniopropionate (dmSP) lyase isozymes in 6 strains of *Emiliania huxleyi*. *Marine Ecology Progress Series*, 175 :215–225.
- Struck, A.-W., Thompson, M. L., Wong, L. S., and Micklefield, J. (2012). S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases : highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *ChemBioChem*, 110 :2642–2655.
- Suffridge, C. P., Cutter, L., and Sañudo Wilhelmy, S. A. (2017). A new analytical method for direct measurement of particulate and dissolved B-vitamins and their congeners in seawater. *Frontiers in Marine Science*, 4 :1–11.
- Suffridge, C. P., Gómez-Consarnau, L., Monteverde, D. R., Cutter, L., Arístegui, J., Alvarez-Salgado, X. A., Gasol, J. M., and Sañudo Wilhelmy, S. A. (2018). B vitamins and their congeners as potential drivers of microbial community composition in an oligotrophic marine ecosystem. *Journal of Geophysical Research : Biogeosciences*, 123 :2890–2907.
- Sunda, W. G., Hardison, R., Kiene, R. P., Bucciarelli, E., and Harada, H. (2007). The effect of nitrogen limitation on cellular dmSP and dms release in marine phytoplankton : climate feedback implications. *Aquatic Sciences*, 69 :341–351.
- Sunda, W. G., Kieber, D. J., Kiene, R. P., and Huntsman, S. (2002). An antioxidant function for dmSP and dms in marine algae. *Nature*, 418 :317–320.
- Swan, B. K., Tupper, B., Sczyrba, A., Lauro, F. M., Martinez-Garcia, M., González, J. M., Luo, H., Wright, J. J., Landry, Z. C., Hanson, N. W., Thompson, B. P., Poulton, N. J., Schwientek, P., Acinas, S. G., Giovannoni, S. J., Moran, M. A., Hallam, S. J., Cavicchioli, R., Woyke, T., and Stepanauskas, R. (2013). Prevalent genome streamlining and latitudinal divergence of planktonic bacteria in the surface ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 :11463–11468.
- Swithers, K. S., Petrus, A. K., Secinaro, M. A., Nesbø, C. L., Gogarten, J. P., Noll, K. M., and Butzin, N. C. (2012). Vitamin B₁₂ synthesis and salvage pathway were acquired by horizontal gene transfer to the *Thermotogales*. *Genome Biology and Evolution*, 4 :842–851.
- Taga, M. E. and Walker, G. C. (2008). Pseudo-B₁₂ joins the cofactor family. *Journal of Bacteriology*, 190 :1157–1159.

- Takashi-Iñiguez, T., García-Hernandez, E., Arreguín-Espinosa, R., and Flores, M. E. (2012). Role of vitamin B₁₂ on methylmalonyl-CoA mutase activity. *Journal of Zhejiang University Science B : Biomedicine & Biotechnology*, 13 :423–437.
- Tandon, P., Jin, Q., and Huang, L. (2017). A promising approach to enhance microalgae productivity by exogenous supply of vitamins. *Microbial Cell Factories*, 16 :1–13.
- Tang, Y. Z., Koch, F., and Gobler, C. J. (2010). Most harmful algal bloom species are vitamin B₁ and B₁₂ auxotrophs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 :20756–20461.
- Tapia, J. E., González, B., Goulitquer, S., Potin, P., and Correa, J. A. (2016). Microbiota influences morphology and reproduction of the brown alga *Ectocarpus* sp. *Frontiers in Microbiology*, 7 :1–14.
- Taylor, G. T. and Sullivan, C. W. (2008). Vitamin B₁₂ and cobalt cycling among diatoms and bacteria in Antarctic sea microbial communities. *Limnology and Oceanography*, 53 :1862–1877.
- Thingstad, T. F., Skjoldal, E. F., and Bohne, R. A. (1993). Phosphorus cycling and algal-bacterial competition in Sandsfjord, western Norway. *Marine Ecology Progress Series*, 99 :239–259.
- Thiriet-Rupert, S., Carrier, G., Chénais, B., Trottier, C., Bougaran, G., Cadoret, J.-P., Schoefs, B., and Saint-Jean, B. (2016). Transcription factors in microalgae : genome-wide prediction and comparative analysis. *BMC Genomics*, 17 :1–16.
- Thiriet-Rupert, S., Carrier, G., Trottier, C., Eveillard, D., Schoefs, B., Bougaran, G., Cadoret, J.-P., Chénais, B., and Saint-Jean, B. (2018). Identification of transcription factors involved in the phenotype of a domesticated oleaginous microalgae strain of *Tisochrysis lutea*. *Algal Research*, 30 :59–72.
- Thomas, M. G. and Escalante-Semerena, J. C. (2000). Identification of an alternative nucleoside triphosphate : 5'-deoxyadenosylcobinamide phosphate nucleotidyltransferase in *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH. *Journal of Bacteriology*, 182 :4227–4233.
- Thomsen, H., Buck, K. R., and Chavez, F. P. (1994). Haptophytes as components of marine phytoplankton. In *The Haptophyte Algae*, pages 187–208. Clarendon Press, Oxford.

- Tilman, D., Kilham, S. S., and Kilham, P. (1982). Phytoplankton community ecology : the role of limiting nutrients. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13 :349–372.
- Tripp, H. J., Kitner, J. B., Schwalbach, M. S., Dacey, J. W. H., Wilhelm, L. J., and Giovannoni, S. J. (2008). SAR11 marine bacteria require exogenous reduced sulphur for growth. *Nature*, 452 :741–744.
- Turner, S. M., alin, G., Liss, P. S., Harbour, D. S., and Holligan, P. M. (1989). The seasonal variation of dimethyl sulfide and dimethylsulphoniopropionate concentrations in nearshore waters. *Limnology and Oceanography*, 33 :364–375.
- Twigg, M. S., Tait, K., Williams, P., Atkinson, S., and Cámara, M. (2014). Interference with the germination and growth of *Ulva* zoospores by quorum-sensing molecules from *Ulva* associated epiphytic bacteria. *Environmental Microbiology*, 16 :445–453.
- Unrein, F., Gasol, J. M., Not, F., Forn, I., and Massana, R. (2014). Mixotrophic haptophytes are key bacterial grazes in oligotrophic coastal waters. *The ISME Journal*, 8 :164–176.
- Uzar, H. C., Battersby, A. R., Carpenter, T. A., and Leeper, F. J., A. (1987). Biosynthesis of porphyrins and related macrocycles. part 28. development of a pulse labelling method to determine the C-methylation sequence for vitamin b₁₂. *Journal of the American Chemical Society*, 111 :1689–1696.
- Vallenet, D., Calteau, A., Cruveiller, S., Gachet, M., Lajus, A., Josso, A., Mercier, J., Renaux, A., Rollin, J., Rouy, Z., Roche, D., Scarpelli, C., and Médigue, C. (2017). Microscope in 2017 : an expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. In *Nucleic Acids Research*, pages 517–528.
- Valot, B., Langella, O., Nano, E., and Zivy, M. (2011). Masschroq : a versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics*, 28 :3572–3577.
- Veluchamy, A., Lin, X., Maumus, F., Rivarola, M., Bhavsar, J., Creasy, T., O'Brien, K., Sengamalay, N. A., Tallon, L. J., Smith, A. D., Rayko, E., Ahmed, I., Crom, S., Farrant, G. K., Sgro, J.-Y., Olson, S. A., Bondurant, S. S., Allen, A. E., Rabinowicz, P. D., Sussman, M. R., Bowler, C., and Tirichine, L. (2013). Insights into the role of dna methylation in diatoms by genome-wide profiling in *Phaeodactylum tricornutum*. *Nature Communications*, 4.

- Villar, E., Vannier, T., Vernet, C., Lescot, M., Cuenca, M., Alexandre, A., Bachelier, P., Rosnet, T., Pelletier, E., Sunagawa, S., and Hingamp, P. (2018). The ocean gene atlas : exploring the biogeography of plankton genes online. *Nucleic Acid Research*, 46 :W289–W295.
- Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A., and Gelfand, M. S. (2003). Regulation of the vitamin B₁₂ metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. *RNA Society*, 9 :1084–1097.
- Wagner-Döbler, I., Ballhausen, B., Berger, M., Brinkhoff, T., Buchholz, I., Bunk, B., Cy-pionka, H., Danier, R., Drepper, T., Gerds, G., Hahnke, S., Han, C., Jahn, D., Kalhoefer, D., Kiss, H., Klenk, H.-P., Kyrpides, N., Liebl, W., Liesegang, H., Meincke, L., Pati, A., Petersen, J., Piekarski, T., Pommerenke, H., Pradella, S., Pukall, R., Rabus, R., Stacke-brandt, E., Thole, S., Thompson, L., Tielen, P., Tomasch, J., Von Jan, M., Wanphrut, N., Wichels, A., Zech, H., and Simon, M. (2010). The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae* : a hitchhiker's guide to life in the sea. *The ISME Journal*, 4 :61–77.
- Waksman, S. A., Stokes, J. L., and Butler, M. R. (1937). Relation of bacteria to diatoms in sea water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 22 :359–373.
- Walne, P. (1970). Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bi-valves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. In *Fishery Investigations*, volume 26, page 62.
- Warren, M. J., Raux, E., Schubert, H. L., and Escalante-Semeran, J. C. (2002). The biosyn-thesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). *Nature Product Reports*, 19 :390–412.
- Watanabe, F., Ito, T., Tabuchi, T., Nakano, Y., and Kitaoka, S. (1988). Isolation of pelli-cular cobalamin-binding proteins of the cobalamin uptake system of *Euglena gracilis*. *Microbiology Society*, 134.
- Watanabe, F., Takenaka, S., Abe, K., Tamura, Y., and Nakano, Y. (1998). Comparison of a microbiological assay and a fully automated chemiluminescent system for the determi-nation of vitamin B₁₂ in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 :1433–1436.
- Wiebe, W. J. and Smith, D. F. (1977). Direct measurement of dissolved organic carbon

- release by phytoplankton and incorporation by microheterotrophs. *Marine Biology*, 42 :213–223.
- Wienhausen, G., Noriega-Ortega, B. E., Niggemann, J., Dittmar, T., and Mainhard, S. (2017). The exometabolome of two model strains of the *Roseobacter* group : A marketplace of microbial metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Wilde, E. W. and Benemann, J. R. (1993). Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology advances*, 11 :781–812.
- Withfield, C. D., Steers, E. J., and Weissbach, H. (1970). Purification and properties of 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine transmethylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 245 :390–401.
- Woodson, J. D., Peck, R. F., Krebs, M. P., and Escalante-Semerena, J. C. (2003a). The *cobY* gene of the Archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC-1 is required for de novo cobamide synthesis. *Journal of Bacteriology*, 185 :311–316.
- Woodson, J. D., Reynolds, A. A., and Escalante-Semerena, J. C. (2005). Abc transporter for corrinoids in *Halobacterium* sp. strain nrc-1. *Journal of Bacteriology*, 187 :5901–5909.
- Woodson, J. D., Zayas, C. L., and Escalante-Semerena, J. C. (2003b). A new pathway for salvaging the coenzyme B₁₂ precursor cobinamide in archaea required cobinamide-phosphate synthase (CbiB) enzyme activity. *Journal of Bacteriology*, 185 :7193–7201.
- Wurch, L. L., Bertrand, E. M., Saito, M. A., Van Mooy, B. A. S., and Dyhrman, S. T. (2011). Proteome changes driven by phosphorus deficiency and recovery in the brown tide-forming alga *Aureococcus anophagefferens*. *Plos One*, 6.
- Yarnell, W. S. and Roberts, J. W. (1999). Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. *Science*, 284 :611–615.
- Zeng, Y.-X., Qiao, Z.-Y., Yu, Y., Li, H.-R., and Wei, L. (2016). Diversity of bacterial dimethylsulfoniopropionate degradation genes in surface seawater of arctic kongsfjorden. *Scientific Reports*, 6 :1–9.
- Zhang, Y., Rodionov, D. A., Gelfand, M. S., and Gladyshev, V. N. (2009). Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B₁₂ utilization. *BMC Genomics*, 10.

- Zhu, Q., Aller, R. C., and Kaushik, A. (2011). Analysis of vitamin B₁₂ in seawater and marine sediment porewater using ELISA. *Limnology and Oceanography : Methods*, 9 :515–523.
- Zubkov, M. V. and Tarran, G. A. (2008). High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature*, 455 :224–227.

Annexe A

Méthodes de dosage de la vitamine B₁₂ et applications au phytoplancton

Différentes méthodes de quantification de la vitamine B₁₂ existent et sont couramment utilisées, en particulier pour les analyses agroalimentaires (Table A.1). Dans la littérature, plusieurs méthodes de dosage de la cobalamine ont été appliquées aux matrices phytoplanctoniques. La plus ancienne de ces méthodes est le test microbiologique. Elle est basée sur la relation de proportionnalité entre le taux de croissance de souches de *Lactobacillus* B₁₂-dépendantes et la concentration en vitamine B₁₂ (Shorb, 1947b). Cette mesure est aussi la plus variable, du fait d'un manque de reproductibilité lié au facteur biologique et à la production de vitamine B₁₂ par certaines souches de *Lactobacillus* qui biaisent les essais. Les travaux de Croft et al. (2005) et Helliwell et al. (2011) ont appliqué la méthode du bioessai microbiologique issu de Raux et al. (1996) en utilisant la croissance de la bactérie *Salmonella enterica* comme proxy de la concentration intracellulaire en cobalamine chez la chlorophyte *Lobomonas rostrata* (Croft et al., 2005) et l'haptophyte *Emiliania huxleyi* (Helliwell et al., 2011). Une autre méthode utilisant un bioessai, cette fois à partir de la microalgue cobalamine-dépendante *Thalassiosira pseudonana* (CCMP 1335 clone 3H), a été appliquée sur les échantillons intracellulaires et extracellulaires naturels lors des travaux de Taylor and Sullivan (2008).

L'utilisation d'un radioisotope de cobalt, le ⁵⁷Co, est la première méthodologie à avoir été appliquée sur les matrices phytoplanctoniques par Droop (1968) afin de doser la concentration intracellulaire en vitamine B₁₂ chez une microalgue, l'haptophyte *Monochrysis lutheri* (*Diacronema lutheri*). Cette méthode lui a permis de suivre l'incorporation cellulaire de la cobalamine (Table A.1) (Droop, 1968).

Les méthodes chromatographiques par HPLC et UPLC sont lourdes mais permettent une grande robustesse des résultats et ont une sensibilité élevée (Table A.1). Couplée à la spectrométrie de masse, la chromatographie permet de différencier les formes de cobalamine (Heal et al., 2014 ; Suffridge et al., 2018). Les méthodes les plus récentes de dosage

TABLE A.1 – Méthodes analytiques les plus couramment utilisées pour le dosage de la vitamine B₁₂ dans le phytoplancton. HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance ; UPLC : chromatographie en phase liquide à haute pression ; MS : spectrométrie de masse ; ELISA : *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*.

Méthode	Sensibilité	Référence
Test microbiologique	30 µg/100 g masse sèche	Shaw (1949) ; Daisley (1958) ; Raux et al. (1996) ; Watanabe et al. (1998)
Utilisation d'un radioisotope	5 ng/mL	Droop (1968) ; Sahni et al. (2001)
HPLC	40 ng/mL	Okbamichael and Sañudo-Wilhelmy (2004) ; Gobler et al. (2007) ; Panzeca et al. (2009)
(U)HPLC-MS	0,1 ng/mL	Luo et al. (2006) ; Sañudo-Wilhelmy et al. (2012) ; Heal et al. (2014) ; Chamlagain et al. (2015) ; Suffridge et al. (2017)
Méthode immunologique (ELISA)	0,4-100 ng/mL	Alcock et al. (1992) ; Zhu et al. (2011)

des quotas en vitamine B₁₂ dans les matrices microalgales sont majoritairement appliquées dans le but de différencier les formes biologiques de la cobalamine dans des échantillons naturels et appliquent l'HPLC ou l'UPLC (Heal et al., 2014 ; Suffridge et al., 2017). Leur méthodologie est presque similaire : les cellules sont lysées au broyeur à billes puis dosées par chromatographie phase liquide, avec un solvant acétonitrile :méthanol :eau (Heal et al., 2014) ou méthanol :eau (Suffridge et al., 2017), couplée à un spectromètre de masse triple quadrupôle (LC-MS).

Une méthode de dosage par immunoaffinité a aussi été développée pour le dosage de la cobalamine : c'est la méthode immunologique ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), dont le principe est décrit dans le chapitre 2. Sa mise en œuvre est simple, couplée à une sensibilité élevée (Table A.1). La méthode ELISA a été appliquée aux matrices phytoplanctoniques lors de l'étude de Cruz-López et al. (2018). Les auteurs ont suivi le quota en vitamine B₁₂ du dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum* en procédant à une extraction au broyeur à billes avec un solvant méthanolique, puis en réalisant la quantification par l'utilisation d'un kit ELISA.

Il existe une autre méthode de dosage de la vitamine B₁₂ : la chimioluminescence (Wa-

tanabe et al., 1998 ; Kumar et al., 2009). La chimioluminescence est basée sur l'ajout de luminol dans les échantillons extraits contenant la vitamine à doser. L'ajout de peroxyde d'hydrogène dans les échantillons forme des radicaux libres issus du complexe peroxyde d'hydrogène-cobalamine, qui oxydent le luminol. Le signal lumineux du luminol oxydé, mesuré à l'aide d'un luminomètre, est proportionnel à la concentration de vitamine B₁₂ (Watanabe et al., 1998 ; Kumar et al., 2009). À notre connaissance, cette méthode n'a pas été appliquée aux matrices phytoplanctoniques. D'autres méthodes de dosage de la cobalamine ont été décrites et sont plus ou moins sensibles, telle que la résonance plasmonique (2,0 µg/100 g) (Gao et al., 2008), ou l'utilisation de la fluorimétrie (0,1 ng/mL) (Li and Chen, 2000) mais elles n'ont pas non plus été appliquées au phytoplancton.

Les différentes méthodes appliquées aux matrices phytoplanctoniques, hormis pour le bioessai, présentent une grande sensibilité (Table A.1). Par rapport aux méthodes de mesure chromatographiques, la méthode immunologique ELISA est tout aussi sensible, moins coûteuse et ne nécessite pas de temps à accorder au développement d'une méthode, c'est pourquoi nous l'avons choisie pour la quantification de la vitamine B₁₂ durant cette thèse.

Annexe B

Recette du milieu de Conway

Les solutions d'enrichissement de culture de microalgues utilisées pour la plupart des travaux de cette thèse sont basées sur la recette du milieu de Conway (décrit par [Walne \(1970\)](#)) légèrement modifiée. Le milieu de Conway est composé d'une solution d'éléments principaux (Table [B.1](#)), d'une solution d'éléments métalliques (Table [B.2](#)) et d'une solution de vitamines (habituellement B₁ et B₁₂). Pour nos expériences, deux solutions de vitamine ont été réalisées afin de maîtriser l'apport de cobalamine. Nous avons donc préparé une solution de vitamine B₁ (Table [B.3](#)) et une solution de vitamine B₁₂ (Table [B.4](#)) dont la concentration est 50 fois inférieure à celle du milieu de Conway classique. Chaque solution est apportée à hauteur de 1 mL/L de culture.

TABLE B.1 – Solution d'éléments principaux.

Produit chimique	Concentration (g/L de solution)
Na ₂ E.D.T.A. H ₂ O	49,8
FeCl ₃ 6H ₂ O	1,30
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,36
H ₃ BO ₃	33,6
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	20,0
NaNO ₃	100,0

TABLE B.2 – Solution d'éléments métalliques.

Produit chimique	Concentration (g/L de solution)
ZnCl ₂	0,021
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,02
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,009
CuSO ₄ 5H ₂	0,02

TABLE B.3 – Solution de vitamine B₁.

Produit chimique	Concentration (g/L de solution)
Vitamine B ₁	0,1

TABLE B.4 – Solution de vitamine B₁₂.

Produit chimique	Concentration (g/L de solution)
Vitamine B ₁₂	40 10 ⁻⁶

Titre : Métabolisme et interactions bactériennes en lien avec la vitamine B₁₂ chez la microalgue haptophyte *Tisochrysis lutea*

Mots clés : Métabolisme, vitamine B₁₂, interactions microbiennes, microalgues haptophytes

Résumé : La vitamine B₁₂ est un cofacteur enzymatique permettant la synthèse de méthionine et dont la disponibilité peut contrôler le développement du phytoplancton dans de nombreux systèmes marins. Cette vitamine est synthétisée uniquement par certaines espèces de bactéries et d'archées. Les microalgues haptophytes sont ubiquistes et ont une importance écologique majeure. Nous ignorons cependant comment ces algues utilisent la vitamine et la nature de leurs interactions avec les producteurs de B₁₂. Cette thèse vise à caractériser les mécanismes d'acquisition et d'utilisation de la vitamine B₁₂ par les Haptophytes ainsi que l'effet d'une limitation en ce cofacteur sur leur métabolisme, en considérant l'espèce modèle *Tisochrysis lutea*. L'analyse de la répartition de la dépendance à la vitamine B₁₂ chez les Haptophytes par des approches moléculaires nous amène à proposer que ce groupe est constitué exclusivement d'espèces B₁₂-dépendantes.

La plasticité physiologique de *T. lutea* envers la disponibilité en B₁₂ a été caractérisée via des données phénotypiques et protéomiques. La limitation en B₁₂ affecte les métabolismes de la méthionine, le métabolisme central du carbone et la synthèse des principaux osmolytes dont le DMSP. *T. lutea* ne semble pas excréter de composé organique clé permettant la mise en place d'une relation mutualiste avec des bactéries productrices de B₁₂ mais peut se développer sur du lysat bactérien riche en B₁₂, indiquant une acquisition indirecte de la vitamine. Ces travaux sont les premiers apportant des informations quant à la réponse physiologique des microalgues haptophytes dans les environnements limités en vitamine B₁₂ ainsi que sur la nature des interactions entre ces microalgues et les producteurs de B₁₂.

Title: Metabolism and bacterial interactions for vitamin B₁₂ in the haptophyte microalgae *Tisochrysis lutea*

Keywords: Metabolism, vitamin B₁₂, microbial interactions, haptophyte microalgae

Abstract: Vitamin B₁₂ is an enzymatic cofactor that enables methionine synthesis and whose availability can control phytoplankton development in marine systems. This vitamin is synthesized only by select species of bacteria and archaea. Haptophyte microalgae form a widespread group with major ecological importance. However, little is known about their utilization of vitamin B₁₂ nor their interactions with B₁₂ producers. Our main objectives were to characterize mechanisms of acquisition and utilization of vitamin B₁₂ by Haptophytes and the effect of B₁₂ limitation on their metabolism by considering the model species *Tisochrysis lutea*. Analysis of the repartition of B₁₂ dependency in haptophytes by molecular approaches suggest that this group would be the first to gather only B₁₂-dependent species.

We characterized physiologic plasticity of *T. lutea* depending on B₁₂ availability by coupling phenotypic and proteomics analyses. Vitamin B₁₂ limitation impacts methionine and central carbon metabolisms as well as synthesis of major osmolytes including DMSP. Furthermore, our results suggest that *T. lutea* does not excrete key organic compounds that would allow the establishment of mutualistic relationship with B₁₂-producing bacteria. The microalgae is however able to assimilate bacterial lysate enriched with B₁₂, indicating an indirect acquisition of the vitamin. This work is the first to analyse B₁₂ molecular physiology of haptophyte microalgae in B₁₂-limited environments and to investigate the link between these microalgae and B₁₂ producers.