

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL

FACULTE DES SCIENCES

ETUDE PHYSIOLOGIQUE
DE LA MIXOTROPHIE
CHEZ
L'HYDROGENOBACTERIE
AQUASPIRILLUM AUTOTROPHICUM

Thèse de doctorat

Mireille Fasnacht

1987

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Etude physiologique de la mixotrophie chez
l'hydrogénobactérie *Aquaspirillum*
autotrophicum

de M ademoiselle Mireille Fasnacht

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

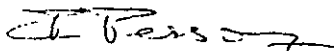
La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs M. Aragno, P. Schürmann et
J.G. Kuenen (Delft)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 14 mars 1988

Le doyen:



F. Persoz

REMERCIEMENTS

Nous remercions tout d'abord Michel Aragno de nous avoir confié cette recherche qui, au fur et à mesure de son évolution, nous dévoilait des aspects inattendus. Nos discussions communes ont toujours contribué à un éclaircissement au niveau des idées, ainsi qu'à la conception du travail ultérieur. Nous avons également beaucoup apprécié d'avoir pu collaborer avec Michel Aragno sur la base d'une relation amicale.

Nous remercions aussi Bernard Jenni, qui nous a dispensé un appui constant, aussi bien dans les domaines technique et scientifique, que sur le plan moral, non seulement au laboratoire, mais encore à la maison.

Nous aimerions également exprimer notre gratitude à M. Peter Schürmann pour les discussions toujours fructueuses et les conseils précieux qu'il nous a accordés.

De plus, nous le remercions, ainsi que M. le Professeur J. G. Kuenen, d'avoir accepté de corriger ce travail.

Nos remerciements vont également à Marco Pagni, qui a contribué, en particulier par son apport en mathématiques, à la maturation de plusieurs idées parmi celles qui constituent ce travail.

Merci enfin à tous les amis et collaborateurs du laboratoire de microbiologie, qui, par leur attitude, nous ont permis d'effectuer ces recherches dans un climat favorable.

Nous mentionnerons finalement qu'une bourse du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (requêtes n° 3.777-80 et 3.517-83) a servi pendant quatre ans de base financière à ce travail.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	p. i
RESUME	p. ii
I. INTRODUCTION	p. 1
I. 1. Les hydrogénobactéries	p. 1
I. 2. Systèmes enzymatiques impliqués dans la lithoautotrophie	p. 3
I. 3. La mixotrophie	p. 5
I. 4. Aspect écologique	p. 9
I. 5. Historique du problème et but du travail	p. 14
II. MATERIEL ET METHODES	p. 17
II. 1. Organismes	p. 17
II. 2. Cultures	p. 17
II. 2.1. Milieux	p. 17
II. 2.2. Précultures	p. 18
II. 2.3. Appareillage et conditions de culture	p. 18
II. 2.4. Collecte et traitement des échantillons	p. 21
II. 3. Etude de la croissance	p. 23
II. 3.1. Variation de la biomasse au cours du temps	p. 23
II. 3.2. Poids sec	p. 23
II. 3.3. Nombre de cellules par unité de volume	p. 24
II. 4. Activité de l' H_2 ase	p. 24
II. 5. Activité de la RuBPCase	p. 27
II. 6. Fixation de $^{14}CO_2$ par des cellules fraîches	p. 32
II. 7. Teneur en protéines	p. 33
II. 8. Analyse des substrats résiduels dans les cultures	p. 34
II. 8.1. Ammoniaque	p. 34
II. 8.2. Pyruvate	p. 34
II. 8.3. Acétate	p. 35

III.	EXPERIENCES ET RESULTATS	p. 36
III.1.	Utilisation de l' H_2 et du CO_2 par des cellules hétérotrophes	p. 37
III.1.1.	Effet sur la croissance, l' H_2 ase, et la RuBPCase, d'une transition de conditions hétérotrophes à des conditions mixotrophes	p. 37
III.1.2.	Effets sur la croissance, l' H_2 ase et la RuBPCase, d'une transition de conditions hétérotrophes à des conditions mixotrophes, en culture continue	p. 40
III.1.3.	Effets sur la croissance, l' H_2 ase et la RuBPCase, de deux transitions, l'une de conditions hétérotrophes à des conditions lithohétérotrophes, la seconde de conditions lithohétérotrophes à des conditions mixotrophes	p. 43
III.1.4.	Culture continue en conditions lithohétérotrophes en vue d'un test de fixation du CO_2 , et transition à des conditions mixotrophes	p. 50
III.1.5.	Fixation autotrophe de CO_2 dans des conditions lithohétérotrophes	p. 52
III.1.6.	Comparaison des cinétiques d'induction de l' H_2 ase en présence et en absence de CO_2	p. 54
III.1.7.	Effets sur la croissance, l' H_2 ase et la RuBPCase de deux transitions, l'une de conditions hétérotrophes à des conditions lithohétérotrophes, la seconde de conditions lithohétérotrophes à des conditions mixotrophes, en culture continue, avec l'écétate comme substrat organique	p. 55
III.2.	Effets de l'apport de substrat organique sur les enzymes de la lithoautotrophie et sur la croissance autotrophe	p. 60
III.2.1.	Prémices	p. 60
III.2.2.	Effet de l'apport de quantités croissantes de pyruvate sur les enzymes de la lithoautotrophie, en culture continue	p. 61

III.2.3.	Effet du pyruvate sur l'activité de l'hydrogène oxydase	p. 64
III.3.	Croissance d' <u>Aquaspirillum autotrophicum</u> avec le formiate	p. 66
III.4.	Compartement d'une population mixte comprenant le type sauvage d' <u>Aquaspirillum autotrophicum</u> et un mutant hétérotrophe de cette bactérie, lors de deux transitions, l'une de conditions hétérotrophes à des conditions lithohétérotrophes, la seconde de conditions lithohétérotrophes à des conditions mixotrophes, en culture continue	p. 68
IV.	DISCUSSION	p. 74
IV.1.	Les capacités mixotrophes: une fonction de l'environnement	p. 74
IV.2.	La lithohétérotrophie, cas particulier de mixotrophie	p. 78
IV.3.	Régulations agissant sur les enzymes de la lithoautotrophie	p. 88
IV.4.	Aspect écologique	p. 100
	CONCLUSION	P. 102
	BIBLIOGRAPHIE	P. 106
	FIGURES	

A B R E V I A T I O N S

Ac.	: acétate
C	: carbone
Cell.	: cellules, cellulaire
Ci	: Curie (1 Ci = $2,2 \times 10^{12}$ désintégrations / min)
DD	: densité optique mesurée sur une distance de 10 mm
For.	: formiate
H ₂ ase	: hydrogénase
PEP	: phosphoénolpyruvate
PHB	: poly-β-hydroxybutyrate
FDPOP	: 1,4-bis-(5-phényl-2-oxazolyl)-benzol
PPD	: 2,5-diphényl-oxazol
Prot.	: protéine
Pyr.	: pyruvate
RuBP	: D-ribulose 1,5 bisphosphate
RuBPCase	: D-ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase

R E S U M E

Ce travail consiste en une étude physiologique des possibilités d'adaptation nutritionnelle de l'hydrogénobactérie Aquaspirillum autotrophicum, ainsi que des régulations que cela implique au niveau de certaines enzymes. Cette adaptation s'effectue par la mise en jeu conjointe des métabolismes organohétérotrophe et lithoautotrophe (mixotrophie) selon des modalités variées.

Cette hydrogénobactérie a été isolée d'un petit lac eutrophe, Le Loclat (St-Blaise, Neuchâtel) (Aragno et Schlegel, 1978 a).

Une étude physiologique réalisée avant ce travail (Aragno et Schlegel 1978 b), a révélé que chez cet organisme, chimioolithosutrophe facultatif, s'affirme une "prédominance" du métabolisme organohétérotrophe (enzymes de la voie d'Entner-Doudoroff constitutives), par rapport au métabolisme lithoautotrophe (les activités-clé de la lithoautotrophie n'apparaissent qu'en présence d' H_2 , O_2 et CO_2). Cependant, les fonctions de la lithosutotrophie et celles de l'organohétérotrophie ne s'exercent pas sans interactions réciproques. Certains substrats organiques, par exemple, influencent la vitesse d'induction de l' H_2 ase.

Ces résultats, ainsi que les différences observées dans les régulations des enzymes de la lithoautotrophie chez Aquaspirillum autotrophicum et chez Alcaligenes eutrophus (hydrogénobactérie très étudiée), nous ont incité à poursuivre l'étude des interactions entre les métabolismes organohétérotrophe et lithoautotrophe chez Aquaspirillum autotrophicum. Nous nous sommes penchée en particulier sur les régulations qui affectent les activités-clé de la lithoautotrophie.

Ce travail repose principalement sur une approche consistant à soumettre l'organisme étudié à des

transitions, en culture continue.

Il s'avère en premier lieu qu'Aquaspirillum autotrophicum n'est capable d'une croissance mixotrophe impliquant l'utilisation simultanée d'un substrat organique, de l' H_2 et du CO_2 (en présence d' O_2), que lorsque le substrat organique est en concentration limitante dans le milieu. Le métabolisme organohétérotrophe agit en effet comme répresseur des fonctions-clé de la lithoautotrophie, et ceci proportionnellement à son taux de fonctionnement. L' H_2 ase est toutefois moins sensible que la RuBPCase à cette régulation. Par conséquent, dans certaines conditions transitoires qui permettent la synthèse d' H_2 ase et non de RuBPCase, la bactérie met en oeuvre un type particulier de métabolisme mixotrophe, où une partie de l'énergie est issue de l' H_2 , tout le carbone provenant du substrat organique. Nous avons nommé ce type de métabolisme "lithohétérotrophe". Cet apport supplémentaire d'énergie à partir de l' H_2 permet à la bactérie d'assimiler une proportion plus importante de substrat organique, et donc d'améliorer son rendement de croissance par rapport à ce substrat. De telles conditions sont réunies par exemple en culture batch, en présence de substrat organique et d' H_2 (avec ou sans CO_2), ou bien dans les premières heures qui suivent l'adjonction d' H_2 à une culture continue limitée en substrat organique.

On peut constater que les "choix" métaboliques de la bactérie sont corrélés à des régulations variées et subtiles, qui s'exercent en particulier sur l' H_2 ase et la RuBPCase, et dont voici une brève énumération.

Premièrement, nous pouvons assumer, avec une très faible probabilité de nous tromper, que l' H_2 ase est inductible par l' H_2 , la présence de ce gaz s'avérant nécessaire à l'apparition de son activité.

Le CO_2 accélère la synthèse de l' H_2 ase. De plus, la quantité d' H_2 ase synthétisée est plus importante en présence de ce gaz qu'en son absence. Il est toutefois difficile de savoir si le CO_2 est nécessaire ou non à

l'apparition de l' H_2 ase, puisque l'oxydation des composés organiques en produit (même si l'on ne fournit pas de substrat organique à la bactérie, celle-ci est susceptible d'effectuer une respiration endogène). En culture continue, l'apport de CO_2 à une population en équilibre, limitée en carbone et non en énergie (H_2 en excès), provoque une augmentation du niveau de l'activité spécifique de l' H_2 ase, parallèlement à un accroissement de la biomasse qui résulte de cet apport. Ce phénomène tient probablement à une demande accrue en énergie et en pouvoir réducteur due à l'activité du cycle de Calvin.

D'autre part, le fonctionnement du métabolisme organohétérotrophe réprime l' H_2 ase, ainsi que la RuBPCase. Nous avons montré que cette régulation affecte la synthèse de l' H_2 ase et non l'activité hydrogène-oxydase.

Quant à la RuBPCase, son activité apparaît chaque fois que les conditions suivantes sont réunies: besoin de carbone d'une part, énergie disponible d'autre part. C'est pourquoi cette activité ne devient décelable dans nos cultures que quelques heures après celle de l' H_2 ase. La RuBPCase est présente également dans des cellules se développant sur le formiate (avec air) (ce substrat est métabolisé via le cycle de Calvin). Dans ces conditions, l' H_2 ase n'est pas induite; l'énergie provient certainement de l'hydrogène prélevé du formiate par une formiate-déshydrogénase. Ces résultats indiquent que les synthèses de l' H_2 ase et de la RuBPCase ne sont pas soumises à un déterminisme commun au niveau génétique (opéron commun par exemple). Les conditions d'apparition de la RuBPCase sont réunies en culture continue limitée par le substrat organique, en présence d'un excès d' H_2 . Bien qu'un apport de CO_2 n'ait alors pas lieu, il est difficile de savoir si ce gaz est nécessaire à l'apparition de l'enzyme, car l'oxydation du substrat est libre.

Dans ces conditions, nous avons montré que les cellules fixent effectivement le CO_2 . Or, si l'on compare les coûts énergétiques de l'assimilation de pyruvate par

la néoglucogénèse ou bien par oxydation de ce substrat et refixation autotrophe du CO_2 résultant de cette oxydation, on constate que le premier mécanisme est nettement plus économique que le second. Nous ne savons pas dans quelles proportions la bactérie utilise les deux mécanismes.

En culture continue limitée par l'acétate, en présence d'un excès d' H_2 , le niveau de RuBPCase est presque trois fois plus élevé que dans les mêmes conditions avec le pyruvate. Lorsque, une fois l'équilibre atteint, du CO_2 est fourni à la culture, ce niveau s'abaisse jusqu'à la valeur qu'il a dans toutes les conditions étudiées avec le pyruvate. La RuBPCase semble donc soumise à une régulation par le CO_2 en présence d'acétate et non en présence de pyruvate.

Nous avons abordé un aspect plus spécifiquement écologique par la mise en compétition, en culture continue, du type sauvage d'Aquaspirillum autotrophicum avec un mutant de cette bactérie dépourvu de la capacité d'oxyder l' H_2 . En conditions hétérotrophes (limitation par le pyruvate), les deux populations se maintiennent côte à côte. Lorsque nous fournissons de l' H_2 en excès à cette culture, le type sauvage obtient un léger avantage par rapport au mutant. Sous l'effet de l'apport de CO_2 , le type sauvage élimine le mutant, puisque la limitation par le carbone est levée pour lui.

Références:

Aragno M. et Schlegel H.G.

1978 a, Int. J. Syst. Bacteriol. 28: 112-116
Aquaspirillum autotrophicum, a new species of hydrogen-oxidizing, facultatively autotrophic bacteria.

Aragno M. et Schlegel H.G.

1978 b, Arch. Microbiol. 116: 221-229
Physiological characterization of the hydrogen bacterium Aquaspirillum autotrophicum.

1. INTRODUCTION

1.1. Les hydrogénobactéries.

Le terme "hydrogénobactéries" définit un groupe physiologique, et non une unité taxonomique. Ce groupe est caractérisé par la capacité de tirer son énergie de l'hydrogène moléculaire, l'accepteur des électrons étant l'oxygène, ainsi que par l'aptitude à fixer le gaz carbonique de manière autotrophe. Ces organismes peuvent donc réaliser une croissance chimiolithoautotrophe.

Excepté les genres thermophiles Calderobacterium (Kryukov et al. 1983) et Hydrogenobacter (Kawasumi et al. 1980, 1984; Kristjansson et al. 1985; Bonjour et Aragno 1987, en préparation), toutes les hydrogénobactéries isolées jusqu'à présent sont lithoautotrophes facultatives. Elles peuvent donc également se développer aux dépens d'un substrat organique, réalisent ainsi une croissance purement hétérotrophe tout à fait similaire à celle que l'on observe chez d'autres bactéries hétérotrophes aérobies.

De nombreuses revues sont parues sur ce groupe de bactéries (Repaske 1966; Schlegel 1966; Kelly 1971; Schlegel et Eberhardt 1972; Schlegel 1976; Zavarzin et Nozhevnikova 1977; Zavarzin 1978; Aragno et Schlegel 1981; Bowien et Schlegel 1981).

Les hydrogénobactéries regroupent entre autres des Alcaligenes, des spirilles (dont Agaspirillum autotrophicum), des membres des genres Pseudomonas, Xanthobacter, et Hydrogenobacter, ainsi que des bactéries Gram-positives appartenant aux genres Bacillus et Nocardia.

Les bactéries capables de se développer avec du monoxyde de carbone comme seule source d'énergie et de carbone (en présence d'oxygène), peuvent également croître au dépens d' H_2 et de CO_2 . On les inclut par conséquent dans le groupe des hydrogénobactéries. Ces organismes, nommés carboxydobactéries, regroupent entre autres certains Pseudomonas et Alcaligenes.

Certaines hydrogénobactéries se sont avérées capables d'oxyder le thiosulfate (Friedrich et Mitrenga 1981). Ces auteurs ont également démontré que Paracoccus denitrificans réalise non seulement une oxydation de ce substrat, mais aussi une croissance à ses dépens. Une telle croissance a été étudiée plus récemment chez une bactérie du genre Hydrogenobacter (Bonjour et Aragno 1986).

On a découvert, chez des bactéries connues depuis longtemps comme fixatrices d'azote, l'aptitude à se développer en tant qu'hydrogénobactéries. Le genre Rhizobium en fournit un exemple (Hanus et al. 1979; Lepo et al. 1980).

Inversement, Xanthobacter autotrophicus (Gogotov et

Schlegel 1974), Alcaligenes latus (Malik et al. 1981), Pseudomonas saccharophila (Barraquio et al. 1986) et certaines Pseudomonas pseudoflava (Jenni et al. 1987, sous presse), décrites d'abord comme hydrogénobactéries, se sont avérées capables de fixer l' N_2 , propriété qu'elles partagent avec de nombreuses autres hydrogénobactéries.

La micromorphologie des hydrogénobactéries ne révèle aucune adaptation morphologique à la lithoautotrophie (Aragno et al. 1977; Walther-Mauruschat et al. 1977), contrairement à ce qui a été observé chez d'autres bactéries lithoautotrophes (comme par exemple le système de membranes intracytoplasmiques chez certaines bactéries nitrifiantes, ou les carboxysomes au sein du genre Thiobacillus).

1.2. Systèmes enzymatiques impliqués dans la lithoautotrophie.

Les hydrogénobactéries, lorsqu'elles se développent en présence de CO_2 comme seule source de carbone, synthétisent leur matériel cellulaire en réalisant la réduction assimilative du CO_2 par le cycle de Calvin. Le genre Hydrogenobacter, cependant, constitue une exception en assimilent le CO_2 par le cycle de Krebs inversé (Shiba

et al. 1985).

L'activation de l' H_2 procure à ces organismes le pouvoir réducteur et l'énergie nécessaires à la fixation du CO_2 .

Deux types d'enzymes peuvent remplir cette fonction:

-les hydrogénases membranaires

-les hydrogénases cytoplasmiques (ou H_2 -déshydrogénases, ou $H_2:NAD^+$ oxydoréductases) (Schneider et Schlegel 1977).

Ces enzymes exercent des rôles physiologiques différents.

L'enzyme membranaire canalise les électrons dans la

chaîne respiratoire, jusqu'à l' O_2 . L'accepteur des

électrons (peut-être une quinone ou le cytochrome c) qui

proviennent de l' H_2 ase membranaire, a un potentiel redox

supérieur à celui du NAD^+ . Par conséquent, chez les

organismes pourvus uniquement d'une H_2 ase membranaire, un

flux inversé d'électrons, processus consommateur

d'énergie, est donc nécessaire pour réduire le NAD^+ .

L' H_2 ase soluble réduit directement le NAD^+ . Son rôle

concerne principalement la régénération du NADH utilisé

par le cycle de Calvin. Cependant, elle peut aussi

fournir des électrons à la chaîne respiratoire, par

l'intermédiaire du NAD.

Certaines espèces, comme Alcaligenes eutrophus et

Alcaligenes ruhländii, possèdent les deux sortes

d'enzymes. Nocardia opaca et Nocardia autotrophica, quant

à elles, ne possèdent qu'une H_2 ase soluble, alors que la

majorité des hydrogénobactéries ne sont pourvues que

d'une H_2 ase membranaire.

1.3. La mixotrophie.

Les organismes chimiolithoautotrophes facultatifs, qui comprennent la plupart des hydrogénobactéries (chap.1.1.), sont non seulement capables d'effectuer les métabolismes lithoautotrophe et organohétérotrophe séparément, mais aussi de mélanger ces deux types trophiques selon des modalités très variées. A cette propriété s'applique le terme de "mixotrophie" qui, étymologiquement, signifie "se nourrir de façon mélangée".

Ce terme fut introduit par Pfeffer en 1897 (in Rittenberg 1972) pour décrire la physiologie dans laquelle des composés organiques sont soit stimulants soit nécessaires à la croissance photosynthétique de certaines plantes inférieures. En 1967, Pringsheim (in Rittenberg 1972) l'utilise pour désigner la physiologie du groupe Beggiatoa, dont la croissance autotrophe est stimulée de façon importante par des composés organiques spécifiques. Actuellement, les auteurs qui étudient les organismes chimiolithoautotrophes facultatifs s'en servent pour qualifier, d'une manière générale, la possibilité de combiner l'utilisation de sources d'électrons et/ou de carbone inorganiques avec l'utilisation de substrats organiques (Matin 1978; Bowien et Schlegel 1981; Kuenen et al., 1985). Récemment, Bonjour et Aragno (1986) ont qualifié de mixolithotrophe le mode de nutrition d'un Hydrogenobacter, capable de tirer ses

électrons simultanément de deux sources inorganiques (l' H_2 et le thiosulfate).

Cependant, historiquement, on constate que la notion de mixotrophie n'a pas toujours bénéficié d'un caractère d'évidence. En effet, en 1890, Winogradsky, qui le premier démontra la chimiolithotrophie par ses études des bactéries nitrifiantes, tira de ces mêmes travaux le concept d'inorgoxydant. Cette notion supposait que les bactéries chimiolithoautotrophes non seulement n'avaient pas besoin de substances organiques pour leur développement, étant incapables de les assimiler, mais étaient entravées par ces substances. Le CO_2 constituait par conséquent la seule source de carbone utilisable par ces organismes (Winogradsky, cité par Rittenberg 1969).

Appliquant ce concept d'une manière catégorique aux bactéries chimiolithotrophes, Winogradsky fermait en quelque sorte la porte à la mixotrophie (on peut assimiler la notion d'inorgoxydant à celle de lithoautotrophe obligatoire).

La découverte des hydrogénobactéries en 1906 par Kaserer ne suffit pas à modifier ces idées. En effet, on considéra généralement que les physiologies autotrophe et hétérotrophe des organismes lithoautotrophes facultatifs ne pouvaient pas fonctionner simultanément (Woods et Lascelles 1954). On se contenta de distinguer entre "autotrophes obligatoires" et "autotrophes facultatifs".

Cependant, en 1969, s'appuyant sur les données expérimentales qui s'étaient accumulées, Rittenberg mit

en lumière le fait que les deux aspects de la physiologie (génération d'énergie et assimilation du carbone) n'étaient pas aussi dépendants l'un de l'autre qu'on l'avait d'abord prétendu et pouvaient se présenter dans toutes les combinaisons possibles (Rittenberg 1969). Il combattit l'idée d'autotrophie obligatoire, préférant parler de chimolithotrophie obligatoire. Pour lui, en effet, l'autotrophie obligatoire (qui suppose un développement dépendant de la présence de CO_2) n'avait aucun sens écologique (Rittenberg 1972). Même si les idées de Rittenberg peuvent être révisées en partie à la lumière de nouvelles découvertes ¹, cet auteur a eu le mérite de réhabiliter la notion de mixotrophie. Toutes ces hésitations quant à l'attribution d'une réalité aux modes de nutrition mixotrophes chez les bactéries, sont probablement imputables à l'approche expérimentale adoptée. En effet, accoutumés à observer des phénomènes de diauxie en culture batch, c'est-à-dire en présence de concentrations élevées de substrats, les chercheurs ont souvent prétendu que l'utilisation conjointe de certains substrats n'était pas possible. Pourtant, en 1967 déjà, Mateles et al. (1967) démontrèrent l'utilisation simultanée de fructose et de glucose par Escherichia coli

¹ Par exemple, les organismes qu'il nomme chimolithotrophes obligatoires et auxquels il dénie une carbone-autotrophie obligatoire semblent en fait autant dépendants de la présence de CO_2 que de celle d'une source inorganique d'électrons (Matin 1978); des bactéries chimolithoautotrophes obligatoires ont été isolées de milieux géothermiques (Kryukov et al. 1983; Kawasumi et al. 1980, 1984; Kristjansson et al. 1985; Bonjour et Aragno 1987).

et Pseudomonas fluorescens en culture continue à des taux de dilution bas, c'est-à-dire à des concentrations très faibles de ces substrats, alors qu'en culture batch ou bien à des taux de dilutions plus élevés, les deux substrats n'étaient pas métabolisés simultanément. De nombreux cas semblables sont connus (Matin 1981). Il semble en effet logique que ce phénomène soit répandu, puisque les concentrations des substrats dans les environnements naturels sont généralement limitantes.

Au vu de ce qui précède, il s'avère que la notion de mixotrophie n'a cessé d'évoluer en fonction des découvertes effectuées, et qu'elle est susceptible d'évoluer encore; elle sera en effet probablement appliquée à un nombre de types trophiques toujours plus élevé, au fur et à mesure de leur découverte; le cas d'Hydrogenobacter déjà cité nous en fournit un exemple (Bonjour et Aragno 1986).

Il découle de ces observations qu'une définition universelle de la mixotrophie ne peut pas dépasser en précision ce que nous donne l'étymologie (cf. ci-dessus). Cependant, il est clair que dire d'une bactérie qu'elle est mixotrophe en se limitant à cette acception générale, équivaut à peu près à ne rien dire (nous serions surprise d'apprendre que, dans ce sens-là, il existe une bactérie non mixotrophe!).

Par contre, il appartient à chacun de définir, en rapport avec l'organisme qu'il étudie et les conditions

expérimentales qu'il applique, ce qu'il veut dire quand il parle de mixotrophie.

Quant à nous, étudiant au cours de ce travail les interactions entre les métabolismes chimiolithoautotrophe et chimioorganohétérotrophe chez un organisme chimiolithoautotrophe facultatif, nous estimons que la définition citée plus haut ("possibilité de combiner l'utilisation de sources d'énergie et/ou de carbone inorganiques avec l'utilisation de substrats organiques") s'applique à notre cas, moyennant quelques nuances qui apparaîtront au fur et à mesure des résultats obtenus, s'imposant d'elles-mêmes.

1.4 Aspect écologique.

Les hydrogénobactéries ont été isolées de nombreux habitats (sols, eaux, sédiments) (Aragno et Schlegel 1981). De ce fait, on les a longtemps tenues pour principales responsables de la consommation aérobie de l' H_2 dans les milieux naturels (Kuznetsov 1959; Schlegel 1974; Schweizer et Aragno 1975; Aragno et Schlegel 1981).

Cependant, il s'est avéré que leurs capacités chimiolithotrophes ne peuvent pas rendre compte de l'utilisation de l' H_2 aux concentrations où il est présent le plus souvent dans les environnements naturels.

En effet, l'atmosphère ne contient que des traces de ce gaz. D'autre part, sa solubilité dans l'eau est très faible, de sorte que l' H_2 atmosphérique se trouve en équilibre avec une concentration aqueuse de moins de 0,5 nM. La phase aqueuse des sols contient environ 10 nl/l d' H_2 , ce qui correspond à 0,4 nM. Conrad et Seiler (1979) ont montré que la décomposition rapide de l' H_2 atmosphérique par le sol ne peut pas être attribuée aux hydrogénobactéries connues. Des conclusions semblables ont été obtenues par Conrad et al. (1983 a), à l'issue d'une étude effectuée sur le Loclat, petit lac eutrophe situé dans les environs de Neuchâtel. Cette étude montre qu'il n'est pas toujours possible d'établir une corrélation entre le nombre d'hydrogénobactéries et la concentration d' H_2 . De plus, les hydrogénobactéries connues sont presque toujours attachées à des particules de taille supérieure à 3 μm , alors que les activités consommatrices d' H_2 sont liées à des particules dont la grandeur se situe entre 0,2 et 3 μm . Pourtant, les concentrations d' H_2 dans ce lac peuvent dépasser de 10 à 400 fois celles de la phase aqueuse des sols.

En fait, les constantes d'affinité (K_m) mesurées pour la décomposition de l' H_2 dans des échantillons de sols (Conrad et al. 1983 c) et d'eau (Conrad et al. 1983 a), se situent entre 5 et 80 nM, alors que les K_m des hydrogénobactéries connues sont généralement supérieurs à 1 μm . De plus, Conrad et al. (1983 b) ont montré que ces bactéries sont incapables de fixer l' H_2 en-dessous d'un certain seuil de concentration situé entre 1 et 10 nM,

valeur qui n'est dépassée qu'occasionnellement dans le Loclat. Par conséquent, l'activité consommatrice d' H_2 dans ce lac doit être attribuée à des microorganismes inconnus, ou bien, comme l'hypothèse en a été émise au sujet des sols (Conrad et al. 1983), à des hydrogénases abiotiques liées à des particules (Conrad et al. 1983 a). L'origine de ces hydrogénases reste toutefois énigmatique.

La question se pose également du mode de vie des hydrogénobactéries connues dans les milieux naturels. Dans de nombreux cas, leur croissance est probablement avant tout hétérotrophe, puisque (à part quelques spécialistes) elles sont lithoautotrophes facultatives. D'autre part, il existe des habitats dans lesquels de grandes quantités d' H_2 sont libérées.

- Les événements des sites géothermiques, dont les gaz souterrains profonds contiennent souvent une forte proportion d' H_2 (Lilley et al. 1982) en fournissent un exemple. Dans ces milieux, l' H_2 semble provenir d'une pyrolyse de l'eau lors de la réduction de roches ferrugineuses à hautes températures, mais une origine biologique ne peut pas être exclue (Baross et al. 1982). De tels sites ont été étudiés (Schink et al. 1983; Conrad et al. 1985), et quelques souches d'hydrogénobactéries en ont été isolées (Mc Gee et al. 1967; Goto et al. 1978; Saveleva et al. 1982; Kryukov et al. 1983; Schink et al. 1983; Bonjour et Aragno 1984; Kawasumi et al. 1984; Kristjansson et al. 1985).

- L'hypothèse d'une syntrophie entre des hydrogénobactéries et des cyanobactéries fixatrices d'azote a également été émise (Bishop et Jones 1978; Ben-Amotz 1979; Hallenbeck et Benemann 1979; Adams et al. 1981; Bothe et Eisbrenner 1981). Dans les parties éclairées des lacs (Conrad et al. 1983 a; Schink et Zeikus 1984), un transfert direct pourrait s'établir entre ces organismes et les hydrogénobactéries, groupés en amas, ce qui permettrait d'éviter la dilution de l' H_2 dans le milieu, et ainsi de contourner les problèmes d'affinité et de seuil mentionnés plus haut. Il est concevable que les cyanobactéries tirent un bénéfice de la consommation d' H_2 et d' O_2 par les hydrogénobactéries, l' O_2 étant inhibiteur de l'activité de la nitrogénase. Dans les sols, une telle relation pourrait s'établir entre des fixateurs d'azote et des hydrogénobactéries. La plupart des microorganismes fixateurs d'azote du sol possèdent cependant une activité consommatrice d' H_2 élevée. Pourtant, il a été montré que les nodules de légumineuses émettent des quantités non négligeables d' H_2 (Schubert et Evans 1976; Evans et Barber 1977). Plus de la moitié des souches connues de Bradyrhizobium japonicum sont dépourvues d'activité consommatrice d' H_2 (Uratsu et al. 1982). De récentes études suggèrent que des hydrogénobactéries peuvent se développer à proximité de nodules constitués par B. japonicum (La Favre et Focht 1983).

- Les interfaces entre milieu anoxique et milieu oxygéné peuvent aussi constituer une niche écologique pour les

hydrogénobactéries. Les bactéries fermentatives libèrent en effet de l' H_2 dans les milieux anaérobies. Dans les environnements strictement anaérobies, comme les sédiments de lac, l' H_2 produit est immédiatement recyclé à l'intérieur même de ce biotope, de sorte que de très faibles quantités de ce gaz s'échappent dans les zones aérobies adjacentes (Conrad et al. 1983 a), contrairement à l'hypothèse émise par différents auteurs (Kuznetsov 1959; Schweizer et Aragno 1975, par exemple).

Cependant, dans certaines situations temporaires, des concentrations élevées d' H_2 sont libérées à partir de sites anaérobies, dans des environnements aérobies adjacents. C'est le cas, par exemple, de sols périodiquement immergés, ou bien de tas d'ordures déposés dans des conditions où la diffusion d' O_2 est restreinte (Gandolla et al. 1982; Gandolla et Grabner 1983; Glauser et al. 1986). Dans de telles conditions, une séquence d'événements a lieu, débutant avec l'élimination de l' O_2 , ce qui permet une phase fermentative pendant laquelle 30% des gaz émis sont de l' H_2 . Les conditions qui régissent pendant cette période transitoire permettent le développement d'hydrogénobactéries (Dugnani et al. 1986). Ensuite seulement, la production de gaz diminue, le méthane remplaçant l' H_2 .

Pour conclure, on peut dire que les milieux naturels n'offrent aux hydrogénobactéries la possibilité d'exprimer leurs capacités lithotrophes que dans des conditions spatialement et/ou temporairement limitées.

I.5. Historique du problème et but du travail.

Aquaspirillum autotrophicum a été isolée du Loclat (voir chap. I.4.) (Aragno et Schlegel 1978 a). C'est une hydrogénobactérie en forme de spirille, Gram-négative, mobile grâce à sa flagellation bipolaire, mésophile, neutrophile. Chimiolithoautotrophe facultatif, cet organisme réalise un métabolisme strictement respiratoire, l'oxygène servant d'accepteur final des électrons. Cette bactérie ne possède qu'une hydrogénase membranaire et fixe le CO_2 par le cycle de Calvin. Bien qu'utilisant de nombreux acides organiques, aminoacides, et sucres acides, elle ne métabolise ni les sucres ni les alcools.

Contrairement aux enzymes servant à la dégradation du gluconate (voie d'Entner-Doudoroff), qui sont constitutives, les activités lithoautotrophes, elles, n'ont pas été décelées dans les cellules hétérotrophes (Aragno et Schlegel 1978 b). Les activités d'oxydation de H_2 et d'assimilation du CO_2 apparaissent par contre dans des cellules précultivées de façon hétérotrophe et mises en présence d'un mélange de gaz constitué d' H_2 , d' O_2 et de CO_2 .

Cependant, les fonctions de la lithoautotrophie et celles de l'organohétérotrophie ne s'exercent pas sans interactions réciproques. En effet, si H_2 ne réprime pas la croissance hétérotrophe, certains substrats organiques, par contre, influencent la vitesse

d'induction de l' H_2 ase (Aragno et Schlegel 1978 b). Une étude plus détaillée sur ce point (à paraître) démontre que la plupart des substrats testés stimulent la synthèse de cette enzyme. De plus, une expérience de culture continue limitée par l'azote, montre que l'activité cellulaire d'oxydation de l' H_2 dépend de la concentration de substrat organique fournie à la culture. Nous avons repris cette expérience de façon plus complète dans ce travail (voir chap. III.2.2.).

Ces données, ainsi que les différences observées dans les régulations des enzymes de la lithoautotrophie chez Aquaspirillum autotrophicum et Alcaligenes eutrophus (la plus étudiée des hydrogénobactéries), nous ont incité à poursuivre l'étude de la mixotrophie et des interactions entre les métabolismes lithoautotrophe et organohétérotrophe chez Aquaspirillum autotrophicum.

D'autres questions se posaient également:

- Les enzymes-clé de la lithoautotrophie (H_2 ase et RuBPCase) étaient-elles toujours induites ensemble, ou bien pouvaient-elles apparaître l'une sans l'autre?
- Dans les conditions où elles étaient formées les deux, leur apparition se faisait-elle simultanément ou séquentiellement?
- Dans une perspective écologique, on pouvait se demander quel serait, par exemple le comportement d'une population constituée d'un mutant d'A. autotrophicum ayant perdu l'une ou l'autre des fonctions de la lithoautotrophie, et

du type sauvage, et dans quelles conditions la lithoautotrophie devenait un réel avantage compétitif, si avantage il y avait.

Pour la plupart de ces études, la culture continue nous a paru une méthode de choix, puisqu'elle permet de maintenir pendant de longues périodes des conditions précises (états stationnaires comportant une biomasse constante se développant à un taux de croissance constant), de ne faire varier qu'un paramètre à la fois, et de travailler avec des concentrations limitantes de substrat.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Organismes.

Aquaspirillum autotrophicum SA 32 (souche type: NEU 2012 = DSM 732 = ATCC 29984) (Aragno et Schlegel, 1978 a).

Aquaspirillum autotrophicum NM 4 (souche mutée, ayant perdu la capacité d'oxyder l' H_2 : NEU 2208) (non publié, Oroz, travail de licence, Université de Neuchâtel).

II.2. Cultures.

II.2.1. Milieux.

Nous utilisons le milieu minéral de base décrit par Schlegel et al. (1961) et par Aragno et Schlegel (1981). Pour des cultures autotrophes, nous lui ajoutons 0,05% (P/V) de $NaHCO_3$. La concentration de NH_4Cl s'élève à 37,4 mM (2 g/l), sauf dans le cas de cultures continues limitées par l'azote, où elle est de 2 mM (0,107 g/l).

11.2.2. Précultures.

Habituellement, nous effectuons deux précultures successives, la première dans un flacon de 100 ml contenant 20 ml de milieu, la seconde dans un erlenmeyer de 500 ml, 1 l ou 2 l selon les cas, contenant respectivement 100, 250, ou 500 ml de milieu. Nous incubons ces précultures à 27 °C en les agitant. Les précultures autotrophes de petit volume sont placées dans un récipient pour culture anaérobie (Oxoid) rempli avec 85% H₂, 10% CO₂, 5% O₂ ou un dessiccateur contenant le même mélange de gaz. Nous faisons circuler stérilement (filtres "in-line" Gelman n° 4210 à l'entrée et à la sortie) ce même mélange de gaz directement dans les précultures autotrophes de plus grand volume.

11.2.3. Appareillage et conditions de culture.

La fig. 12 fournit une représentation schématique de tout l'appareillage, monté pour la culture continue.

Nous effectuons nos cultures dans un fermenteur Biostat S (Braun, Melsungen, RFA).

Nous choisissons le volume de préculture à introduire

dans le fermenteur, de manière à obtenir une DO initiale d'environ 0,2-0,3.

Nous préparons les mélanges de gaz au moyen de détendeurs et de débit-mètres de précision (D) (détendeurs "l'air liquide" GA 2 et BS 300/3; débit-mètres type 8940, Brooks Instruments, Emerson electric Co, Veenendaal Netherlands).

Nous maintenons le pH entre 6,8 et 7,2 grâce à un régulateur de pH incorporé à l'appareil.

Nous régulons la pO_2 dans la culture entre 2,5% et 5% de saturation, grâce à un système mis au point par Bernard Jenni, et dont voici le principe: l'enregistreur du fermenteur suit en permanence la valeur de la pression d' O_2 qui règne dans la culture. Nous captions alors ce signal à l'aide d'un microordinateur "Multitec MPF-1B" équipé d'une interface ADC ("analog to digital converter"). L'ordinateur commande (via une boîte à relais) un moteur agissant sur la vanne du débit-mètre qui contrôle le débit d' O_2 fourni à la culture. Ce système offre l'avantage d'une action continue, n'étant pas basé, comme ceux qui sont commercialisés, sur le principe du "tout ou rien".

Toutes les entrées et sorties de gaz ou communications avec l'air ambiant sont munies de filtres "in-line" Gelman (n° 4210) (f).

Nous disposons de 3 récipients de culture (A), de respectivement 12 l, 6 l et 2 l; pour la culture

continue, nous les utilisons avec les volumes de travail de respectivement 6,8 l, 3,3 l et 0,84 l.

Le réservoir de milieu (B) et le récipient où se déverse le trop-plein (C) sont des bouteilles en verre de 20 l.

Nous stérilisons la grande cuve et la cuve moyenne, ainsi que les récipients de 20 l, vides, à 120 °C pendant 1 h. La petite cuve est "autoclavée" pleine, 30 min à 120 °C.

Le milieu est stérilisé par filtration (Sterilfilter Typ 140, filtres amiante Seitz diamètre 140 mm), au moment de son introduction dans la cuve et dans le réservoir, grâce au dispositif représenté sur la fig. 13.

Nous avons choisi pour nos cultures continues un taux de dilution valant la moitié du taux de croissance autotrophe. Ce choix permettait d'éviter tout lessivage de la culture.

Le taux de croissance autotrophe valant $0,173 \text{ h}^{-1}$, le taux de dilution fut fixé à $0,087 \text{ h}^{-1}$. N'ayant malheureusement pas eu le temps d'étudier les différents comportements de la bactérie en fonction de taux de dilution variés, nous avons travaillé continuellement avec ce même taux de dilution, afin d'obtenir des résultats comparables tout au long de ce travail.

Pour réaliser une culture continue à un taux de dilution de $0,087 \text{ h}^{-1}$, la pompe à membrane (m), qui sert à amener le milieu de réserve dans le récipient de culture, travaille à un débit de 591 ml/h si le volume de

culture est de 6,8 l, à un débit de 284 ml/h si le volume est de 3,3 l, et à un débit de 73 ml/h s'il est de 0,84 l. ¹

Dans le premier cas, la culture consomme 14 l de milieu en 24 h.

11.2.4. Collecte et traitement des échantillons.

Tout au long de nos cultures, nous prélevons des échantillons (généralement 100 ml) à intervalles réguliers, au moyen d'un collecteur de fractions mis au point spécialement par Bernard Jenni. Cet appareil, nommé Jennitec-III, a été décrit par cet auteur (Jenni, 1986). Nous l'avons incorporé au schéma de la fig. 12, qui en montre clairement le principe (E). Une boucle de dérivation nous permet de collecter des cellules dont l'état physiologique est celui de la culture. Une électrovanne (e), placée sous le contrôle d'un relais temporisé (r), détermine soit le retour à la cuve, soit la sortie en direction du collecteur (c). Les intervalles entre les collectes et la durée des prélèvements peuvent être fixés entre 2 et 999 min. Nous réglons le volume

¹ Le débit de la pompe, f , est donné par:
 $f = D \times V$
 où D : taux de dilution
 V : volume de culture.

d'échantillon collecté en jouant avec la durée du prélèvement et la vitesse de la pompe péristaltique (p) (Masterflex modèle 7521-00 avec tête "Duick Load" modèle 7020-40). La température à laquelle reposent les échantillons entre le moment où ils sont collectés et celui où nous les traitons, peut être maintenue constante à une valeur de notre choix, entre -20°C et $+20^{\circ}\text{C}$. Nous l'avons toujours fixée entre 0 et 5°C .

Une fois collectés, les échantillons sont centrifugés ($12000 \times g$, 10 min); les surnageants sont stockés à -20°C en prévision des mesures de concentrations de substrats résiduels. Nous lavons les culots de cellules avec du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7, puis les resuspendons dans 4 ml du même tampon. Nous divisons ces 4 ml en deux portions, l'une de 3 ml en vue du test d'incorporation de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_2$ (activité de la RuBPCase), l'autre de 1 ml en vue du test de réduction du bleu de méthylène en présence d' H_2 (activité de l' H_2 ase). Nous stockons ces suspensions au congélateur (-20°C).

Pendant les expériences, nous effectuons régulièrement des tests de pureté (deux fois par jour) sur agar nutritif ("Nutrient Broth", Difco).

11.3. Etude de la croissance.

11.3.1. Variations de la biomasse au cours du temps.

Nous estimons la biomasse par mesure de la DO (densité optique) à 436 nm. Une DO de 1 correspond à 244 mg de cellules (poids sec) par litre de culture autotrophe d'Aguaspirillum autotrophicum, en phase exponentielle de croissance (Aragno et Schlegel, 1978 b).

Cette grandeur peut être influencée par divers facteurs (par exemple la teneur des cellules en PHB). Néanmoins, elle constitue une approximation suffisamment précise pour notre étude, et elle est d'un accès rapide et facile. Nous effectuons cette mesure sur les échantillons prélevés, avant de leur faire subir un quelconque traitement, si ce n'est une dilution dès que leur DO excède 0,3.

11.3.2. Poids sec.

Nous utilisons des membranes Millipore (MAMP, de diamètre 25 mm, grandeur de pores 0,45 μm) prélavées à l'eau bidistillée et séchées jusqu'à poids constant. Après filtration de 20 ml de suspension cellulaire, nous lavons les membranes à l'eau bidistillée, puis les séchons jusqu'à poids constant, à 40 °C sous vide.

11.3.3. Nombre de cellules par unité de volume de culture.

A partir des échantillons à analyser, nous effectuons une série de suspensions-dilutions. Dans une boîte de Petri, nous mélangeons un volume connu de certaines suspensions-dilutions avec le milieu à l'agar (agar Oxoid n° 1) maintenu en eurfusion (45-50 °C).

Les suspensions-dilutions, les quantités mises en culture et le type de milieu utilisés dépendent des conditions.

Par exemple, pour des échantillons dont la OD était d'environ 0,8, nous avons obtenu entre 200 et 300 colonies par boîte de Petri, en inoculant 1 ml de suspension-dilution 10^{-7} . Généralement, nous inoculons 3 boîtes de Petri par suspension-dilution.

Nous avons admis arbitrairement que la viabilité des cellules ne varie pas selon les conditions de culture.

11.4. Activité de l' H_2 ase.

Nous mesurons la réduction du bleu de méthylène en présence d' H_2 , par des cellules entières, selon la méthode de Schink (1977), légèrement modifiée.

Dans des tubes en polypropylène (mini-fioles à scintillation), nous préparons le mélange suivant:

Tampon phosphate	50	mM pH 7,0	750	μ l
Bleu de méthylène	1,67	mM	83	μ l
Glucose	4	mM	16	μ l
Glucose oxydase	6	mg/ml (a)	33	μ l*
Catalase	2	mg/ml (b)	33	μ l**
H ₂ O bidistillée			(85-x)	μ l
			<hr/>	
			1000	μ l

x: volume de suspension cellulaire utilisé pour le test

(a) Fluka 49180, EC 1.1.3.4.

(b) Serva 26900, EC 1.11.1.6.

* 36 U

** 4490 U

Nous saturons ce mélange en y faisant circuler de l'H₂ (de l'N₂ pour les témoins) pendant 10 min.

A l'aide d'une seringue, nous ajoutons x μ l de suspension cellulaire (40 μ l d'une suspension dont la DO est d'environ 20), puis introduisons immédiatement le mélange dans la cuve du spectrophotomètre (Bausch and Lomb, Spectronic 88) en utilisant un système d'aspiration automatique. Toutes les opérations sont effectuées à 27 °C; la cuve du spectrophotomètre est également thermorégulée.

La réaction est enregistrée, à 570 nm, simultanément à

son déroulement; les graphes obtenus nous servent à calculer les activités spécifiques (H), à l'aide de la formule suivante:

$$H = V (dE / dt) k_1 k_2 / 13,1 v c \quad (\mu\text{l H}_2 / \text{h mg}_{\text{prot}})$$

V: volume réactionnel total (ml)

v: volume de suspension cellulaire utilisé pour le test (ml)

13,1: coefficient d'extinction du bleu de méthylène à 570 nm (cm² / μ mole)

E: extinction

t: temps (min)

c: concentration en protéines (mg / ml)

k₁: 60 (min)

k₂: 22,4 (l / mole)

Pour chaque échantillon, nous effectuons deux mesures en présence d'H₂ et pour certains échantillons, une mesure en présence d'N₂. La plupart des échantillons ne réduisent pas le bleu de méthylène en présence d'N₂. Cependant, dans certaines conditions physiologiques, une telle réduction se produit, et nous en déduisons la valeur du résultat obtenu en présence d'H₂.

Nous avons testé la reproductibilité de cette méthode de la manière suivante: d'une culture autotrophe, nous avons récolté des cellules. Avant de les congeler, nous

avons divisé la quantité prélevée en 10 fractions. Nous avons ensuite mesuré l'activité de réduction du bleu de méthylène en présence d' H_2 , ainsi que la teneur en protéines, dans chaque fraction séparément.

Nous avons obtenu une activité spécifique moyenne de $347 \pm 41 \mu l H_2 / h \times mg_{prot}$, cette marge d'erreur étant donnée par σ (écart-type vrai).

Dans certains cas, nous mesurons l'activité de l' H_2 ase au moyen de la méthode manométrique décrite par Aragno et Schlegel (1981). L'oxygène sert alors d'accepteur des électrons (activité hydrogène-oxydase).

Lorsque nous suivons une induction de l' H_2 ase, nous le faisons également par cette méthode manométrique.

11.5. Activité de la RuBPCase.

Nous mesurons l'incorporation de $^{14}CO_2$ dans des composés stables à l'acide, en présence de RuBP, par des cellules perméabilisées au toluène, selon la méthode d'Andersen (1979), modifiée.

Solutions à préparer:

a) "Tampon carboxylase":

Tris-HCl	20 mM	pH 7,8
NaHCO ₃	50 mM	
MgCl ₂	10 mM	
EDTA	1 mM	

b) RuBP:

Nous achetons ce produit sous forme de D-ribulose 1,5-bisphosphate de barium (RuBP(Ba)₂) (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA (cat. R B125). Nous procédons de la manière suivante pour le transformer en D-ribulose 1,5-bisphosphate de sodium (RuBP(Na)₄) (méthode communiquée par le Dr. Schürmann):

- Dissoudre 25 mg de RuBP(Ba)₂ dans 2,5 ml d'HCl 0,05 N.
- Ajouter la quantité nécessaire de Na₂SO₄ (env. 12 mg) pour remplacer tout le Ba par du Na. Il se forme alors un précipité de BaSO₄.
- Centrifuger (10 min; 3000 x g).
- Ajouter une pointe de spatule de Na₂SO₄ au surnageant pour vérifier que tout le Ba est précipité.
- Ajouter quelques gouttes de NaOH dilué à la solution de RuBP(Na)₄ pour l'amener à un pH d'environ 6.

Test enzymatique:

- Dans un tube en polypropylène de 10 ml, centrifuger une suspension cellulaire contenant environ 10 à 20 mg de protéines (par exemple 2 ml d'une suspension de DD 50).

- Resuspendre le culot dans 300 μ l de "tampon carboxylase".
- Ajouter entre 1 et 5 μ l d'une solution 1 mg/ml d'ADNase si les cellules s'agglomèrent.
- Ajouter 50 μ l de toluène. Mélanger (Vortex).
- Préincuber 20 min à 25 °C pour activer l'enzyme (agiter quelques fois pendant cette préincubation). Après en avoir utilisé la quantité nécessaire pour effectuer la réaction (cf. ci-dessous), garder cette suspension "toluinisée" au frigo en prévision du dosage des protéines.
- Dans un tube Eppendorf, préparer le mélange suivant:

			Conc. finale
Tris-HCl	1,5 M pH 7,8	12 μ l	150 mM
MgCl ₂	100 mM	12 μ l	10 mM
NaHCO ₃	450 mM	10 μ l	37,5 mM
RuBP(Na) ₄	ca. 10 mM	30 μ l	ca. 2,5 mM
H ₂ O bidistillée		26 μ l	
NaH ¹⁴ C ₃	100 mM		
	200 μ Ci/ml	10 μ l	8,3 mM

- Transférer les mélanges réactionnels à 25 °C.
- Pour faire démarrer la réaction, ajouter 20 μ l de suspension cellulaire "toluinisée".
- Mélanger (Vortex) (le tube doit être fermé!).
- Laisser agir 2 min à 25 °C.
- Stopper la réaction en ajoutant 50 μ l d'HCl 2 N, sous la hotte à tirage (du ¹⁴CO₂ est libéré!).

- Mélanger (Vortex).
- Laisser reposer quelques minutes les tubes ouverts sous la hotte à tirage.
- De chaque tube, prélever 100 μ l et les répandre sur un filtre en fibre de verre Whatman 0F/C.
- Laisser sécher les filtres sous une lampe (100 Watts), pendant plusieurs heures, sous la hotte à tirage.
- Mettre les filtres dans des fioles à scintillation contenant 2 ml de liquide à scintillation (4 g de PPO, 0,1 g de diméthyl-POPOP dans 1 l de toluène).
- Déterminer la radioactivité incorporée, à l'aide d'un compteur à scintillation.

Pour chaque échantillon, nous effectuons la réaction deux fois. Chaque série de mesures comprend deux témoins, l'un sans RuBP, l'autre sans suspension cellulaire.

Avec les mélanges radioactifs, nous travaillons sur une surface recouverte de papier plastifié (Benchkote), sous la hotte à tirage.

Nous calculons l'activité spécifique de la RuBPCase

(C) de la manière suivante:

$$C = \frac{\Delta \text{cpm} \cdot V_1 \cdot k}{V_2 \cdot V_3 \cdot c \cdot A \cdot t}$$

($\mu\text{moles } ^{14}\text{CO}_2 / \text{min} \times \text{mg}_{\text{prot}}$)

Δcpm : cpm de l'échantillon (moyenne des deux réactions) -
cpm des témoins (moyenne des deux témoins de la
série)

V_1 : volume du mélange réactionnel (μl)

V_2 : volume étalé sur le filtre (μl)

V_3 : volume de suspension cellulaire utilisé pour le
test (μl)

k : 1000 (μl)

c : concentration en protéines (mg/ml)

A : radioactivité spécifique du $\text{NaH}^{14}\text{CO}_2$ (cpm / μmole)
cette valeur est déterminée expérimentalement au
moyen d'une série de dilutions du $\text{NaH}^{14}\text{CO}_2$ dont
nous mesurons les cpm dans des conditions proches
du test.

t : durée de la réaction (min)

Pour estimer la reproductibilité de la méthode, nous
avons effectué le même test statistique que pour l' H_2ase .
Nous avons obtenu une activité spécifique de
 $0,053 \pm 0,005 \mu\text{moles } ^{14}\text{CO}_2 / \text{min} \times \text{mg}_{\text{prot}}$, cette marge
d'erreur étant donnée par σ (écart-type vrai).

Nous avons effectué le test avec des quantités croissantes d'une suspension cellulaire dont l'activité spécifique était voisine de celle de nos échantillons, afin de vérifier que, dans les conditions du test, nous mesurons des activités enzymatiques proportionnelles aux quantités d'enzyme présentes.

II.6. . Fixation de $^{14}\text{CO}_2$ par des cellules fraîches.

- Après avoir récolté les cellules par centrifugation, les resuspendre rapidement avec la quantité de surnageant nécessaire pour obtenir une suspension d'environ 0,5 g de cellules par ml.
- Dans un flacon en verre contenant une barre magnétique, introduire 18 ml de surnageant.
- Ajouter 1 ml de suspension cellulaire.
- Fermer à l'aide d'un bouchon à jupe rabattable dans lequel est enfoncée une aiguille de seringue (sortie de gaz).
- Afin de réactiver les cellules, faire barbotter le mélange de gaz approprié: 95% H_2 , 5% O_2 pour des cellules lithohétérotrophes, 100% air pour des cellules hétérotrophes.
- Après avoir supprimé l'arrivée de gaz, ajouter 1 ml de solution de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (solution composée de 0,9 ml H_2O + 0,1 ml $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 100 mM; 200 $\mu\text{Ci/ml}$. La concentration finale dans le mélange réactionnel est donc de 0,5 mM; 1 $\mu\text{Ci/ml}$).

- Après 5, 10, 15, 20, 25, 30 sec de réaction, prélever 1 ml de mélange réactionnel à l'aide d'une seringue de 1 ml (tuberculine) équipée d'une aiguille (diamètre de 1 mm, longueur de 60 mm).
- Ajouter le ml prélevé à 2 ml de méthanol chaud (environ 60 °C) additionné de 30 µl d'acide acétique concentré, dans une fiole à scintillation en verre.
- Recouvrir les fioles avec du parafilm; percer le parafilm à plusieurs endroits à l'aide d'une aiguille de seringue.
- Evaporer le contenu des fioles à 40 °C sous vide dans une étuve (sortie de la pompe à l'extérieur).
- Resuspendre la matière séchée dans 1 ml d'eau distillée, en laissant les fioles une nuit sous agitation.
- Ajouter 5 ml de liquide à scintillation (Triton-X-100: toluène contenant 4 g/l de PPD et 0,1 g/l de diméthyl-PGDP, 1:1). Remettre les fioles à agiter pendant quelques heures.
- Mesurer la radioactivité incorporée, à l'aide d'un compteur à scintillation.

II.7. Teneur en protéines.

Nous utilisons la méthode du biuret, modifiée par Schmidt et al., (1963). L'albumine de serum de bovin (BSA) nous sert de standard.

11.8. Analyse des substrats résiduels dans les cultures.

11.8.1. Ammoniaque.

Nous nous servons pour cette mesure, d'une électrode prévue à cet effet (Ingold Ammonia Probe, Series 7500). Nous établissons une courbe étalon avec du NH_4Cl , selon le mode d'emploi de l'électrode.

11.8.2. Pyruvate.

Nous déterminons la concentration en pyruvate en mesurant l'oxydation enzymatique du NADH par la lactate deshydrogénase, à 340 nm.

Mélange réactionnel:

990-x μl Tris-HCl 0,1 M pH 7,6

8 μl NADH 15 mM

x μl échantillon

Nous choisissons x de manière à ce que la concentration en pyruvate dans le mélange réactionnel soit comprise entre 10 et 100 μM . (On peut descendre jusqu'à 2 μM si nécessaire).

Après avoir mesuré l'absorption (A_1) de ce mélange, nous y ajoutons 1 μ l de lactate déshydrogénase (environ 9 U) (type II; Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA; EC 1.1.1.27).

Quand la valeur de l'absorption s'est stabilisée, nous en prenons note (A_2). Nous établissons une courbe étalon en reportant $A_1 - A_2$ en fonction de concentrations standard de pyruvate.

La limite de sensibilité de la méthode se situe environ à 3 μ M pyruvate.

11.8.3. Acétate.

Nous utilisons, pour cette mesure, le "kit" de Boehringer, nous conformant aux spécifications de cette firme.

III. EXPERIENCES ET RESULTATS

Remarque préliminaire: parmi les courbes que nous présentons et qui traduisent l'activité de l'H₂ase ou de la RuBPCase en fonction du temps, certaines montrent des oscillations qui dépassent en amplitude les marges d'erreur que nous donnent les tests de reproductibilité mentionnés aux chap. II.4. et II.5. L'examen de ces courbes ne révèle aucune périodicité. Actuellement, nous ne sommes pas en mesure d'émettre une hypothèse au sujet de ces oscillations.

III.1. Utilisation de l'H₂ et du CO₂ par des cellules hétérotrophes.

III.1.1. Effet sur la croissance, l'H₂ase et la RuBPCase, d'une transition de conditions hétérotrophes à des conditions mixotrophes.

Une première manière de réaliser une telle transition consiste à inoculer un milieu contenant du pyruvate ¹ à la concentration de 6 mM et dont la phase gazeuse se compose de 85% H₂, 5% O₂, 10% CO₂, avec une préculture hétérotrophe d'Aquaspirillum autotrophicum (substrat organique: pyruvate). Nous appelons "mixotrophes" de telles conditions, où du substrat organique, de l'H₂ et du CO₂ sont mis simultanément à disposition de la bactérie.

Nous suivons alors, en culture batch, l'évaluation de la population, ainsi que celle des activités de l'H₂ase et de la RuBPCase, comme le montre la fig. 1.

Dans ces conditions, Aquaspirillum autotrophicum réalise une croissance diauxique, dont les deux phases de croissance sont séparées par un palier d'une quinzaine d'heures. La DD au palier est de 1,26. La DD de l'inoculum étant de 0,095, nous avons une production de biomasse équivalente à 1,17 DD. Or, nous savons par

¹ Nous avons toujours utilisé du pyruvate de Na

d'autres expériences, que la production de biomasse en culture batch hétérotrophe avec 6 mM de pyruvate est de 0,97 DO en moyenne. Nous constatons donc, à l'issue de la première phase, un gain de biomasse de 0,20 DO par rapport à une croissance organohétérotrophe.

Considérant les activités spécifiques des enzymes de la lithoautotrophie, nous constatons que l' H_2 ase apparaît dès les premières heures de la culture, alors que la RuBPCase ne devient décelable qu'à la fin de la première phase de croissance, quand le substrat organique atteint des concentrations limitantes. Le gain par rapport au rendement hétérotrophe ne peut donc être attribué qu'à une assimilation accrue du substrat organique, rendue possible par l'apport supplémentaire d'énergie et d'équivalents réducteurs provenant de l' H_2 via l' H_2 ase.

Nous qualifierons de lithohétérotrophe ce type de métabolisme dans lequel une partie de l'énergie est tirée de l' H_2 , tout le carbone assimilé provenant d'un substrat organique.

Remarquons encore l'aspect particulier de la courbe de synthèse de l' H_2 ase. En effet, l'augmentation de la quantité d'enzyme ne semble pas avoir lieu en une seule fois, mais elle paraît transitoirement interrompue (palier). Il n'est pas exclu que ce profil traduise un phénomène de régulation en relation avec la quantité de substrat résiduel dans la culture (nous reprenons cette discussion au chap. IV).

Pendant le temps que dure le palier (arrêt dans l'accroissement de la biomasse), la bactérie synthétise

la RuBPCase. Lorsque celle-ci a atteint environ 30% de son activité spécifique finale, une croissance autotrophe commence. Il faut plus de 15 heures à la RuBPCase pour atteindre ce niveau décisif. Cette lenteur s'explique par le fait que, n'ayant plus de carbone organique à disposition, la bactérie est contrainte de synthétiser la RuBPCase (et peut-être d'autres enzymes du cycle de Calvin) au dépens du CO_2 qu'elle fixe.

Quelques heures après le début de la croissance autotrophe (30 h après le début de l'expérience, voir fig. 1), le niveau de l' H_2 ase augmente, pour se stabiliser à une nouvelle valeur, environ 3 fois supérieure à son premier niveau. On peut mettre en rapport cette augmentation d'activité avec une demande accrue d'énergie et de pouvoir réducteur, due à la fixation autotrophe du CO_2 .

Pendant l'augmentation de l'activité spécifique des deux enzymes, le taux de croissance s'accroît lui aussi. Il ne devient constant que lorsque ces deux enzymes se sont stabilisées à leur niveau maximal.

Dans les conditions fournies par cette expérience, la bactérie réalise transitoirement un métabolisme qui met en jeu deux sources d'énergie de façon conjointe, et que nous avons nommé lithohétérotrophie. A aucun moment, l' H_2 , le substrat organique et le CO_2 ne sont utilisés conjointement.

Dans l'expérience suivante, nous avons tenté de créer les conditions par lesquelles une croissance (impliquant

l'utilisation simultanée d' H_2 , de substrat organique et de CO_2) puisse avoir lieu.

III.1.2. Effets sur la croissance, l' H_2 ase et la RuBPCase, d'une transition de conditions hétérotrophes à des conditions mixotrophes, en culture continue.

Nous avons réalisé de telles conditions expérimentales en utilisant une culture continue limitée par le pyruvate. Au départ, le milieu comporte 6 mM de pyruvate, concentration également présente dans le réservoir. La phase gazeuse se compose de 85% N_2 , 5% O_2 , 10% CO_2 . Remarquons que ces conditions (présence constante de substrat organique en quantité limitante, et de CO_2 en excès) sont probablement plus proches des milieux naturels d'eau douce, que les conditions de l'expérience précédente (chap. III.1.1).

Nous inoculons la culture avec une préculture hétérotrophe d'Aquaspirillum autotrophicum (substrat organique: pyruvate). Lorsque -comme on peut le voir sur la fig.2 - la population s'est stabilisée, nous remplaçons tout l' N_2 par de l' H_2 . Environ 1 h après l'adjonction d' H_2 , l' H_2 ase apparaît. Environ 2 h après l' H_2 ase, la RuBPCase devient dosable. Quant à la croissance, elle reprend environ 3 h après la transition.

Cette expérience montre qu'en présence d'un apport constant de substrat organique en quantité limitante, les enzymes de la lithoautotrophie sont immédiatement induites après l'apparition d' H_2 , et permettent une augmentation considérable du rendement de la croissance par rapport au substrat organique.

D'autre part, la croissance reprend alors que la quantité de RuBPCase se situe entre 0% et 11% de son niveau final. Cela nous suggère que la croissance se fait, au départ, sur le compte d'un métabolisme lithohétérotrophe, comme dans la première phase de l'expérience précédente (chap. III.1.1.). Une fixation de CO_2 n'intervient que par la suite.

Finalement, l'augmentation de la population se fait grâce au métabolisme lithoautotrophe, qui se "superpose" à l'utilisation du substrat organique. Dans cette phase, la mixotrophie est plus complète que lors de l'expérience précédente, puisqu'elle comprend non seulement une utilisation conjointe de deux sources d'énergie, mais encore de deux sources de carbone.

Cette expérience montre que, malgré l'apport de CO_2 avec la phase gazeuse depuis le début de la culture, c'est l'adjonction d' H_2 qui provoque l'apparition des activités d'oxydation de l' H_2 et de fixation du CO_2 . Le CO_2 ajouté ne semble donc pas, par lui-même, jouer de rôle décisif lors de la transition de conditions organohétérotrophes à des conditions mixotrophes. Nous

avons imaginé l'expérience suivante (fig. 3) pour vérifier ce point, expérience qui nous permettait du même coup de mettre en évidence une éventuelle action d'un apport de CO_2 sur la croissance hétérotrophe.

Il s'agit également d'une culture continue limitée par le pyruvate. Au départ, la concentration de ce substrat dans la cuve et dans le réservoir est égale à 6 mM. La phase gazeuse se compose de 95% N_2 , 5% O_2 . L'inoculum est une préculture hétérotrophe d'Aquespirillum autotrophicum (substrat organique: pyruvate). Lorsque la population s'est stabilisée, nous ajoutons du CO_2 dans la phase gazeuse, qui consiste dès lors en 85% N_2 , 5% O_2 , 10% CO_2 .

L'apport de CO_2 :

- ne change en rien le rendement de la croissance par rapport au pyruvate
- ne provoque ni l'apparition de l'activité de l' H_2 ase ni celle de l'activité de fixation du CO_2 .

Environ 48 h après l'adjonction de CO_2 , nous remplaçons l' N_2 par de l' H_2 . Comme dans l'expérience précédente (fig. 2), les activités de l' H_2 ase et de la RuBPCase apparaissent, ce qui permet à la population de s'accroître.

Cette expérience confirme donc nos suppositions, ainsi que les résultats obtenus précédemment au sujet de l'apparition des enzymes de la lithoautotrophie.

Les expériences décrites ci-dessus (chap. III.1.1. et III.1.2.) nous apprennent qu'Aquaspirillum autotrophicum est capable d'accroître son taux d'assimilation de carbone organique grâce à l'apport d'énergie et de pouvoir réducteur tirés de l' H_2 .

Dans l'expérience suivante, nous tentons de cerner plus étroitement cette lithohétérotrophie.

III.1.3. Effets sur la croissance, l'âge et la RuBPCase, de deux transitions, l'une de conditions hétérotrophes à des conditions lithohétérotrophes, la seconde de conditions lithohétérotrophes à des conditions mixotrophes.

Nous avons défini un type de métabolisme lithohétérotrophe (chap. III.1.1.). Il convient néanmoins de distinguer entre un métabolisme de cette sorte et les conditions que nous appelons "lithohétérotrophes" pour indiquer que nous fournissons, en plus d'un substrat organique, de l' H_2 à la culture, sans toutefois lui procurer un apport de CO_2 . Comme nous l'avons déjà dit (chap. III.1.1), nous parlerons de "conditions mixotrophes" pour désigner une culture à laquelle nous fournissons non seulement du substrat organique et de l' H_2 , mais également du CO_2 .

L'expérience que nous décrivons dans ce chapitre consiste en une culture continue limitée par la pyruvate; la concentration de ce substrat dans la cuve au départ et dans le réservoir se monte à 6 mM. La phase gazeuse se compose tout d'abord de 95% N₂, 5% O₂. L'inoculum est une préculture hétérotrophe d'Aquaspirillum autotrophicum (substrat organique: pyruvate). Lorsque l'équilibre hétérotrophe est atteint (fig. 4 a), nous remplaçons l'N₂ par de l'H₂. La population s'accroît et tend vers un nouvel équilibre. Quand nous estimons que la courbe est suffisamment proche de l'équilibre, nous fournissons du CO₂ à la culture (phase gazeuse: 85% H₂, 5% O₂, 10% CO₂), ce qui a pour effet un nouvel accroissement de la population.

Dans l'heure qui suit la première transition, l'H₂ase apparaît, suivie 3 h plus tard par la RuBPCase. L'adjonction de CO₂ ne provoque pas de changement dans le niveau de cette enzyme, alors que l'activité spécifique de l'H₂ase triple pratiquement.

Lors de cette expérience, nous avons estimé les rendements de croissance par rapport au pyruvate dans les phases hétérotrophe et lithohétérotrophe, à partir des mesures de poids sec. Nous avons considéré le contenu des cellules en carbone comme étant constant et valant 50% du poids sec dans les deux phases. Pour le rendement hétérotrophe (Y hétérotrophe), nous avons prélevé deux

échantillons au cours des 3 h précédant l'adjonction d' H_2 . Pour les rendements lithohétérotrophes (Y lithohétérotrophe (1) et (2)), nous avons analysé deux fois deux échantillons, 13-14 h, respectivement 23-24 h après l'adjonction d' H_2 .

En culture continue, à l'équilibre, le rendement de la croissance par rapport au substrat limitant, Y (g cellules / mole substrat), est donné par:

$$Y = X / S_0 \quad (A)$$

où X : biomasse (g cellules / l, en poids sec)

S_0 : concentration du substrat dans le réservoir (M)

Pour l'équilibre hétérotrophe, nous avons:

$$Y = 0,15 / 0,006 = 25,000 \text{ g cellules / mole pyruvate}$$

Le PM de l'acide pyruvique valant 88, on obtient

$$0,284 \text{ g cellules / g pyruvate}$$

La masse de carbone dans la molécule d'acide pyruvique s'élève à 36, ce qui représente 41% du PM. On obtient par conséquent

$$0,693 \text{ g cellules / g carbone du pyruvate}$$

Et comme on admet que le carbone cellulaire représente

50% du poids sec, on obtient

$$0,346 \text{ g carbone cellulaire / g carbone du pyruvate}$$

Pendant la phase lithohétérotrophe, nous nous trouvons dans le cas particulier où le substrat par rapport auquel nous voulons calculer le rendement, est consommé au fur et à mesure qu'il est fourni. Sa concentration résiduelle et sa variation sont par conséquent négligeables. Nous faisons donc les approximations suivantes: $S \approx 0$ et $dS / dt \approx 0$, ce qui nous dispense de faire intervenir ces grandeurs et rend le calcul du rendement possible. Nous tiendrons compte par contre du taux de croissance, qui n'est pas égal au taux de dilution, tant que l'équilibre n'est pas atteint. La formule utilisée est la suivante (Marco Pagni, communication personnelle):

$$Y = (\mu / D) \times (X / S_0) \quad (8)$$

où μ : taux de croissance (h^{-1})

D : taux de dilution (h^{-1})

X : biomasse (g poids sec / l)

S_0 : concentration du substrat dans le réservoir (M)

Nous avons donc, pour la première valeur de poids sec déterminée en conditions lithohétérotrophes

(Y lithohétérotrophe (1)):

$$\begin{aligned} Y &= (0,11 / 0,087) \times (0,233 / 0,006) \\ &= 49,100 \text{ g cellules / mole pyruvate} \end{aligned}$$

d'où l'on tire, comme pour le rendement hétérotrophe:

$$0,558 \text{ g cellules / g pyruvate}$$

soit 0,681 g carbone cellulaire / g carbone du pyruvate

Les rendements, pour cette expérience, sont les suivants:

	g cell./g pyr.	g Ccell./g C pyr.
Y hétérotrophe	0,28	0,35
Y lithohétérotrophe (1)	0,56	0,68
Y lithohétérotrophe (2)	0,56	0,69

Ces chiffres montrent que, lors de sa croissance hétérotrophe, la bactérie assimile environ 1/3 du carbone provenant du pyruvate, 2/3 étant oxydés en vue de la production d'énergie et de pouvoir réducteur. L'apport d' H_2 dans les conditions où un substrat organique est présent constamment mais en concentration limitante, procure à la bactérie l'énergie nécessaire pour doubler le rapport "substrat organique assimilé / substrat organique métabolisé".

Il s'avère en outre que les valeurs du rendement de la croissance par rapport au pyruvate calculées l'une 13-14 h après l'adjonction d' H_2 , et l'autre 23-24 h après cette intervention, sont identiques. Ce résultat soulève les questions suivantes: ce rendement atteint-il très rapidement une valeur maximale ou au contraire progressivement ? y parvient-il d'une traite ou par étapes ? Par conséquent, nous avons cherché à visualiser l'évolution de ce rendement depuis l'équilibre

hétérotrophe jusqu'à l'adjonction de CO_2 .

C'est Marco Pagni qui a aimablement effectué le traitement informatique de ces données, en procédant tout d'abord à un lissage de la courbe de croissance, puis au calcul du rendement selon la formule ci-dessus, à partir de la première dérivée et de la valeur de la DD en fonction du temps. N'ayant pas pu mesurer le poids sec en chaque point, nous avons donc établi cette courbe à partir des valeurs de la DD (fig. 4 b). Nous avons toutefois constaté que le rapport DD / Psec varie, comme l'indiquent les valeurs suivantes:

<u>Conditions</u>	<u>Rapport DD / Psec</u>
hétérotrophes (équilibre)	5,3
lithohétérotrophes (1)	6,7
lithohétérotrophes (2)	6,7

Ce rapport est plus élevé en conditions lithohétérotrophes que pendant l'équilibre hétérotrophe. Cela traduit probablement une augmentation de réfringence plus importante en proportion que l'augmentation de biomasse. Nous ne savons pas si ce rapport DD / Psec augmente brusquement ou progressivement et par conséquent comment il influence la courbe du rendement.

Cependant, une tendance s'exprime clairement: le rendement cesse d'augmenter environ 7 h après l'adjonction d' H_2 , alors que l' H_2 ase vient d'atteindre son niveau d'équilibre et que la RuBPCase est à environ

70% de ce niveau. A partir de ce moment, il oscille autour d'une valeur d'équilibre.

La présence de RuBPCase dans des conditions lithohétérotrophes constitue à première vue un résultat surprenant, puisque nous ne fournissons pas de CO_2 à la culture.

Dans les premières heures de cette phase, il est clair que seule l' H_2 ase contribue à augmenter la quantité de pyruvate assimilé. En effet, cette enzyme apparaît dans l'heure qui suit l'adjonction d' H_2 , et l'accroissement de la population commence dans la troisième heure après cette transition, alors que la quantité de RuBPCase est encore pratiquement nulle. (Nous avons déjà rencontré ce phénomène dans les expériences décrites aux chap. III.1.1. et III.1.2.).

Que se passe-t-il ensuite, alors que la quantité de RuBPCase augmente jusqu'à atteindre le même niveau que dans les conditions où du CO_2 est fourni à la culture?

Face à cette question, il ne faut pas perdre de vue le fait que, lorsqu'un substrat organique est métabolisé, une production de CO_2 en résulte forcément.

Comme nous l'avons signalé plus haut, l'apport de CO_2 ne provoque pas de réponse nette du niveau de RuBPCase. Par contre, le niveau d' H_2 ase augmente quasiment du simple au triple. Ce phénomène tient probablement à une demande accrue en énergie et pouvoir réducteur par le

cycle de Calvin, tout comme dans l'expérience décrite au chap. III.1.1.

Ces résultats posent avant tout la question du fonctionnement du cycle de Calvin dans les conditions lithohétérotrophes. Par les expériences suivantes, nous avons cherché à savoir si les cellules, dans ces conditions, fixent effectivement le CO_2 ou non.

III.1.4. Culture continue en conditions lithohétérotrophes en vue d'un test de fixation du CO_2 , et transition à des conditions mixotrophes.

La nécessité d'obtenir des cellules lithohétérotrophes en vue du test de fixation du CO_2 (chap. III.1.5.) nous a fourni l'occasion d'effectuer la culture continue dont nous présentons les résultats à la fig. 5.

Le facteur limitant est le pyruvate. Sa concentration dans la cuve au départ et dans le réservoir se monte à 6 mM. La phase gazeuse se compose dès le début de 95% H_2 , 5% O_2 . Nous inoculons la culture avec une préculture hétérotrophe d'Aquaspirillum autotrophicum (substrat organique) pyruvate).

La croissance commence immédiatement. Après quelques heures, le taux de croissance tombe pratiquement à la

valeur du taux de dilution pendant 2 à 4 h selon les expériences, puis la population augmente à nouveau à un taux de croissance réduit. Ce brusque ralentissement de la croissance correspond à l'épuisement du substrat organique.

Au début de ce "plateau", l' H_2 ase n'est qu'à 27% de la valeur de son premier équilibre; elle n'atteint cet équilibre qu'à la fin de ce "plateau". Quant à la RuBPCase, elle n'est, au moment où la croissance reprend, qu'à 18% de sa valeur moyenne en conditions lithohétérotrophes et mixotrophes avec le pyruvate comme substrat organique, en culture continue limitée par ce substrat ($0,08 \mu\text{moles CO}_2 / \text{min} \times \text{mg prot}$).

L'apport de CO_2 provoque, comme dans l'expérience décrite précédemment (chap. III.1.3.), un nouvel accroissement de la population, ainsi qu'une augmentation d'un facteur approchant 3 du niveau de l' H_2 ase. Nous ne constatons pas de réponse significative quant à la quantité de RuBPCase lors de cette transition.

Notons que, dans la première phase de croissance, jusqu'au petit "palier", la bactérie ne réalise pas de gain supplémentaire par rapport à l'organohétérotrophie, les niveaux des enzymes de la lithoautotrophie ne le permettant pas.

Après le "palier", nous retrouvons une croissance semblable à celle que nous avons observée pendant la phase lithohétérotrophe de l'expérience précédente (chap. III.1.3.).

Ce sont donc des cellules se développant dans de telles conditions que nous avons utilisées pour tester la présence ou l'absence d'une fixation autotrophe de CO_2 .

III.1.5. Fixation autotrophe de CO_2 dans des conditions lithohétérotrophes.

Nous avons procédé selon la méthode décrite au chap.

II.6. En voici le principe brièvement résumé: nous récoltons des cellules se développant dans les conditions qui nous intéressent, les réactivons 20 min (avec le mélange de gaz utilisé pour la culture), puis injectons, au temps 0, du $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. Nous prélevons ensuite, à des temps différents, des aliquotes pour lesquelles nous arrêtons la réaction par mélange avec du méthanol chaud acidifié. La radioactivité incorporée est alors détectable dans un compteur à scintillation.

Nous présentons à la fig. 6 deux courbes typiques des résultats obtenus.

On voit que l'incorporation a lieu tout au long de l'expérience (fig. 6a), bien qu'à une vitesse décroissante (fig. 6b). Cela indique que le $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ n'est pas saturant dans notre mélange réactionnel. D'autre part, nous n'avons pas rapporté les valeurs obtenues aux $\mu\text{g}_{\text{prot}}$ dans le mélange. Ces résultats ne sont donc pas utilisables à un niveau strictement

quantitatif. Cependant, ils permettent de répondre à la question précise que nous nous posons, ce qu'illustre le tableau suivant:

Conditions de croissance	cpm / min*
Lithohétérotrophes, a	52340
Lithohétérotrophes, b	13730
Lithohétérotrophes, c	25840
Lithohétérotrophes, d	141160
Hétérotrophes (témoin)	840

a, b, c, d représentent des expériences différentes.

* Pour les cellules lithohétérotrophes, nous citons la vitesse maximale observée. Pour les cellules hétérotrophes, nous considérons la valeur moyenne dans les 30 sec qui suivent l'adjonction de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$.

D'après ces résultats, les cellules lithohétérotrophes incorporent entre 16 et 160 fois plus de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ que les témoins.

Nous considérons avoir montré suffisamment clairement par ces résultats, qu'une fixation autotrophe de CO_2 a effectivement lieu dans des conditions lithohétérotrophes.

Jusqu'à présent, nous nous sommes beaucoup préoccupée de la croissance en conditions lithohétérotrophes. L'expérience suivante concerne, elle, la transition de conditions lithohétérotrophes à des conditions mixotrophes.

III.1.6. Comparaison des cinétiques d'induction de l'H₂ase en présence et en absence de CO₂.

Dans leurs travaux de 1978, Aragno et Schlegel ont toujours étudié les cinétiques d'induction de l'H₂ase en présence de CO₂. Au vu des expériences décrites aux chap. III.1.1., III.1.3. et III.1.4., il est intéressant de comparer, en Warburg, les cinétiques d'induction de cette enzyme en présence et en absence de CO₂.

Comme le montre la fig. 7, l'induction a lieu dans les deux conditions, mais la synthèse est nettement plus rapide avec CO₂ que sans CO₂.

De plus, le niveau atteint sans CO₂ n'est que de 246 $\mu\text{l H}_2 / \text{h} \times \text{mg}_{\text{prot}}$, alors qu'en présence de ce gaz, nous pouvons mesurer jusqu'à 1156 $\mu\text{l H}_2 / \text{h} \times \text{mg}_{\text{prot}}$. Les conditions expérimentales ne permettent pas à cette induction d'atteindre un palier.

Remarquons encore que la représentation parabolique adoptée par Aragno et Schlegel (1978 b) permet un bon alignement des valeurs également dans les conditions sans CO₂, avant l'apparition du palier.

III.1.7. Effets sur la croissance, l'H₂ase et la RuBPCase de deux transitions, l'une de conditions hétérotrophes à des conditions lithohétérotrophes, la seconde de conditions lithohétérotrophes à des conditions mixotrophes, en culture continue, avec l'acétate comme substrat organique.

Jusqu'à présent, nous avons effectué toutes les expériences comportant un substrat organique en utilisant le pyruvate. Il était tentant de refaire au moins l'expérience décrite au chap. III.1.3. avec une autre source de carbone organique. L'acétate¹ nous a paru un substrat intéressant, car son assimilation emprunte des voies différentes de celle du pyruvate. D'habitude, cette assimilation est rendue possible par le cycle du glyoxylate, suite de réactions anapylrotiques contournant le cycle de Krebs. En effet, on ne connaît pas, chez les organismes aérobies, de mécanisme permettant de synthétiser de l'acide pyruvique ou du PEP directement depuis l'acide acétique. Il semble donc que l'acide oxaloacétique ne peut pas être régénéré par la carboxylation de l'acide pyruvique (ou du PEP) comme lorsque ce dernier sert de substrat.

Les résultats de cette expérience apparaissent à la fig. 8 a.

¹ Nous avons toujours utilisé l'acétate de Na.

La concentration en acétate dans la cuve au départ et dans le réservoir, est ajustée à 12 mM. La phase gazeuse consiste en 95% N₂, 5% O₂. Lorsque la population est parvenue à un équilibre, nous remplaçons l'N₂ par de l'H₂, ce qui provoque un nouvel accroissement de la biomasse. Quand nous estimons que la culture est assez proche d'un nouvel équilibre, nous ajoutons du CO₂ à la phase gazeuse, ce qui a pour effet une troisième augmentation de population.

L'H₂ase se comporte de la même manière que lorsque le pyruvate sert de substrat organique. Son activité spécifique triple lors de la deuxième transition.

La RuBPCase, par contre, montre pendant la phase lithohétérotrophe, une activité spécifique presque 3 fois supérieure à celle que nous avons observée dans toutes les conditions étudiées jusqu'ici. Lors de la transition vers la phase mixotrophe, cette activité tombe brusquement pour rejoindre le niveau observé au cours des autres expériences (environ 0,08 μmoles ¹⁴C¹⁴CO₂ / min x mg_{prot}⁻¹). Comme pour l'expérience où le pyruvate sert de substrat organique, nous avons testé la capacité des cellules prélevées dans la phase lithohétérotrophe à fixer le CO₂. Le résultat est positif. L'essai que nous avons réalisé donne une valeur de 18000 cpm / min, à comparer avec les résultats présentés sur le tableau du chap. III.1.5.).

Les rendements de croissance (Y) par rapport à l'acétate, estimés à partir des mesures de poids secs, sont du même ordre que ceux que nous obtenons avec le pyruvate.

Dans le tableau ci-dessous, nous mentionnons les valeurs obtenues au cours de deux expériences, (a) et (b).

Pour la détermination du rendement hétérotrophe, les cellules ont été prélevées environ 1 h avant l'adjonction de l' H_2 . Pour la détermination des rendements lithohétérotrophes (1) et (2), nous avons effectué les prélèvements 24 h (pour les expériences (a) et (b)), respectivement 54 h (pour l'expérience (a)) et 45 h (pour l'expérience (b)), après l'adjonction d' H_2 . Le calcul des rendements se fait comme expliqué au chap. III.1.3.

	g cell./g ac		g Ccell./g Cac	
	(a)	(b)	(a)	(b)
Y hétérotrophe	0,22	0,29	0,27	0,37
Y lithohétérotrophe (1)	0,47	0,55	0,58	0,69
Y lithohétérotrophe (2)	0,50	0,47	0,63	0,58

En conclusion, qu'il s'agisse du pyruvate ou de l'acétate, un tiers environ du substrat est assimilé en conditions hétérotrophes. Dans les deux cas, l'apport d' H_2 permet à la bactérie de doubler cette assimilation.

De même que pour l'expérience où le pyruvate servait de substrat organique (chap. III.1.3.), nous avons établi une courbe représentant l'évolution du rendement de la croissance en fonction du temps (fig. 8b). La tendance qui se manifeste est la même qu'en présence de pyruvate: le rendement augmente dès l'adjonction d' H_2 , pour se stabiliser autour d'une valeur d'équilibre environ 10 h après la transition, alors que l' H_2 ase a presque atteint son niveau d'équilibre et que la quantité de RuBPCase est à environ 70% de sa valeur d'équilibre.

En ce qui concerne les rapports "DO / poids sec" aux équilibres hétérotrophes et lithohétérotrophes, ils varient également dans le sens d'une augmentation lors du passage de conditions hétérotrophes à lithohétérotrophes, comme le montrent les valeurs suivantes:

<u>Conditions</u>	<u>Rapports DO / Psec</u>
Hétérotrophes (équilibre)	6,2
Lithohétérotrophes (1)	7,9
Lithohétérotrophes (2)	7,7

La différence essentielle entre les croissances sur l'un et sur l'autre substrat, réside dans la quantité de RuBPCase durant la phase lithohétérotrophe, ainsi que dans son évolution lors du passage de conditions lithohétérotrophes à mixotrophes.

III.2. Effets de l'apport de substrat organique sur les enzymes de la lithoautotrophie et sur la croissance autotrophe.

III.2.1. Prémices.

Rappelons deux résultats obtenus par Michel Aragno avant le début de ce travail.

1°) L'adjonction de pyruvate (concentration finale:

10 mM) à une culture en croissance exponentielle

autotrophe (fig. 11), a pour effets:

- d'augmenter le taux de croissance
- d'abaisser l'activité spécifique de l' H_2 ase d'environ 45%

4 h après l'adjonction de ce composé, le taux de croissance devient pratiquement nul. Puis, après quelques heures, la quantité d' H_2 ase et la vitesse de croissance recommencent à augmenter, presque simultanément.

Cette expérience soulève la question suivante: pourquoi, une fois le substrat consommé, la croissance s'arrête-t-elle alors qu'il reste encore 55% de l'activité spécifique initiale de l' H_2 ase? Du reste, cette croissance reprend alors que l'activité de l'enzyme est loin d'avoir rejoint son niveau maximal.

2°) L'adjonction de pyruvate à une culture continue autotrophe limitée par l'azote entraîne un abaissement de l'activité spécifique de l' H_2 ase:

- d'environ 75% quand la concentration de pyruvate dans le réservoir est de 9 mM
- d'environ 25% quand elle est de 1,8 mM

Ces deux résultats montrent que la bactérie régule son niveau d' H_2 ase en fonction de la quantité de substrat organique à disposition. Cependant, cette régulation ne permet pas, à elle seule, de rendre compte de l'arrêt de la croissance après l'épuisement du pyruvate dans l'expérience décrite sous 1°).

C'est pourquoi nous avons cherché à savoir comment l'apport de substrat organique agit sur l'autre aspect du métabolisme lithoautotrophe, la fixation du CO_2 .

III.2.2. Effet de l'apport de quantités croissantes de pyruvate sur les enzymes de la lithoautotrophie, en culture continue.

Il s'agit d'une culture continue limitée par l'azote (source d'azote: NH_4Cl). La phase gazeuse se compose de 85% H_2 , 5% O_2 , 10% CO_2 . Cet apport de gaz est maintenu tout au long de l'expérience.

Au départ, les conditions sont autotrophes. Puis nous effectuons plusieurs transitions à des conditions

Conditions	NEL* résiduel (ml)	Pyruvate résiduel (ml)	DO	Biomasse (gcell./l)	Nombre de cell. (cell./ml)	Présence de PNB tit	Activité de l'hexose (2)	Activité de la RuBPCase (3)
Exp. (a) auto.	n.d.	0	0,70	0,20	34×10^8	-	1220	0,054
mixo. 3 ml pyr.	n.d.	n.d.	0,70	0,20	41×10^8	-	1017	0,029
Exp. (b) auto.	n.d.	0	0,75	0,16	40×10^8	-	1194	0,054
mixo. 3 ml pyr.	n.d.	n.d.	0,05	0,16	47×10^8	-	372	0,003
mixo. 10 ml pyr.	n.d.	1,70	1,15	0,21	99×10^8	-	90	0,000

n.d.: non détectable

mixotrophes avec différentes concentrations de pyruvate, sans repasser chaque fois par des conditions autotrophes.

Nous nous sommes intéressée exclusivement aux états d'équilibres, prélevant des échantillons 50 à 100 h après les transitions.

Pour des raisons techniques, nous avons dû réaliser cette expérience en deux fois (expériences (a) et (b)): l'expérience (a) comprend les phases autotrophe et mixotrophe avec 2 mM de pyruvate, l'expérience (b) les phases autotrophe, mixotrophe avec 5 mM de pyruvate, et mixotrophe avec 10 mM de pyruvate.

Le tableau ci-contre réunit les résultats obtenus.

Ces résultats montrent que l'azote limite la croissance dans toutes les conditions étudiées. Quant à l'aspect hétérotrophe de la croissance, il n'est plus limité avec 10 mM de pyruvate. Puisque, en conditions non limitées par l'azote, 6 mM de pyruvate permettent d'atteindre une DO d'environ 0,8, on pouvait s'attendre à ce que ce substrat soit en excès au-delà de cette concentration, lors de la croissance limitée par l'azote.

Dans ces conditions où le pyruvate est présent en excès, la bactérie accumule du PHB, ce qui provoque une augmentation de biomasse. Il semble que la DO augmente dans une proportion légèrement plus importante (facteur 1,44) que la masse de cellules / l (facteur 1,31). Le nombre de cellules / ml s'élève d'un facteur 2 quand on passe à des conditions non limitées en carbone organique! Nous n'avons à l'heure actuelle aucune

hypothèse concernant ce phénomène.

Mais le résultat le plus important pour nous, concerne la variation des activités spécifiques de l' H_2ase et de la RuBPCase en fonction de la concentration de pyruvate présente dans le milieu de réserve.

La fig. 9 montre clairement que:

- les deux enzymes sont soumises à une régulation dépendante de la quantité de substrat dans le réservoir
- la RuBPCase en est affectée plus fortement que l' H_2ase .

Ces résultats expliquent que, dans l'expérience décrite au chap. III.2.1. (sous chiffre 1^o), la croissance s'arrête presque complètement après la consommation du substrat. En effet, le fonctionnement du métabolisme hétérotrophe a provoqué une baisse si importante de l'activité du cycle de Calvin, que lorsque le substrat organique est épuisé, il est nécessaire d'attendre que cette activité remonte au-delà d'un certain seuil pour que la croissance reprenne.

La question se pose maintenant de savoir si les régulations observées ont lieu au niveau de la synthèse des enzymes ou de leur activité. En ce qui concerne l' H_2ase , nous tentons d'y répondre par l'expérience suivante.

111.2.3. Effet du pyruvate sur l'activité hydrogène-oxydase.

Pour réaliser ce test, nous prélevons des cellules pendant le premier équilibre mixotrophe (2 mM pyruvate) de l'expérience décrite ci-dessus, puis mesurons leur activité hydrogène-oxydase en fiole de Warburg. Après 40 ou 50 min de mesure, nous ajoutons à la suspension de bactéries 0,2 ml de solution de pyruvate et mesurons à nouveau l'activité pendant 50 min.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus:

Composition de la phase gazeuse (%)	Conc. de pyr. (mM)	Activité avant adj. du pyr. ($\mu\text{H}_2/\text{hxDO}$)	Activité après adj. du pyr. ($\mu\text{H}_2/\text{hxDO}$)
$\text{N}_2, \text{O}_2, \text{CO}_2$ 85, 5, 10	10	0 *	1,8 *
$\text{H}_2, \text{O}_2, \text{CO}_2$ 85, 5, 10	0	685	710
$\text{H}_2, \text{O}_2, \text{CO}_2$ 85, 5, 10	10	739	782
$\text{H}_2, \text{O}_2, \text{CO}_2$ 85, 5, 10	20	735	729
$\text{H}_2, \text{O}_2, \text{CO}_2$ 85, 5, 10	50	760	789

* Ces valeurs traduisent une activité parasite consommatrice de gaz que l'on ne peut bien entendu pas

exprimer en $\mu\text{l H}_2 / \text{h} \times \text{DQ}$, puisqu'il s'agit d'un témoin où l' H_2 est remplacé par de l' N_2 .

Ces résultats montrent que le pyruvate n'exerce aucune action directe sur l'activité de l' H_2 ase. Nous pouvons donc conclure que cette régulation a lieu au niveau de la synthèse de l'enzyme.

III.3. Croissance d'*Aquaspirillum autotrophicum* avec le formiate.

La capacité d'utiliser les composés en C₁ est largement répandue chez les bactéries parmi différents groupes taxonomiques. Les microorganismes capables de croître avec les substrats en C₁ ont développé plusieurs méthodes d'assimilation du carbone: cycle du ribulose monophosphate, voie de la sérine, oxydation des composés monocarbonés en CO₂ et fixation de ce CO₂ par le cycle de Calvin.

Nous avons voulu savoir si la capacité d'assimiler le CO₂ via le cycle de Calvin conférait également à *Aquaspirillum autotrophicum* la faculté d'utiliser le formiate comme seule source de carbone et d'énergie, et si oui, ce qu'il advenait alors de la capacité d'oxyder l'H₂.

Nous avons effectué ce test en culture batch, en fermenteur (milieu minéral + formiate de Na 0,4%), en présence d'air, avec agitation, et avons constaté une croissance dont les paramètres sont les suivants:

Taux de croissance (h ⁻¹)	Y * (gcell./gfor.)	Y * (gCcell./gCfor.)
0,07	0,034	0,065

* Y: rendement de la croissance

Cette croissance est la plus lente qu'il nous a été donné d'observer jusqu'à présent (cf. ce travail, ainsi que Aragno et Schlegel, 1978 b). Quant à la quantité de carbone cellulaire formée par g de carbone provenant du formiate, elle est environ 5 fois plus faible qu'avec le pyruvate ou l'acétate en conditions hétérotrophes.

A titre de comparaison, Alcaligenes eutrophus forme 0,051 gcell./gfor., soit 1,5 fois plus qu'Aquaspirillum autotrophicum (Friedrich et al. 1979), alors que chez d'autres bactéries, cette assimilation est encore plus efficace (Paraccocus denitrificans: 0,078 gcell./gfor.; Thiobacillus A2: 0,076 gcell./gfor.; Pseudomonas oxalaticus OX1: 0,074 gcell./gfor.) (travaux cités par Friedrich et al. 1979).

Nous avons également étudié la présence ou l'absence des enzymes de la lithoautotrophie avec ce substrat:

Conditions	H ₂ ase	RuBPCase
For./air	-	+
For./95%H ₂ , 5%O ₂	+	+
For./85%H ₂ , 5%O ₂ , 10%CO ₂	+	+

La RuBPCase est présente dans toutes les conditions testées, ce qui indique que le CO₂ provenant du formiate est fixé par le cycle de Calvin. En absence d'H₂, l'H₂ase n'est pas induite.

III.4. Comportement d'une population mixte comprenant le type sauvage d'*Aquaspirillum autotrophicum* et un mutant hétérotrophe de cette bactérie, lors de deux transitions, l'une de conditions hétérotrophes à des conditions lithohétérotrophes, la seconde de conditions lithohétérotrophes à des conditions mixotrophes, en culture continue.

Lors de son travail de licence, Eric Droz a isolé un mutant d'*Aquaspirillum autotrophicum* ayant perdu la capacité de fixer l' H_2 (mutant Hup-) et donc incapable de se développer en conditions lithoautotrophes. Le métabolisme organohétérotrophe, cependant, n'a apparemment pas été touché par le traitement mutagène; en effet, les taux et rendement de croissance sur pyruvate, ainsi que le taux de croissance sur succinate sont identiques à ceux du type sauvage.

D'autre part, nous avons remarqué que ce mutant pousse bien sur le formiate (avec air), ce qui indique que les fonctions liées à la fixation autotrophe du CO_2 n'ont pas (ou peu) été altérées par la mutagenèse.

Avant d'effectuer la culture mixte, nous avons testé l'aptitude de la souche mutante à la réversion spontanée, de la manière suivante: à partir d'une culture liquide (bouillon nutritif) de cette souche, nous avons réalisé une série de suspensions-dilutions dont nous avons inoculé des boîtes de Petri contenant du milieu minimum (incubation en conditions lithoautotrophes sous

atmosphère composée de 85% H₂, 10% CO₂, 5% O₂). Nous n'avons trouvé aucun révertant.

Les conditions de la culture mixte sont les mêmes que celles de l'expérience décrites au chap. III.1.3. Toutefois, l'inoculum se compose d'environ 50% de type sauvage et 50% de mutant.

Tout au long de l'expérience, nous prélevons des échantillons, au sein desquels nous cherchons à déterminer les proportions de type sauvage et de mutant. A cette fin, nous procédons, pour chaque échantillon, à une série de dilutions, à la mise en culture en milieux solides hétérotrophes (milieu minéral + 0,5% pyruvate) et autotrophe (milieu minéral + 85% H₂, 5% O₂, 10% CO₂), puis au dénombrement sur l'un et l'autre milieu¹. En effectuant les comptages, nous avons remarqué, sur la plupart des boîtes contenant du milieu autotrophe, que deux types de colonies s'y développaient. Une partie avait une taille normale, les autres se réduisaient à de petits points ("pin-points"). De plus, en rapportant le nombre total des colonies (normales + "pin-points") se développant sur milieu autotrophe au nombre des colonies présentes sur milieu hétérotrophe, nous obtenons dès la

¹ Dans le but de différencier type sauvage et mutant, nous avons sélectionné, à partir du mutant hétérotrophe, une souche résistante à 1 mg / ml de streptomycine. Malheureusement, son taux de croissance sur pyruvate étant plus faible que celui de la souche sauvage, nous n'avons pas pu l'utiliser, et avons dû opter pour un double comptage (en conditions hétérotrophes d'une part, en conditions autotrophes d'autre part, comme décrit dans le texte).

phase hétérotrophe une proportion de 80-90% de bactéries se développant en conditions lithoautotrophes. Par contre, en établissant le rapport du nombre des colonies normales au nombre des colonies hétérotrophes, ou bien au nombre total de colonies (normales + "pin-points") présentes sur milieu autotrophe, nous arrivons à des valeurs avoisinant 50% d'autotrophes dans la première phase de notre culture, ce qui nous paraît tout à fait logique.

Comment interpréter ce phénomène? Il faut tout d'abord être attentif au fait que, ayant inclus l'inoculum dans l'agar, la croissance autotrophe en est très ralentie, puisqu'elle dépend de gaz devant diffuser à travers le milieu solide. Nous avons donc émis l'hypothèse suivante: le mutant est capable de réaliser une croissance oligotrophe, croissance que la longue période d'incubation a mis en évidence sous forme de ces colonies "pin-points".

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons resuspendu quelques-unes de ces minuscules colonies dans de l'eau physiologique stérile, étalé un peu de cette suspension sur de l'agar nutritif, puis repiqué plusieurs des colonies obtenues d'une part sur agar nutritif, d'autre part sur milieu autotrophe. Les bactéries - que nous avons identifiées comme étant bien Aquaspirillum autotrophicum - se développent normalement sur agar nutritif, mais aucune croissance n'a lieu sur milieu autotrophe (une croissance oligotrophe n'a pas le temps de s'établir dans ce test, les bactéries ayant été

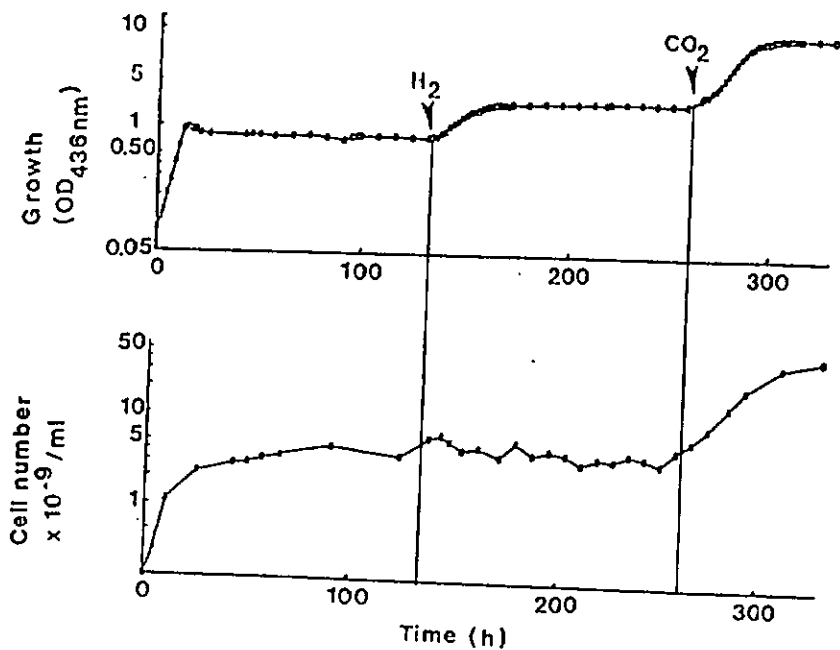
inoculées à la surface de l'agar).

La fig. 10 illustre les résultats de la culture mixte. Nous avons choisi de présenter la courbe "% d'autotrophes en fonction du temps" obtenue en calculant le rapport "nombre de colonies normales / nombre de colonies totales (normales + "pin-points)". Toutefois, si nous reportons le rapport "nombre de colonies normales / nombre de colonies hétérotrophes" en fonction du temps, nous obtenons une courbe de même allure, mais avec des valeurs légèrement inférieures (en moyenne 5% d'autotrophes en moins).

L'allure de la courbe "DO en fonction du temps" est la même que celle de l'expérience où seul le type sauvage était présent (chap. III.1.3.). Pendant les phases hétérotrophe et lithohétérotrophe, les DO se stabilisent aux mêmes valeurs dans les deux expériences.

Durant l'équilibre hétérotrophe, le pourcentage d'autotrophes se maintient à environ 45%; sous l'effet de l'adjonction d' H_2 , cette proportion augmente pour se stabiliser à 68% lors de l'équilibre lithohétérotrophe. A la suite du passage en conditions mixotrophes, la population autotrophe élimine le mutant.

Nous devons toutefois émettre une réserve au sujet de ces résultats. En effet, le nombre de cellules n'est pas forcément un reflet de la biomasse, ce que montre de façon frappante la fig. 10. Nous y voyons que la courbe "nombre total de cellules en fonction du temps" (nombre



Taille des cellules

Type sauvage:



Mutant:



de cellules sur milieu hétérotrophe), ne suit pas la courbe "DO en fonction du temps", et ceci particulièrement dans les phases hétérotrophe et lithohétérotrophe. Ces différences traduisent probablement des changements dans le volume des cellules au cours du temps. Comme rien ne laisse supposer que ces variations de taille affectent les deux populations de façon identique, nous ne pouvons considérer les valeurs obtenues pour les proportions autotrophes / total que comme indicatives.

Risquons cependant une interprétation des différences entre les deux courbes, tout en restant consciente de l'aspect spéculatif que cela implique.

Supposons, en première approximation et pour simplifier la réflexion, que les variations de taille au sein de la population hétérotrophe sont, à partir de l'équilibre hétérotrophe, négligeables par rapport à celle qui affectent la population autotrophe; en effet, il n'y a aucune raison a priori, pour imaginer un changement de métabolisme au sein de la population hétérotrophe. Le schéma ci-contre est donc à même de rendre compte des différences entre les deux courbes.

Selon cette interprétation, c'est lors de la phase lithohétérotrophe que les divergences de volumes cellulaires entre les deux populations sont les plus importantes.

D'autre part, si nous admettons que les variations de taille sont semblables dans les deux populations lors de

la phase hétérotrophe, nous pouvons poser que, durant cette phase, le rapport "DD des autotrophes / DD totale" est identique au rapport "nombre de cellules autotrophes / nombre de cellules total". Ce dernier étant de 45% et la DD de la culture de 0,77 à l'équilibre hétérotrophe, la contribution de la population autotrophe à la biomasse se monte alors à 0,35 DD, celle de la population mutante à 0,42 DD.

Si maintenant on pose que la contribution de la population hétérotrophe à la biomasse reste égale à elle-même lors de la transition hétérotrophie ----> lithohétérotrophie, le rapport "DD des autotrophes / DD totale" devient égal à 78%. Or le rapport "nombre de cellules autotrophes / nombre de cellules total", déterminé expérimentalement, n'est que de 68%

La tendance apparaît donc clairement: la part de biomasse due aux cellules autotrophes est plus importante que ne le laissent supposer les dénombrements. Ceci concorde avec notre idée d'un accroissement de la taille des cellules autotrophes dans ces conditions.

De plus, on peut se demander si, comme nous l'avons d'abord posé, la biomasse hétérotrophe se maintient égale à elle-même lors de la transition, ou si elle subit au contraire un lessivage partiel durant la croissance lithohétérotrophe de la population autotrophe, ce qui ne ferait qu'appuyer notre hypothèse.

IV. DISCUSSION

IV.1. Les capacités mixotrophes: une fonction de l'environnement.

Lorsque nous fournissons à Aquaspirillum autotrophicum, précultivée en conditions hétérotrophes un substrat organique, de l' H_2 et du CO_2 , tous en excès (chap. III.1.1. et fig. 1), cette bactérie ne réalise à aucun moment une croissance mixotrophe utilisant tous les substrats simultanément (pyruvate, H_2 , CO_2).

En effet, la présence de substrat organique réprime le fonctionnement du métabolisme lithoautotrophe. Le système permettant l'utilisation de l' H_2 semble toutefois moins sensible que le RuBPCase, puisque l' H_2 ase est synthétisée dès les premières heures de la culture. Son action procure un léger gain à la bactérie, par rapport à une croissance purement hétérotrophe. Cependant, au sein même de cette première phase, l' H_2 ase semble soumise à une régulation subtile (voir chap. IV.3.).

De Cicco et Stukus, en 1968, ont également observé des courbes diphasiques en soumettant Hydrogenomonas eutropha (Alcaligenes eutrophus) à des conditions mixotrophes. Avec des substrats comme l'acétate et le pyruvate, les courbes obtenues sont très semblables à celles que nous montrons sur la fig. 1, et traduisent également un phénomène de répression de la RuBPCase (Stukus et De

Cicco, 1970). Le système d'utilisation de l' H_2 , qui, selon ces auteurs, est déjà présent au cours de la première phase de croissance, ne permet pas, semble-t-il, de gain de biomasse significatif par rapport à une utilisation organohétérotrophe du substrat organique. Contrairement à Aquaspirillum autotrophicum, dont les aspects lithotrophe et autotrophe du métabolisme font preuve, au moins dans quelques conditions transitoires, d'une certaine indépendance l'un par rapport à l'autre, Alcaligenes eutrophus a besoin de ces deux aspects pour tirer de l'énergie de l' H_2 . En effet, en présence d' H_2 et de substrats tels que le tryptophane, l'alanine, et la phénylalanine, cette bactérie réalise un gain de biomasse par rapport à une croissance organohétérotrophe. Mais alors, aucun plateau ne sépare les deux phases de croissance, ce qui suggère aux auteurs que les deux systèmes (lithotrophe et autotrophe) fonctionnent durant la phase mixotrophe (De Cicco et Stukus 1968). Cette hypothèse se trouve confirmée par des dosages de l'activité de la RuBPCase en présence de ces différents substrats (Stukus et De Cicco 1970). Dans le même sens, lorsqu'une culture autotrophe d'Alcaligenes eutrophus est soumise à une adjonction de lactate, on constate un gain de biomasse plus important si on maintient une atmosphère contenant H_2 et CO_2 que si on remplace cette atmosphère par de l'air au moment où on ajoute le substrat organique (Rittenberg et Goodman 1969). Mais, ici encore, la croissance mixotrophe implique la participation des deux systèmes de la lithoautotrophie.

Lorsqu'une culture d'Aquaspirillum autotrophicum est soumise à des conditions mixotrophes en présence d'une quantité limitante de substrat organique (chap. III.1.2. et suivants et fig. 2 et suivantes), nous assistons à une expression plus complète des potentialités mixotrophes de cette bactérie. En effet, après une phase transitoire où seule l'oxydation d' H_2 permet une augmentation de la population, la bactérie consomme simultanément le substrat organique et les substrats inorganiques (H_2 et CO_2).

Or, dans les environnements naturels, il semble que la plupart des substrats soient présents en concentration limitante.

Il n'est donc pas étonnant que le comportement d'un organisme soit différent si les concentrations en substrats sont limitantes ou non dans nos cultures. En 1976, Harder et Dijkhuizen ont d'ailleurs montré que de nombreux phénomènes de diauxie observés en culture batch n'ont pas lieu quand les concentrations en substrats sont suffisamment basses (voir aussi chap. I.3. de ce travail).

Certains travaux, effectués sur Thiobacillus novellus (Perez et Marin 1980; Leefeldt et Marin 1980), illustrent bien ce phénomène. Ces études montrent que T. novellus, croissant dans un environnement mixotrophe où les substrats (glucose et thiosulfate) sont en excès, réprime et inhibe certaines enzymes impliquées dans les métabolismes du glucose et du thiosulfate, de sorte que

le taux d'utilisation de ces substrats s'en trouve réduit par rapport aux taux d'utilisation hétérotrophe et autotrophe. De plus, cet organisme semble découpler partiellement la production d'énergie à partir de ces substrats, ce qui peut paraître étonnant. Ces régulations impliquent que, malgré l'utilisation simultanée des deux substrats, ni le rendement ni le taux de croissance mixotrophes ne surpassent le rendement et le taux de croissance hétérotrophes. Par contre, en conditions de limitation, les phénomènes de répression et de découplage n'ont pas lieu, ce qui permet une utilisation plus efficace des deux substrats.

Selon Gottschal et Kuenen (1980 a), Thiobacillus A2 cultivé en présence d'acétate et de thiosulfate, en batch, n'utilise ces deux composés simultanément, que si l'acétate, qui réprime la synthèse des enzymes servant à l'utilisation du thiosulfate, n'est pas présent à une concentration trop élevée. Mais la croissance cesse dès que tout l'acétate a été consommé, ce qui est dû à l'incapacité des cellules de fixer le CO_2 à ce moment-là. (Ces auteurs ne précisent malheureusement pas si cette croissance présente un rendement meilleur qu'une croissance hétérotrophe). Par contre, sous conditions de double limitation par ces substrats en chemostat, il apparaît clairement que le rendement de la croissance dépasse la somme des rendements observés avec chacun de ces substrats séparément.

Smith et al., en 1980, mentionnent eux aussi une croissance mixotrophe chez Thiobacillus A2, en conditions

de double limitation par le glucose et le thiosulfate.

Bien que les régulations soient différentes chez Aquaspirillum autotrophicum, on constate que chez tous ces organismes, l'avantage de posséder des capacités mixotrophes n'apparaît véritablement que dans des conditions où au moins l'un des substrats impliqués est en concentration limitante.

IV.2. La lithohétérotrophie, cas particulier de mixotrophie.

Notre travail établit clairement (chap. III.1.1. et III.1.2.) l'existence d'un mode de croissance au cours duquel l'énergie tirée de l' H_2 permet un taux d'assimilation plus important du substrat organique qu'en conditions organohétérotrophes. Nous avons appelé ce type de métabolisme "lithohétérotrophie"¹. Au cours d'une telle croissance, tout le carbone provient du substrat organique, la fixation autotrophe de CO_2 n'ayant pas lieu (RuBPCase absente ou éventuellement inactive). Un tel

¹ Comme nous l'avons déjà mentionné, il convient de distinguer entre le métabolisme lithohétérotrophe, dont nous montrons qu'il ne s'exerce que transitoirement chez notre bactérie, et les conditions que nous appelons "lithohétérotrophes" pour indiquer que nous ne fournissons pas de CO_2 à la culture.

mode de croissance semble être la règle chez certains Thiobacilles dont Thiobacillus perometabolis (Vishniac 1974; Gottschal et Kuenen 1980 b). Ces organismes sont capables d'utiliser les composés réduits du soufre comme sources d'énergie, mais ne peuvent pas fixer le CO_2 , tirant par conséquent leur carbone de composés organiques. Chez certaines espèces du genre Beeggiatoa, la présence de sulfure entraîne une diminution importante du taux d'oxydation de l'acétate, ainsi qu'une augmentation du rendement de croissance. Il s'agit donc probablement d'une croissance lithohétérotrophe, une fixation de CO_2 par les voies autotrophes n'ayant jamais été prouvée à l'intérieur de ce groupe (Larkin et Strohl, 1983).

Ayant constaté l'existence d'une croissance lithohétérotrophe chez Aquaspirillum autotrophicum, nous avons tenté de créer des conditions où ce métabolisme pourrait s'exprimer pleinement et durablement: nous avons fourni de l' H_2 et de l' O_2 (mais pas de CO_2) à une culture limitée par le pyruvate (chap. III.1.3. et fig. 4). Notre but était de quantifier le gain que procurait l' H_2 , dans les conditions où le substrat est utilisé en permanence tout en permettant la synthèse de l' H_2 ase à un taux élevé. Nous avons alors découvert qu'A. autotrophicum, en présence d' H_2 , n'induit pas seulement son H_2 ase, mais aussi, et sans que du CO_2 ne soit amené de l'extérieur, sa RuBPCase. Ayant établi (chap. III.1.5.) que les cellules fixaient effectivement le CO_2 dans ces conditions, nous ne pouvions pas mettre l'augmentation du rendement de la croissance dans cette phase uniquement

sur le compte d'un métabolisme lithohétérotrophe. Il n'est donc pas possible, au moyen d'une telle culture, de maintenir une croissance lithohétérotrophe isolément de façon durable, et donc de l'étudier d'un point de vue quantitatif. Un moyen d'atteindre ce but serait de soumettre à ce même type d'expérience un mutant incapable de fixer le CO_2 par le cycle de Calvin mais ayant conservé les mêmes propriétés hétérotropes que la souche sauvage, ainsi que la capacité d'oxyder l' H_2 (mutant lithohétérotrophe). Malheureusement, ce mutant n'a pas encore été obtenu.

Pseudomonas carboxydoflava, cultivée en batch, en présence de pyruvate et de CO_2 , ou de pyruvate et d' H_2 , assimile une quantité plus importante de pyruvate que lors d'une croissance en présence de ce substrat seul (Kiessling et Meyer, 1982). Chez cette bactérie, l' H_2 ase et la CO -oxydase sont constitutives, alors que la RuBPCase n'est synthétisée qu'en absence de substrat organique. Une telle croissance (substrat organique + H_2 ou substrat organique + CO), pendant laquelle ces auteurs ont montré que tout le carbone provient du pyruvate, peut donc être considérée comme lithohétérotrophe. Le gain de DO par rapport à l'hétérotrophie se monta à 7% en présence de CO_2 , et à 35% en présence d' H_2 . A titre de comparaison, nous obtenons, avec Agasspirillum autotrophicum, à l'issue de la première phase de la culture batch en conditions mixotrophes décrite au chap. III.1.1., un gain de 21%

On peut également conclure à une croissance de type lithohétérotrophe chez Thiobacillus A2 en chemostat quand les concentrations des substrats (acétate et thiosulfate) sont maintenues dans certaines limites (Gottschal et Kuenen 1980 a). En effet, lorsque la concentration en thiosulfate est assez faible par rapport à la concentration en acétate, cet organisme cesse de fixer le CO_2 .

Quant à nos études en chemostat sur la lithohétérotrophie, elles ne concernent que des cultures limitées par le substrat organique. Des conditions de double limitation (par l' H_2 et par le substrat organique) nous fourniraient-elles un deuxième moyen d'obtenir un équilibre lithohétérotrophe? ¹

En ce qui concerne Alcaligenes eutrophus, Kåret et Friedrich, en 1984, ont soumis cette bactérie à une transition de conditions hétérotrophes à des conditions lithohétérotrophes semblable à celle que nous avons décrite au chap. III.1.3. A. eutrophus réalise, du fait de l'adjonction d' H_2 , un gain par rapport à l'organohétérotrophie. Cependant, ces auteurs montrent que la RuBPCase est présente dans les deux conditions (hétérotrophe et lithohétérotrophe). De plus, si un mutant incapable de fixer le CO_2 par les voies

¹ Le premier moyen, mentionné plus haut, consiste en l'utilisation d'un mutant incapable de fixer le CO_2 .

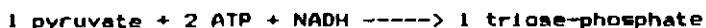
autotrophes est soumis à la même expérience, il ne réalise qu'un gain négligeable. Ce travail montre, comme ceux de De Cicco et Stukus (1968), Stukus et De Cicco (1970), et de Rittenberg et Goodman (1969), que, chez A.eutrophus, la présence de RuBPCase est nécessaire à l'augmentation du rendement de la croissance en présence d' H_2 (même sans apport extérieur de CO_2).

Ce type de transition soulève plusieurs questions.

i) Premièrement, si l'on adopte le point de vue de la rentabilité, pourquoi le cycle de calvin intervient-il alors que nous ne fournissons pas de CO_2 à la culture?

En effet, comparons les coûts énergétiques de la synthèse de triose-phosphate à partir de pyruvate par les deux mécanismes suivants:

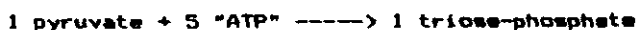
1°) Le premier mécanisme implique la néoglucogénèse:



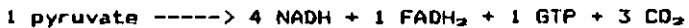
Si on considère que 1 NADH équivaut à 3 ATP

que 1 $FADH_2$ équivaut à 2 ATP

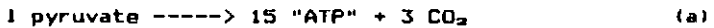
et que 1 GTP équivaut à 1 ATP:



2^o) Le second mécanisme comprend tout d'abord l'oxydation du pyruvate via le cycle de Krebs et la respiration:



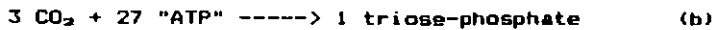
Autrement dit:



Puis la fixation du CO_2 via le cycle de Calvin:



Autrement dit:



En additionnant (a) et (b), on obtient:



Le premier mécanisme est donc nettement plus économique que le second.

Comment la bactérie joue-t-elle avec ces deux mécanismes ?

Il existe plusieurs manières d'approcher ce problème, et ces approches se complètent.

Premièrement, il faudrait essayer de suivre dans cette phase lithohétérotrophe l'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase en fonction du temps; en effet, si une régulation avait lieu au niveau de cette enzyme dans le sens d'une diminution de son activité spécifique, cela indiquerait que l'assimilation du carbone provenant du substrat organique prédomine alors sur son oxydation.

Une seconde manière d'approcher le problème serait d'exécuter systématiquement, à intervalles réguliers à partir du moment où l' H_2 est fourni à la culture, le test de fixation du CO_2 tel que nous le décrivons au chap.

II.6. Utilisé de façon quantitative, ce test permettrait de visualiser à quel moment et dans quelles proportions la fixation autotrophe du CO_2 a effectivement lieu dans la culture.

Finalement, l'étude de la croissance en conditions lithohétérotrophes d'un mutant incapable de fixer le CO_2 , serait probablement utile, également pour approcher cette question.

En tous les cas, les fig. 4 b et 8 b nous apprennent que le rendement de croissance par rapport au pyruvate dans cette phase atteint rapidement une valeur maximale aux alentours de laquelle il se maintient jusqu'au changement de conditions. Sans être en possession d'une

évidence expérimentale qui prouverait l'existence d'une corrélation absolue entre l'évolution de ce rendement et la "combinaison métabolique" adoptée par la bactérie, nous pouvons toutefois considérer ce résultat comme une indication à ce sujet. La stabilité rapidement atteinte du rendement de croissance pourrait signaler en effet que la proportion définitive entre les deux mécanismes évoqués ci-dessus est elle aussi fixée dès les premières heures de la phase lithohétérotrophe.

ii) La seconde question soulevée par ces résultats est la suivante: théoriquement, la bactérie est en mesure d'assimiler tout le carbone provenant du pyruvate, puisqu'elle a la possibilité de fixer le CO_2 libéré par l'oxydation de ce substrat. Pourquoi le rendement le plus élevé dans ces conditions lithohétérotrophes n'atteint-il que 70% d'assimilation, que le substrat soit le pyruvate ou l'acétate ?

Plusieurs hypothèses sont licites:

- Le K_s de la bactérie pour le CO_2 est élevé.
- La bactérie excrète des composés organiques en quantité non négligeable.
- Le % en carbone de la matière cellulaire change quand on passe des conditions hétérotrophes aux conditions lithohétérotrophes.

En parcourant la littérature, nous nous sommes aperçue que la proportion de carbone provenant d'un substrat organique assimilée, varie beaucoup selon l'organisme étudié et les conditions de culture (taux de dilution en particulier):

Alcaligenes eutrophus, cultivé en chemostat (Kärst et Friedrich 1984), assimile 40% du substrat organique (ici le succinate), en conditions hétérotrophes. Dans ces conditions, le rendement varie peu en fonction du taux de dilution. Lorsque de l' H_2 est fourni, le rendement passe à 80% pour un taux de dilution de $0,05 h^{-1}$ et à 95% pour un taux de dilution de $0,12 h^{-1}$. Ce rendement dépasse le rendement maximum théorique (J.G. Kuenen, comm. pers.).

Chez Thiobacillus A2, en culture continue limitée par l'acétate, Gottschal et Kuenen (1980 a) trouvent que 42% du substrat organique sont assimilés. Lorsque du thiosulfate est mis à disposition de la bactérie, celle-ci assimile jusqu'à 70% du substrat organique selon le rapport des concentrations d'acétate et de thiosulfate utilisé et pour un certain taux de dilution. Selon le taux de dilution et pour un rapport optimal des deux substrats, l'assimilation atteint 76%. Il est intéressant de noter qu'en présence de proportions acétate / thiosulfate qui permettent une fixation de CO_2 , la quantité d'acétate assimilée n'augmente que de 4% au plus, par rapport à une croissance sans fixation de CO_2 .

Avec Aquaspirillum autotrophicum, nous n'avons pas de données expérimentales concernant la variation des rendements de croissance en fonction du taux de dilution. Néanmoins, le modèle mathématique élaboré par Marco Pagni au cours de son travail de licence montre que le rendement de croissance varie en fonction du taux de croissance (et par conséquent du taux de dilution).

La quantité de matière organique excrétée, elle aussi, varie avec le taux de dilution. Les travaux de Perez et Matin, effectués sur Thiobacillus novellus en 1982, ont montré que cet organisme excrète jusqu'à 16% de la biomasse synthétisée, sous forme de composés organiques d'identité inconnue, lorsqu'il est cultivé en chemostat, en conditions autotrophes. Cette proportion diminue à des taux de dilution plus élevés. Quand on lui fournit de la biotine à la place d'extrait de levure, cette bactérie peut excréter jusqu'à 40% de la biomasse synthétisée ! (il s'agit probablement d'un cas extrême).

Quant à la proportion de carbone dans la matière sèche, nous l'avons considérée comme constante (nous avons fait nos calculs de rendements avec la valeur de 50%, moyenne traditionnellement admise).

On peut alors se poser la question d'un éventuel changement de la teneur en carbone des cellules selon le métabolisme qu'elles adoptent.

Chez Alcaligenes eutrophus, par exemple, le carbone représente 47% du poids sec, en conditions hétérotrophes comme en conditions mixotrophes (Kärst et Friedrich 1984).

Chez Thiobacillus A2, la teneur en carbone est de 49%, que le substrat utilisé soit l'acétate ou le thiosulfate, ou bien les deux ensemble (Gottschal et Kuenen, 1980 a). D'autre part, chez le même organisme, cette proportion a été estimée par d'autres auteurs (Smith et al. 1980) à 44,4% si le facteur limitant était le thiosulfate, à 44,8% si le glucose limitait la croissance, et à 42,8% en conditions de double limitation.

Nous n'avons pas trouvé d'étude qui mentionnerait des différences assez importantes dans la teneur en carbone des cellules, pour rendre compte du phénomène qui nous occupe ici.

IV.3. Régulations agissant sur les enzymes de la lithoautotrophie.

Dans aucune de nos expériences, nous n'avons décelé de capacité d'oxyder l' H_2 chez des cellules cultivées en absence de ce gaz. Ce gaz semble donc jouer un rôle d'inducteur de l' H_2 ase, comme le suggèrent déjà les travaux d'Aragno et Schlegel (1978 b). Tous les résultats

obtenus jusqu'à présent vont en effet dans ce sens et, bien qu'une évidence directe ne puisse pas encore être fournie, nous assumerons que l' H_2 ase est induite (directement ou indirectement) par la présence d' H_2 ¹.

L' H_2 ase est également inductible chez Rhizobium japonicum (Maier et al. 1979). Au contraire, chez Alcaligenes eutrophus (Friedrich et al. 1981; Friedrich 1982), les H_2 ases sont synthétisées (même en conditions hétérotrophes) sous l'effet d'une limitation en énergie. Une troisième situation caractérise Pseudomonas carboxydoflava, où l' H_2 ase semble constitutive (Kiesling et Meyer, 1982).

Il est difficile de savoir si le CO_2 intervient dans l'induction de cette enzyme chez Acetivibrio autotrophicum, car même dans les conditions où nous avons suivi l'induction en appareil de Warburg sans introduire de CO_2 dans la phase gazeuse (chap. III.1.6.), les cellules étaient susceptibles d'en produire par oxydation de substrats endogènes. Toutefois, le résultat suivant est clair: quand l'induction a lieu en Warburg, la vitesse de synthèse et le niveau d'activité enzymatique atteints sont l'une comme l'autre fortement augmentés par l'apport de CO_2 . Maier et al., en 1979, ont mis en évidence un phénomène semblable chez Rhizobium japonicum.

¹ La mise en évidence de l' H_2 ase en fonction de la présence ou de l'absence d' H_2 par réaction immunitaire constituerait, à notre avis, un moyen d'obtenir cette évidence.

Cela s'explique-t-il simplement par le fait que le CO_2 constitue une source de carbone, dont la cellule profite pour synthétiser l' H_2 ase, ou bien agit-il réellement d'une régulation au niveau de la synthèse de cette enzyme, régulation due au fonctionnement du cycle de Calvin ?

Les deux phénomènes agissent probablement ensemble. En effet, lors des transitions de conditions lithohétérotrophes à mixotrophes (chap. III.1.3., III.1.4., III.1.7.), ainsi qu'au cours de la culture batch mixotrophe (chap. III.1.1.), le niveau d'activité de l' H_2 ase triple à partir du moment où le cycle de Calvin est indispensable à une augmentation du rendement de croissance.

Ces observations nous incitent à émettre l'hypothèse d'une stimulation de la synthèse de l' H_2 ase par le besoin de NADH et/ou d'ATP, dont le cycle de Calvin est grand consommateur.

Il est utile de rappeler à ce propos, que ni chez Aquaspirillum autotrophicum, ni chez Rhizobium japonicum, le CO_2 n'agit comme stimulant de l'activité de l' H_2 ase (Aragno et Schlegel 1978 b; Maier et al. 1979). Une telle stimulation de l'activité de l' H_2 ase par le CO_2 a été mise en évidence par Bartha en 1962 et est connue sous le nom d'"effet Bartha".

Quand l' H_2 ase est induite, la RuBPCase apparaît toujours à sa suite, qu'il y ait ou non un apport

extérieur de CO_2 . Le CO_2 n'est donc pas l'inducteur de la RuBPCase. A ce propos, nous attirons l'attention sur le fait que, même en conditions organohétérotrophes, du CO_2 est constamment libéré par les processus d'oxydation du substrat organique.

Le délai d'apparition de la RuBPCase dépend des conditions. Dans les cas où du substrat organique est présent continuellement mais en concentration non réprimante (chap. III.1.2., III.1.3., III.1.4., III.1.7.), elle apparaît quelques heures après l' H_2 ase. Dans le cas où le substrat est d'abord en concentration réprimante, puis totalement absent (chap. III.1.1.), le délai grandit (10-12 heures).

D'autre part, la RuBPCase apparaît, sans l' H_2 ase, lors de la croissance de notre bactérie sur le formiate (ce composé sert de source de carbone et d'énergie, en présence d'air, donnant lieu à une croissance chimioorganoautotrophe). Chez Rhizobium japonicum également, une activité de la RuBPCase n'a été observée que dans des cellules où l' H_2 ase était induite (Simpson et al. 1979), ou bien en présence de formiate (Manian et O'Garra 1982).

De plus, Eric Droz, au cours de son travail de licence, a isolé un mutant d'Aquaspirillum autotrophicum dépourvu d' H_2 ase. En présence d' H_2 , O_2 , et CO_2 , ce mutant est incapable de se développer. Par contre, il pousse normalement sur formiate (résultat non illustré), ce qui indique que la RuBPCase est présente dans ces conditions.

Ces résultats montrent que l' H_2 , pas plus que le CO_2 , n'est l'inducteur de la RuBPCase, et que les synthèses des deux enzymes (H_2 ase et RuBPCase) ne sont pas soumises à un déterminisme commun qui agirait au niveau génétique (opéron commun par exemple).

Nous n'avons que très rarement décelé de très faibles activités de RuBPCase dans les premières heures de certaines cultures en croissance hétérotrophe (voir par exemple fig.1). Cette activité, probablement présente dans l'inoculum (hétérotrophe), disparaissait complètement au bout de quelques heures. Il faudrait faire des dosages systématiques de l'activité de la RuBPCase dès la fin de la phase exponentielle et pendant la phase stationnaire d'une culture batch hétérotrophe, afin de voir si la privation totale en source de carbone est en mesure de déréprimer cette enzyme, ou si nous sommes devant un artefact.

En tous les cas, une limitation en carbone telle qu'elle s'établit dans les cultures continues limitées par le substrat organique (chap. III.1.3. par exemple), ne suffit pas à provoquer l'apparition de la RuBPCase, car alors on devrait déjà en mesurer l'activité lors de l'équilibre hétérotrophe.

En fait, le même type de lien semble exister entre la RuBPCase et l' H_2 ase d'une part, et entre la RuBPCase et la formiate déshydrogénase d'autre part. On peut donc se demander si la proportion de NADH et/ou d'ATP, résultant tous deux de l'oxydation de l' H_2 et du formiate, n'intervient pas d'une manière quelconque dans la régulation de la synthèse de la RuBPCase.

On pourrait, bien que cela demande à être confirmé ultérieurement, cerner les conditions d'apparition de la RuBPCase dans l'idée suivante: besoin de carbone d'une part, énergie disponible d'autre part (rendue disponible grâce à l'induction de l' H_2 ase ou de la formiate déshydrogénase).

Friedrich, en 1982, arrive au même concept pour Alcaligenes eutrophus. Toutefois, il dispose de données expérimentales plus variées que nous.

Le temps nous a malheureusement manqué pour étudier le mixotrophie en présence d'un grand nombre de substrats. Il s'avère pourtant qu'une telle étude serait utile, puisque nous observons une différence importante dans le comportement de la synthèse de la RuBPCase selon que le pyruvate ou l'acétate sert de substrat organique en mixotrophie (chap. III.1.3. et III.1.7.). Il ressort

également des travaux effectués avec Alcaligenes eutrophus, que le type de substrat organique influence le comportement physiologique et enzymatique de cette bactérie (De Cicco et Stukus 1968; Rittenberg et Goodman 1969; Stukus et De Cicco 1970; Friedrich et al., 1981; Friedrich 1982). Rappelons aussi à cet égard les observations de Aragno et Schlegel (1978 b) sur les différentes vitesses d'induction de l' H_2 ase en fonction du substrat organique fourni aux cellules.

Nos résultats montrent que, lorsque le pyruvate sert de substrat organique, le RuBPCase d'Aquaspirillum autotrophicum ne répond en aucune manière à l'adjonction de CO_2 (fig. 4 a par exemple). Par contre, dans des conditions lithohétérotrophes avec l'acétate comme substrat organique (fig. 8 a), le niveau de l'activité de cette enzyme est environ 2,75 fois supérieur au niveau observé dans les conditions lithohétérotrophes avec le pyruvate comme substrat organique ($0,08 \mu\text{moles } CO_2 / \text{min} \times \text{mg}_{\text{prote}}$). A la suite de l'adjonction de CO_2 , la réponse est très nette: l'enzyme rejoint ce niveau. En conditions lithohétérotrophes avec l'acétate, le test de fixation de CO_2 (chap.II.6.) est positif. Toutefois, son aspect non quantitatif nous interdit de comparer les valeurs que nous obtenons avec d'une part des cellules se développant sur pyruvate et d'autre part des cellules se développant sur acétate.

Il est intéressant de remarquer la rapidité de la réponse à l'adjonction de CO_2 . En deux heures, le niveau

de l'activité enzymatique diminue de moitié (fig. 8 a). Il ne s'agit donc probablement pas d'un arrêt de synthèse suivi d'une dilution de l'enzyme; en effet, si c'était le cas, il faudrait attendre six à huit heures (compte tenu de la faible croissance durant les heures qui suivent immédiatement l'adjonction de CO_2), pour réduire de moitié l'activité présente au moment du changement de conditions. Le CO_2 semble donc provoquer (directement ou indirectement) une inhibition non réversible dans les conditions du test (chap. II.5.), pour autant que l'enzyme se trouve à un niveau d'activité plus élevé que $0,08 \mu\text{moles} / \text{min} \times \text{mg}_{\text{prot}}$.

On ne peut toutefois pas écarter d'emblée l'hypothèse d'un arrêt de synthèse accompagné d'une destruction rapide de l'enzyme par l'action du turnover, qui serait, dans ce cas, suffisamment rapide pour provoquer la disparition de la moitié de l'activité en deux heures environ.

Il semble qu'une telle régulation du niveau de RuBPCase par la concentration de CO_2 soit un phénomène assez répandu. Une augmentation de l'activité de cette enzyme en corrélation avec la diminution de la concentration de CO_2 a été observée par exemple chez Rhodospirillum rubrum (Sarles et Tabita 1983), Alcaligenes eutrophus (Friedrich 1982), Thiobacillus neapolitanus (Geudeker et al. 1980), Anacystis nidulans (Karagouni et Slater 1979) et Pseudomonas oxalaticus OX1 (Dijkhuizen et Harder 1979).

En revanche, l'acétate (ou son utilisation) semble stimuler cette activité, par comparaison avec l'utilisation du pyruvate. Communément, c'est la voie du glyoxylate qui sert à assimiler l'acétate. Or, cette voie libère plus de CO_2 que le cycle de Krebs intégral. Comme le CO_2 semble avoir un effet inactivateur, il y aurait à première vue une contradiction à ce qu'une voie qui libère plus de ce gaz stimule l'enzyme. Il faut noter cependant, que nous n'avons pas d'évidence expérimentale de l'utilisation de l'acétate par la voie du glyoxylate. D'autre part, Gottschal et Kuenen (1980 a) ont remarqué que Thiobacillus A2 utilise l'acétate par une voie inconnue.

Dans l'état actuel des recherches sur Aquaspirillum autotrophicum, il nous est très difficile d'émettre des hypothèses sur le type et le mécanisme de régulation intervenant ici.

Nous avons étudié un autre aspect de la régulation des enzymes de la lithoautotrophie chez Aquaspirillum autotrophicum: il s'agit de l'effet des substrats organiques sur le niveau d'activité de ces enzymes (chap.

III.2.). Il s'avère que plus la concentration de substrat organique est élevée dans le milieu qui alimente la culture continue, plus l'effet est important, que la concentration soit limitante ou non de l'aspect hétérotrophe de la croissance. Ceci montre que ce n'est pas la concentration de substrat en contact avec les bactéries qui agit sur les enzymes de la lithoautotrophie, mais bien le taux de fonctionnement du métabolisme hétérotrophe. La bactérie tend à faire fonctionner celui-ci au maximum, réprimant proportionnellement ses fonctions lithoautotrophes.

Au début de la culture batch mixotrophe (chap. III.1.1.), l'allure que revêt l'induction de l' H_2 ase semble également révéler ce phénomène. En effet, cette courbe comporte un palier qui correspond peut-être à la durée pendant laquelle le taux de consommation du substrat organique est constant, c'est-à-dire pendant la phase de croissance exponentielle.

Ces résultats confirment l'idée déjà formulée par Aragno et Schlegel (1978 b), selon laquelle A. autotrophicum est une bactérie à "préférences" hétérotrophes. En effet, ces auteurs avaient constaté d'une part que les enzymes des voies hétérotrophes sont constitutives, et d'autre part que la croissance sur gluconate ou citrate de cellules précultivées en conditions autotrophes se déroulait à la même vitesse en présence d'air ou d'un mélange d' H_2 et d' O_2 . De même, lorsque du pyruvate est fourni d'un coup à une culture

autotrophe, le taux de croissance change immédiatement pour rejoindre la valeur du taux de croissance hétérotrophe avec pyruvate.

Vont également dans le sens d'une prédominance hétérotrophe chez notre bactérie, les résultats de la culture batch en conditions mixotrophes décrite au chap.

III.1.1.

En ce qui concerne l' H_2 ase, nous avons établi la preuve que l'assimilation du pyruvate entraîne une répression de l'enzyme et non une inhibition de son activité (chap. III.2.3.).

Quant à la RuBPCase, par contre, nous n'avons pas de données qui nous permettraient de trancher. Nous pouvons tout au plus exclure une action directe (de molécule à molécule) du pyruvate sur cette enzyme. En effet, le test d'incorporation de $NaH^{14}CO_2$ (effectué sur des cellules congelées) donne des résultats identiques en présence de 10 mM pyruvate et en absence de ce substrat (résultat non illustré).

Chez Rhizobium japonicum, le succinate empêche l'induction de l' H_2 ase et de la RuBPCase (Simpson et al. 1979).

Pour conclure, nous pouvons résumer ainsi nos connaissances sur les régulations des fonctions de la lithoautotrophie chez Aquaspirillum autotrophicum:

- Nous pouvons assumer, avec une très faible probabilité de nous tromper, que l' H_2 ase est inductible, la présence d' H_2 s'avérant nécessaire à l'apparition d'une activité d'oxydation de ce gaz.
- Les conditions d'apparition de la RuBPCase semblent réunies lorsqu'un besoin de carbone se fait sentir, alors que la cellule est à même de se procurer de l'énergie. Nos données ne nous permettent pas d'établir quel mécanisme (induction, dérèpression) est responsable de la synthèse de cette enzyme.
- Les deux enzymes sont fortement réprimées par l'utilisation de pyruvate, la RuBPCase étant plus sensible à cette influence que l' H_2 ase. En revanche, des cellules qui se développent en condition de limitation par le substrat organique, montrent une activité de la RuBPCase plus élevée si ce substrat est l'acétate que s'il s'agit du pyruvate. L' H_2 ase n'est pas affectée par cette différence de substrat.
- En présence de CO_2 , la quantité d' H_2 ase obtenue et la vitesse d'induction de cette enzyme sont plus élevées qu'en absence de ce gaz.
- Alors qu'en présence de pyruvate comme facteur limitant, le niveau de RuBPCase n'est pas affecté par l'adjonction de CO_2 , cette adjonction a pour effet de diminuer ce niveau d'un facteur approchant 3 lorsque

l'acétate est le facteur limitant.

L'effet du CO_2 sur l'activité ou la synthèse de la RuBPCase demande à être étudié plus profondément par la suite.

IV.4. Aspect écologique.

Nous avons déjà touché, bien qu'indirectement, à l'aspect écologique par le simple fait d'étudier la mixotrophie chez une bactérie et l'effet de transition environnementales sur le comportement de l'organisme.

Cependant, il nous semblait intéressant de tester de manière concrète la réalité d'un avantage compétitif conféré par la lithotrophie. Nous avons donc mis en compétition le type sauvage d'Aquaspirillum autotrophicum et un mutant de cette bactérie, dépourvu de la capacité d'oxyder l' H_2 (chap. III.4).

Nous remarquons qu'en conditions hétérotrophes et lithohétérotrophes (le substrat organique étant limitant), les deux populations se côtoient en "s'ignorant". En effet, pendant la phase hétérotrophe, elles sont à égalité quant à leur efficacité vis-à-vis du

substrat organique. La capacité d'oxyder l' H_2 ¹ ne représente donc pas une surcharge énergétique pour le type sauvage en conditions hétérotrophes (cas d'une synthèse de l'enzyme en conditions hétérotrophes). Ce résultat appuie l'hypothèse de l'inductibilité de l' H_2 ase en présence d' H_2 .

L' H_2 confère un léger avantage au type sauvage, dont la population augmente en proportion, mais n'élimine pas pour autant le mutant. C'est seulement lorsque du CO_2 est fourni à la culture que le mutant est éliminé, ce gaz constituant une source non limitante de carbone pour le type sauvage.

Cette expérience montre que la possibilité d'oxyder l' H_2 procure un réel avantage compétitif à Aquaspirillum autotrophicum face à un mutant de la même espèce ayant perdu ses capacités lithotrophes.

¹ Nous ne parlons pas ici de l'aptitude à fixer le CO_2 , puisque le mutant a gardé cette propriété; les deux populations sont sur ce point à égalité.

C O N C L U S I O N

Les résultats que comporte ce travail concernent principalement la physiologie d'Aquaspirillum autotrophicum. Ce tableau physiologique peut être complété infiniment, car chaque résultat soulève de nouvelles questions (voir chap. IV). Nous avons déjà cité (chap. IV) plusieurs possibilités de recherche ultérieure:

- Répétition de certaines cultures continues avec divers mutants.
- Utilisation d'autres substrats organiques que le pyruvate et l'acétate, et l'influence de cette utilisation sur le métabolisme lithoautotrophe.
- Cultures continues limitées par l' H_2 ou le CO_2 , ou double limitation par l' H_2 et le substrat organique.
- Influence du taux de dilution sur l'utilisation des substrats.
- Etude d'autres activités enzymatiques, par exemple la phosphoribulokinase (plusieurs régulations du cycle de Calvin ont lieu à son niveau (Leadbeater et Bowien 1984; Dijkhuizen et Harder 1984); ou bien l' α -cétoglutarate déshydrogénase (indication sur l'importance de l'oxydation des substrats organiques par rapport à leur assimilation).

De plus, parmi nos résultats, ceux qui touchent plus précisément à la régulation des enzymes de la lithoautotrophie, pourraient inciter à entreprendre une étude de génétique moléculaire. Un autre tableau s'en dégagerait alors, permettant de répondre à des questions du type:

- Combien y a-t-il d'exemplaires de certains gènes ?
 - Où sont-ils situés les uns par rapport aux autres ?⁴
 - Sont-ils tous fonctionnels ?
- etc.....

De telles études sont en cours sur Alcaligenes eutrophus (Andersen et al. 1981; Friedrich et al. 1981; Friedrich et al. 1984; Hogrefe et al. 1984).

Cependant, les mécanismes biochimiques de régulations proprement dits appartiennent à un domaine d'étude qu'on pourrait qualifier d'intermédiaire entre la physiologie et la génétique. Font partie de ce domaine les questions qui concernent par exemple le mécanisme par lequel l' H_2 déclenche l'induction de l' H_2 ase chez Aquaspirillum autotrophicum. A notre connaissance, parmi les recherches effectuées sur les hydrogénobactéries, peu ont trait

⁴ Nous avons testé la présence de plasmides chez Aquaspirillum autotrophicum (résultat non illustré). Nous n'en avons jamais décelé, ce qui concorde avec les résultats de Gerstenberg et al. (1982).

directement à ce domaine qui, il est vrai, fait appel à des techniques nombreuses et variées (utilisation de systèmes acellulaires, traceurs radioactifs, purification et caractérisation de protéines, comparaison avec des mutants, isolement de fragments d'ADN, travail avec ces fragments, etc....; voir, comme exemple, le cas fameux de l'opéron lactose chez Escherichia coli).

Finalement, les données acquises au cours d'un tel travail, puisqu'elles nous renseignent directement sur la physiologie et sur la nutrition de la bactérie étudiée, débouchent inévitablement sur des questions d'ordre écologique. L'on va donc s'interroger sur les interactions entre cet organisme et son environnement (physico-chimique ou biologique).

Surgit alors le problème suivant: comment étudier l'écologie d'une bactérie? En effet, lorsqu'on a isolé un organisme, celui-ci n'est plus dans son milieu; or ce sont précisément les relations entre cet organisme et son environnement qui nous intéressent.

L'on aura donc recours à des études telles que mise en compétition de deux ou plusieurs organismes en culture continue, dont les travaux effectués sur divers Thiobacilles nous fournissent quelques exemples (voir la revue de Kuenen et al. 1985).

Il faut toutefois garder en conscience que des études de cette sorte concernent également des souches isolées,

et que le chemostat ne peut en aucun cas reproduire un milieu naturel (Jannasch 1974), puisqu'un tel environnement suppose des conditions physico-chimiques non constantes, une distribution inhomogène de cellules, une composition diverse et variable des espèces, etc... De plus, il n'existe aucun équivalent pour le taux de dilution dans une population naturelle (Jannasch 1974), les forces qui éliminent les cellules au sein d'une telle population étant individuellement sélectives (sédimentation, sporulation, mort, etc...). Or, si l'on met en compétition plusieurs organismes dans un chemostat, une élimination des cellules sans discrimination a lieu par la dilution, et ce qui en résulte n'est qu'une sélection de l'organisme dont la croissance est la plus rapide dans ces conditions.

Autrement dit, il faudra veiller à ne pas éclairer l'écologie sous le seul angle de la compétition, ce qui peut devenir particulièrement tentant quand on aborde ce domaine avec l'outil du chemostat.

Pour conclure, nous dirons qu'il est assez facile de concevoir une suite physiologique à ce travail à partir des résultats qu'il comporte, le chemostat restant alors l'une des techniques de choix. Quant aux autres directions, nous nous sommes contentée de les évoquer, puisque les démarches précises qui permettraient de s'y engager ne découlent pas directement de nos résultats.

B I B L I O G R A P H I E

ADAMS M.W.M., MORTENSON L.E. et CHEN J.S.

1981, Biochim. Biophys. Acta 594: 105-176

Hydrogenase.

ANDERSEN K.

1979, Biochim. Biophys. Acta 585: 1-11

Mutations altering the catalytic activity of a
plant-type ribulose biphosphate carboxylase /
oxygenase in Alcaligenes eutrophus.

ANDERSEN K., TAIT R.C. et KING W.R.

1981, Arch. Microbiol. 129: 384-390

Plasmids required for utilisation of molecular
hydrogen by Alcaligenes eutrophus.

ARAGNO M., WALTHER-MAURUSCHAT A., MEYER F. et

SCHLEGEL H.G.

1977, Arch. Microbiol. 114: 93-100

Micromorphology of Gram-negative hydrogen bacteria
I. Cell morphology and flagellation.

ARAGNO M. et SCHLEGEL H.G.

1978 a, Int. J. Syst. Bacteriol. 28: 112-116
Aquaspirillum autotrophicum, a new species of
hydrogen-oxidizing, facultatively autotrophic
bacteria.

ARAGNO M. et SCHLEGEL H.G.

1978 b, Arch. Microbiol. 116: 221-229
Physiological characterization of the hydrogen
bacterium Aquaspirillum autotrophicum.

ARAGNO M. et SCHLEGEL H.G.

1981, The hydrogen-oxidizing bacteria.
In: The procaryotes, a handbook on habitats,
isolation and identification of bacteria.
M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Salows,
H.G. Schlegel, eds., Springer-Verlag, Berlin /
Heidelberg / New York, p. 865-893.

BAROSS J.A., LILLEY M.D. et GORDON L.I.

1982, Nature 298: 366-368
Is the CH₄, H₂ and CO venting from submarine
hydrothermal systems produced by thermophilic
bacteria?

BARRAQUIO W.L., PADRE B.C., WATANABE I. et KNOWLES R.

1984, J. Gen. Microbiol. 132: 237-241
Nitrogen fixation by Pseudomonas saccharophila,
Doudoroff ATCC 15946.

BARTHA R.

1962, Arch. Microbiol. 41: 313-350

Physiologische Untersuchungen über den
chemolithotrophen Stoffwechsel neu isolierter
Hydrogenomonas-Stämme.

BEN-AMOTZ A.

1979, Hydrogen metabolism.

In: Encyclopedia of plant physiology, vol VI,
M. Gibbs et E. Latzko eds., Springer-Verlag,
Berlin, p. 497-506.

BEUDEKER R.F., CANNON G.C., KUENEN J.G. et SHIVELY J.M.

1980, Arch. Microbiol. 124: 185-189

Relations between D-ribulose 1,5-bisphosphate
carboxylase, carboxysomes and CO₂ fixing capacity in
the obligate chemolithotroph Thiobacillus
neapolitanus grown under different limitation in the
chemostat.

BISHOP N.J. et JONES L.W.

1978, Curr. Top. Bioenerg. 8: 3-31

Alternate fate of the photochemical reducing power
generated in photosynthesis: hydrogen production and
nitrogen fixation.

BONJOUR F. et ARAGNO M.

1984, Arch. Microbiol. 139: 397-401

Bacillus tusciae, a new species of thermoacidophilic, facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen oxidizing sporeformer from a geothermal area.

BONJOUR F. et ARAGNO M.

1986, FEMS Microbiol. Lett. 35: 11-15

Growth of thermophilic, obligatorily chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacteria related to Hydrogenobacter with thiosulfate and elemental sulfur as electron and energy source.

BONJOUR F. et ARAGNO M.

1987 en préparation.

BOTHE H. et EISBRENNER G.

1981, The hydrogenase-nitrogenase relationship in nitrogen-fixing organisms.

In: Biology of inorganic nitrogen and sulfur.

H. Bothe et A. Trebst, eds., Springer-Verlag, Berlin, p. 141-150.

BOWIEN B. et SCHLEGEL H.G.

1981, Ann. Rev. Microbiol. 35: 405-452

Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria.

CONRAD R. et SEILER W.

1979, FEMS Microbiol. Lett. 6: 143-145

The role of hydrogen bacteria during the decomposition of hydrogen by soil.

CONRAD R., ARAGNO M. et SEILER W.

1983 a, Appl. Environ. Microbiol. 45: 502-510

Production and consumption of hydrogen in a eutrophic lake.

CONRAD R., ARAGNO M. et SEILER W.

1983 b, FEMS Microbiol. Lett. 18: 207-210

The inability of hydrogen bacteria to utilize atmospheric hydrogen is due to threshold and affinity for hydrogen.

CONRAD R., WEBER M. et SEILER W.

1983 c, Soil Biol. Biochem. 15: 167-173

Kinetics and electron transport of soil hydrogenases catalyzing the oxidation of atmospheric hydrogen.

CONRAD R., BONJOUR F. et ARAGNO M.

1985, FEMS Microbiol. Lett. 29: 201-205

Aerobic and anaerobic microbial consumption of hydrogen in geothermal spring water.

DE CICCIO G.T. et STUKUS P.E.

1968, J. Bacteriol. 95: 1469-1475

Autotrophic and heterotrophic metabolism of
Hydrogenomonas.

1. Growth yields and patterns under dual substrate
conditions.

DIJKHUIZEN L. et HARDER W.

1979, Arch. Microbiol. 123: 55-63

Regulation of autotrophic and heterotrophic
metabolism in Pseudomonas oxalaticus OX1: growth on
mixtures of oxalate and formate in continuous
culture.

DIJKHUIZEN L. et HARDER W.

1984, Antonie van Leeuwenhoek 50: 473-487

Current views on the regulation of autotrophic carbon
dioxide fixation via the Calvin cycle in bacteria.

DRDZ E.

1983, travail de licence / Université de Neuchâtel

Essais d'altération du métabolisme autotrophe chez
Aquaspirillum autotrophicum et caractérisation
sommaire des mutants obtenus.

DUGNANI L., WYRSCH I., GANDOLLA M. et ARAGNO M.

1986, FEMS Microb. Ecol. 38: 347-351

Biological oxidation of hydrogen in soils flushed
with a mixture of H₂, CO₂, O₂ and N₂.

EVANS H.J. et BARBER L.E.

1977, Science 197: 332-339

Biological nitrogen fixation for food and fiber production.

FRIEDRICH C.G., BOWIEN B. et FRIEDRICH B.

1979, J. Gen. Microbiol. 115: 185-192

Formate and oxalate metabolism in Alcaligenes eutrophus.

FRIEDRICH C.G., FRIEDRICH B. et BOWIEN B.

1981, J. Gen. Microbiol. 122: 69-78

Formation of enzymes of autotrophic metabolism during heterotrophic growth of Alcaligenes eutrophus.

FRIEDRICH C.G. et MITRENGA G.

1981, FEMS Microbiol. Lett. 10: 209-212

Oxidation of thiosulfate by Paracoccus denitrificans and other hydrogen bacteria.

FRIEDRICH C.G.

1982, J. Bacteriol. 149: 203-210

Derepression of hydrogenase during limitation of electron donors and derepression of ribulosebiphosphate carboxylase during carbon limitation of Alcaligenes eutrophus.

FRIEDRICH B., FRIEDRICH C.G., MEYER M. et SCHLEGEL H.G.

1984, J. Bacteriol. 158: 331-333

Expression of hydrogenase in Alcaligenes spp. is altered by interspecific plasmid exchange.

GANDOLLA M., GRABNER E. et LEONI R.

1982, Schweiz. Veroffoeffentl. Inst. Stadtbauwesen

Techn. Braunschweig 33: 163-182

Ergebnisse von Lysimetern auf der Deponie Croglia.

GANDOLLA M. et GRABNER E.

1983, Wasser, Energie, Luft 75: 241-244

Proposte per future ottimizzazioni di discariche controllate.

GERSTENBERG C., FRIEDRICH B. et SCHLEGEL H.G.

1982, Arch. Microbiol. 133: 90-96

Physical evidence for plasmids in autotrophic, especially hydrogen-oxidizing bacteria.

GLAUSER M., GANDOLLA M. et ARAGNO M.

1986, Anaerobic digestion of urban wastes: sewage sludge and organic fraction of garbage.

In: Bioenvironmental systems, vol. III.

D. Wise, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, in press.

GOGOTOV J.N. et SCHLEGEL H.G.

1974, Arch. Microbiol. 97: 359-362

N₂-fixation by chemoautotrophic hydrogen bacteria.

GOTD E., KODAMA T. et MINODA Y.

1978, Agric. Biol. Chem. 42: 1305-1308

Growth and taxonomy of thermophilic hydrogen bacteria.

GOTTSCHAL J.C. et KUENEN J.G.

1980 a, Arch. Microbiol. 126: 33-42

Mixotrophic growth of Thiobacillus A2 on acetate and thiosulfate as growth limiting substrates in the chemostat.

GOTTSCHAL J.C. et KUENEN J.G.

1980 b, FEMS Microbiol. Lett. 7: 241-247

Selective enrichment of facultatively chemolithotrophic thiobacilli and related organisms in continuous culture.

HALLENBECK P.C. et BENEMANN J.R.

1979, Topics photosynthesis 3: 331-364

Hydrogen from algae.

HANUS F.J.R., MAIER J. et EVANS H.J.

1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1788-1792

Autotrophic growth of H₂-uptake positive strains of Rhizobium japonicum in an atmosphere supplied with hydrogen gas.

HARDER W. et DIJKHUIZEN L.

1976, Mixed substrates utilization in microorganisms.

In: Continuous culture, vol. VI: Applications and new fields.

A.R.C. Dean, D.C. Ellwood, C.G.T. Evans, J. Melling, eds., Ellis Horwood Ltd., Chichester, p. 297-314.

HOGREFE C., ROEMERMANN D. et FRIEDRICH B.

1984, J. Bacteriol. 158: 43-48

Alcaligenes eutrophus hydrogenase genes (Hox).

JANNASCH H.W.

1974, Limnology and oceanography 19: 716-720

Steady-state and the chemostat in ecology.

JENNI B.

1986, Congrès SGM

A fraction collector specially designed for taking samples in fermentors.

JENNI B., ISCH C. et ARAGND M.

1987, FEMS Microbiol. Lett., soumis pour
publication.

Presence of nitrogen-fixation genes in new strains of
Pseudomonas pseudoflava.

KAERST U. et FRIEDRICH C.G.

1984, J. Gen. Microbiol. 130: 1987-1994

Mixotrophic capabilities of Alcaligenes
eutrophus.

KARAGOUNI A.D. et SLATER J.H.

1979, J. Gen. Microbiol. 115: 369-376

Enzymes of the Calvin cycle and intermediary
metabolism in the cyanobacterium Anacystis nidulans
grown in the chemostat culture.

KASERER H.

1906, Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II 16: 681-696

Die Oxydation des Wasserstoffes durch
Mikroorganismen.

KAWASUMI T., IGARASHI Y., KODAMA T. et MINODA Y.

1980, Agric. Biol. Chem. 44: 1985-1986

Isolation of strictly thermophilic and obligately
autotrophic hydrogen bacteria.

KAWASUMI T., IGARASHI Y., KODAMA T. et MINODA Y.

1984, Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 5-10

Hydrogenobacter thermophilus gen. nov. sp. nov., an extremely thermophilic, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium.

KELLY D.P.

1971, Ann. Rev. Microbiol. 25: 177-210

Autotrophy: concepts of lithoautotrophic bacteria and their organic metabolism.

KIESSLING M. et MEYER D.

1982, FEMS Microbiol. Lett. 13: 333-338

Profitable oxidation of carbon monoxide or hydrogen during heterotrophic growth of Pseudomonas carboxydoflava.

KRISTJANSSON J.K., INGASON A. et ALFREDSSON G.A.

1985, Arch. Microbiol. 140: 321-325

Isolation of thermophilic obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacteria, similar to Hydrogenobacter thermophilus, from Icelandic hot springs.

KRYUKOV V.R., SAVELEVA N.D. et PUSHEVA M.A.

1983, Mikrobiologija 52: 781-788

Calderobacterium hydrogenophilum nov. gen., nov. sp., an extreme thermophilic hydrogen bacterium, and its hydrogenase activity.

KUENEN J.G., ROBERTSON L.A. et VAN GEMERDEN H.

1985, *Advances in Microbial Ecology* 8: 1-59

Microbial interactions among aerobic and anaerobic
sulfur-oxidizing bacteria.

KUZNETSOV S.I.

1959, *Die Rolle der Mikroorganismen im Stoffkreislauf
der Seen.*

VEB Deutscher Verlag für Wissenschaften, Berlin

LA FAVRE J.S. et FOCHT D.D.

1983, *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 304-311

Conservation in soil of H_2 liberated from N_2 fixation
by *Hup*- nodules.

LARKIN J.M. et STROHL W.R.

1983, *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 341-367

Beeggiatoa, Thiothrix and Thioploca

LEADBEATER L. et BOWIEN B.

1984, *J. Bacteriol.* 157: 95-99

Control of autotrophic carbon assimilation in
Alcaligenes eutrophus by inactivation and
reactivation of phosphoribulokinase.

LEEFELDT R.H. et MATIN A.

1980, *J. Bacteriol.* 142: 645-650

Growth and physiology of Thiobacillus novellus under
nutrient-limited mixotrophic conditions.

LEPO J.E., HANUS F.J. et EVANS H.J.

1980, J. Bacteriol. 141: 664-670

Chemoautotrophic growth of H_2 -uptake positive strains
of Rhizobium japonicum.

LILLEY M.D., DE ANGELIS M.A. et GORDON L.I.

1982, Nature 300: 48-50

CH_4 , H_2 , CO and N_2O in submarine hydrothermal vents
waters.

MAIER R.J., HANUS F.J. et EVANS H.J.

1979, J. Bacteriol. 137: 824-829

Regulation of hydrogenase in Rhizobium japonicum.

MALIK K.A., JUNG C., CLAUS D. et SCHLEGEL H.G.

1981, Arch. Microbiol. 129: 254-256

Nitrogen fixation by the hydrogen-oxidizing bacterium
Alcaligenes eutrophus.

MANIAN S.S. et O'GARA F.

1982, Arch. Microbiol. 131: 51-54

Induction and regulation of ribulose bisphosphate
carboxylase activity in Rhizobium japonicum during
formate-dependent growth.

MATELES R.I., CHIAN S.K. et SILVER R.

1967,

In: Microbial physiology and continuous culture.

E.O. Powell, C.G.T. Evans, R.E. Strange et D.W.

Tempest, eds., Her Majesty's Stationary Office,

London, p.232 et suiv.

MATIN A.

1978, Ann. Rev. Microbiol. 32: 433-466

Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria.

MATIN A.

1981, Regulation of enzyme synthesis as studied in
continuous culture.

In: Continuous cultures of cells, vol. II.

P.H. Calcott, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida,

p. 69-97.

McGEE J.M., BROWN L.R. et TISCHER R.G.

1967, Nature 214: 715-716

A high temperature hydrogen oxidizing bacterium -

Hydrogenomonas thermophilus n. sp.

PAGNI M.

1986, travail de licence / Université de Neuchâtel

Du comportement mixotrophe d'Aquaspirillum

autotrophicum.

PEREZ R.C. et MATIN A.

1980, J. Bacteriol. 142: 633-638

Growth of Thiobacillus novellus on mixed substrates
(mixotrophic growth).

PEREZ R.C. et MATIN A.

1982, J. Bacteriol. 150: 46-51

Carbon dioxide assimilation by Thiobacillus novellus
under nutrient-limited mixotrophic conditions.

REPASKE R.

1966, Biotechnol. Bioeng. 8: 217-235

Characteristics of hydrogen bacteria.

RITTENBERG S.C.

1969, Adv. Microbial Physiol. 3: 159-196

The role of exogenous organic matter in the
physiology of chemolithotrophic bacteria.

RITTENBERG S.C. et GODDMANN N.S.

1969, J. Bacteriol. 98: 617-622

Mixotrophic growth of Hydrogenomonas eutropha.

RITTENBERG S.C.

1972, Antonie van Leeuwenhoek 38: 457-478

The obligate autotroph - the demise of a concept.

SARLES L.S. et TABITA F.R.

1983, J. Bacteriol. 153: 458-464

Derepression of the synthesis of
D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase
from Rhodospirillum rubrum.

SAVELEVA N.D., KRYUKOV V.R. et PUSHEVA M.A.

1982, Mikrobiologija 51: 765-769

Obligate thermophilic hydrogen bacteria.

SCHINK B.

1977, Thèse de doctorat / Université de Göttingen,
RFA

Die solubilisierte membran gebundene Hydrogenase
von Alcaligenes eutrophus Stamm M16.

SCHINK B., LUPTON F.S. et ZEIKUS J.G.

1983, Appl. Environ. Microbiol. 45: 1491-1500

Radioassay for hydrogenase activity in viable cells
and documentation of aerobic hydrogen-consuming
bacteria living in extreme environments.

SCHINK B. et ZEIKUS J.G.

1984, Can. J. Microbiol. 30: 260-265

Ecology of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria in two
freshwater lake ecosystems.

SCHLEGEL H.G., KALTWASSER H. et GOTTSCHALK G.

1961, Arch. Microbiol. 38: 209-222

Ein submersverfahren zur Kultur

wasserstoffoxydierender Bacterien:

Wachstumsphysiologische Untersuchungen.

SCHLEGEL H.G.

1966, Adv. Comp. Physiol. Biochem. 2: 185-236

Physiology and biochemistry of Knallgasbacteria.

SCHLEGEL H.G. et EBERHARDT U.

1972, Adv. Microbiol. Physiol. 7: 205-242

Regulatory phenomena in the metabolism of

Knallgasbacteria.

SCHLEGEL H.G.

1974, Tellus 26: 11-20

Production, modification and consumption of

atmospheric trace gases by microorganisms.

SCHLEGEL H.G.

1976, Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.

42: 181-201

The physiology of hydrogen bacteria.

SCHMIDT K., LIAAEN-JENSEN S. et SCHLEGEL H.G.

1963, Arch. Mikrobiol. 46: 117-126

Die Carotenoide der Thiiorhodaceae.

SCHNEIDER K. et SCHLEGEL H.G.

1977, Arch. Microbiol. 112: 229-238

Localization and stability of hydrogenases from aerobic hydrogen bacteria.

SCHUBERT K.R. et EVANS H.J.

1976, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1207-1211

Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts.

SCHWEIZER C. et ARAGNO M.

1975, Bull. Soc. Neuchâtel. Sci. Nat. 98: 79-87

Etude des hydrogénobactéries dans un petit lac (Le Loclat ou Lac de Saint-Blaise).

SHIBA H., KAWASUMI T., IGARASHI Y., KODAMA T. et

MINODA Y.

1985, Arch. Microbiol. 141: 198-203

The CO₂ assimilation via the reductive tricarboxylic acid cycle in an obligately autotrophic, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium Hydrogenobacter thermophilus.

SIMPSON F.B., MAIER R.J. et EVANS H.J.

1979, Arch. Microbiol. 123: 1-8

Hydrogen-stimulated CO₂ fixation and coordinate induction of hydrogenase and ribulosebiphosphate carboxylase in a H₂-uptake positive strain of Rhizobium japonicum.

SMITH A.L., KELLY D.P. et WOOD A.P.

1980, J. Gen. Microbiol. 121: 127-138

Metabolism of Thiobacillus A2 grown under autotrophic, mixotrophic and heterotrophic conditions in chemostat culture.

STUKUS P.E. et DE CICCIO B.T.

1970, J. Bacteriol. 101: 339-345

Autotrophic and heterotrophic metabolism of Hydrogenomonas: regulation of autotrophic growth by organic substrates.

URATSU S.L., KEYSER H.H., WEBER D.F. et LIM S.T.

1982, Crop. Sci. 22: 600-602

Hydrogen uptake (HUP) activity of Rhizobium japonicum from major U.S. soybean production areas.

VISHNIAC W.V.

1974, Organisms metabolizing sulfur and sulfur compounds. The genus Thiobacillus.

In: Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th edition.

R.E. Buchanan and Gibbons, eds., Williams and Williams, Baltimore, p. 456-461.

WALTHER-MAURUSCHAT A., ARAGNO M., MAYER M. et
SCHLEGEL H.G.

1977, Arch. Microbiol. 114: 101-110

Micromorphology of Gram-negative hydrogen bacteria.

II. Cell envelope, membranes, and cytoplasmic inclusions.

WDDDS D.D. et LASCELLES J.

1954,

In: Autotrophic microorganisms.

B.A. Fry et J.L. Peel, eds., 4 th Symp. Soc. gen. Microbiol., Univ. Press, Cambridge, p.f.

ZAVARZIN G.A. et NOZHEVNIKOVA A.N.

1977, Microbiol. Ecol. 3: 305-326

Aerobic carboxydobacteria.

ZAVARZIN G.A.

1978, Hydrogen bacteria and carboxydobacteria.

Nauka Publ. USSR Acad. Sci., Moscow.

FIGURES

Figure 1

Culture batch d'Aquaspirillum autotrophicum (inoculum hétérotrophe).

Conditions mixotrophes: 6 mM pyruvate

85% H₂, 5% O₂, 10% CO₂

U: $\mu\text{moles } ^{14}\text{CO}_2 / \text{min}$

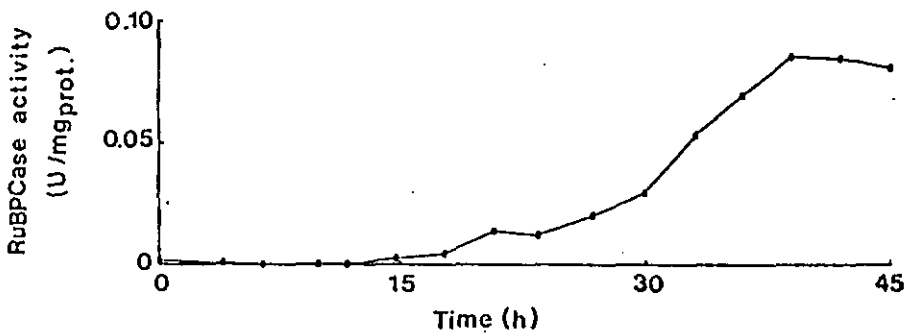
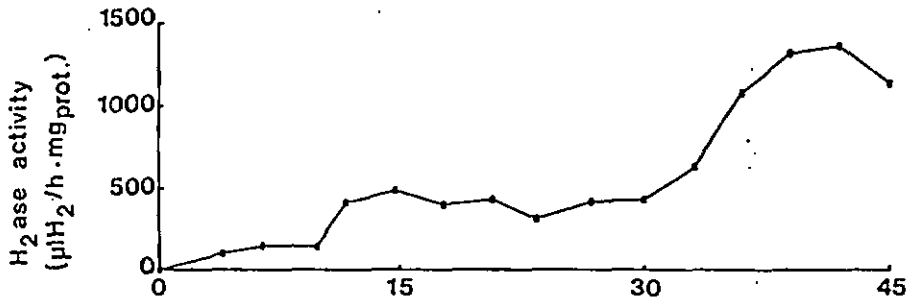
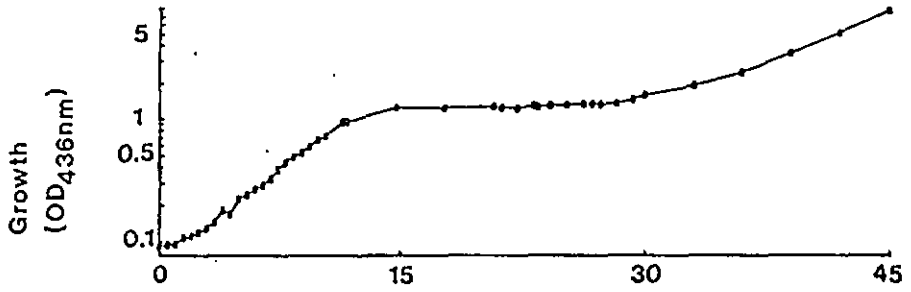


Figure 2

Culture continue d'Aquaspirillum autotrophicum (inoculum hétérotrophe), limitée par le pyruvate (concentration dans la culture $< 3 \mu\text{M}$ dès l'équilibre hétérotrophe).

Transition de conditions hétérotrophes:

6 mM pyruvate

85% N_2 , 5% O_2 , 10% CO_2

à des conditions mixotrophes:

6 mM pyruvate

85% H_2 , 5% O_2 , 10% CO_2

U: $\mu\text{moles } ^{14}\text{CO}_2 / \text{min}$

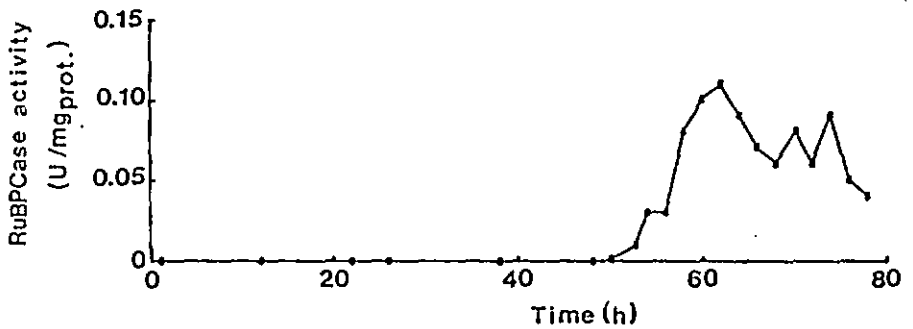
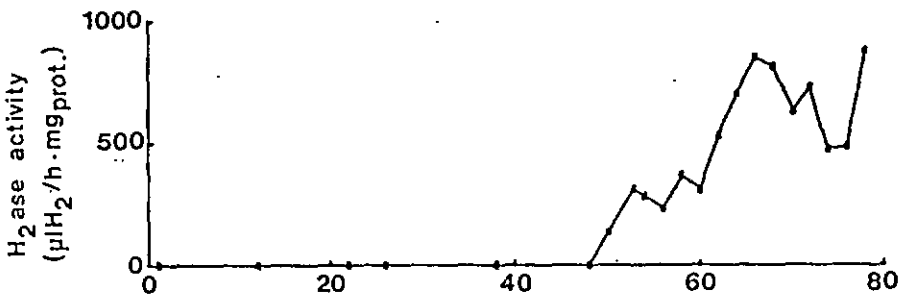
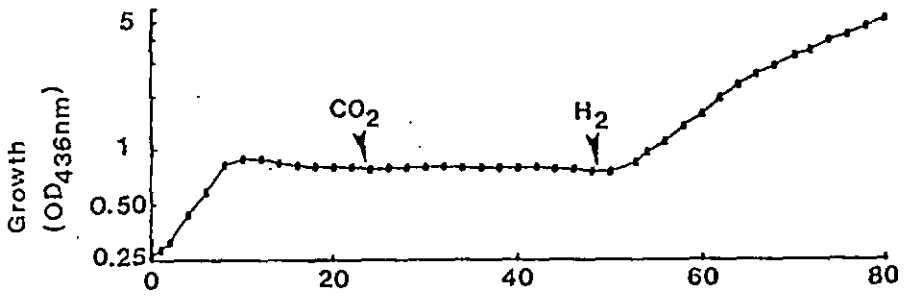


Figure 3

Culture continue d'Aquaspirillum autotrophicum (inoculum hétérotrophe) limitée par le pyruvate (concentration dans la culture $< 3 \mu\text{M}$ dès l'équilibre hétérotrophe).

Transition de conditions hétérotrophes sans CO_2 :

6 mM pyruvate

95% N_2 , 5% O_2

à des conditions hétérotrophes avec CO_2 :

6 mM pyruvate

85% N_2 , 5% O_2 , 10% CO_2

puis à des conditions mixotrophes:

6 mM pyruvate

85% H_2 , 5% O_2 , 10% CO_2

U_1 $\mu\text{moles } ^{14}\text{CO}_2 / \text{min}$

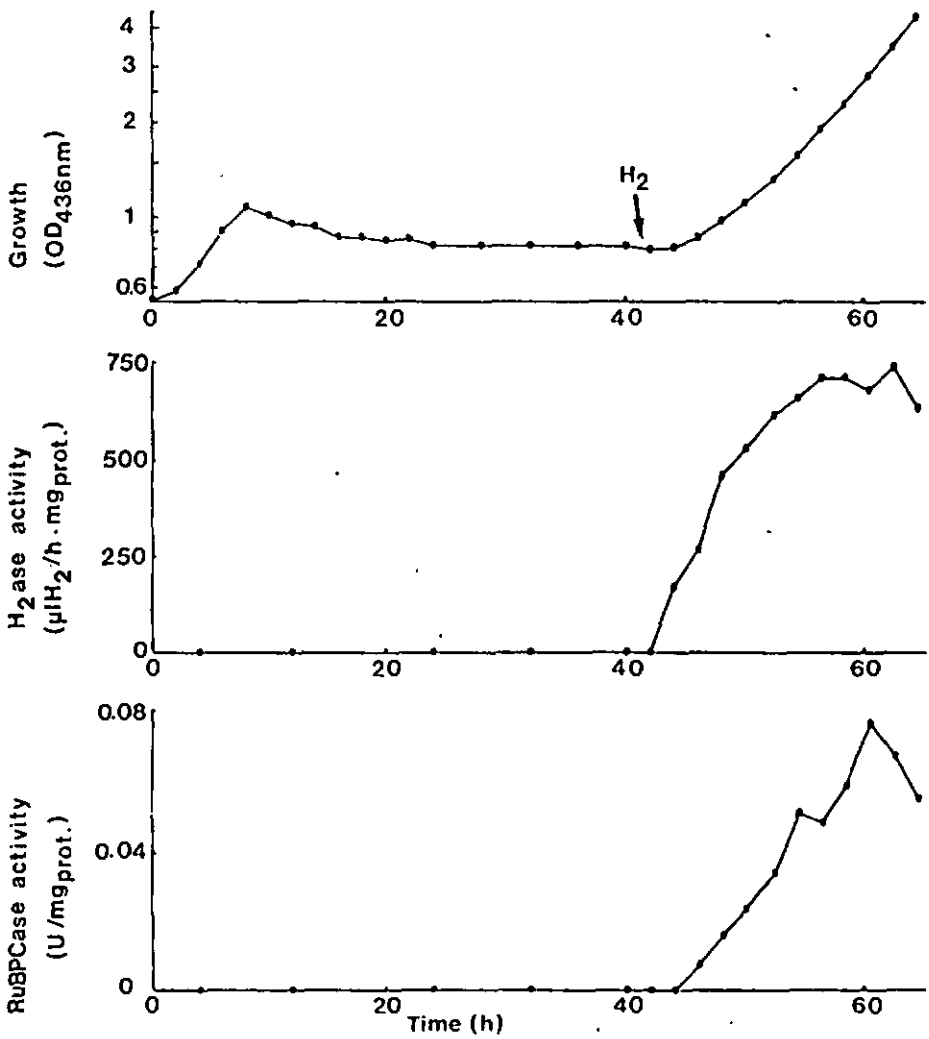


Figure 4 a

Culture continue d'Aquaspirillum autotrophicum (inoculum hétérotrophe), limitée par le pyruvate (concentration dans la cuve $< 3 \mu\text{M}$ dès l'équilibre hétérotrophe).

Transition de conditions hétérotrophes:

6 mM pyruvate

95% N_2 , 5% O_2

à des conditions lithohétérotrophes:

6 mM pyruvate

95% H_2 , 5% O_2

puis à des conditions mixotrophes:

6 mM pyruvate

85% H_2 , 5% O_2 , 10% CO_2

U: $\mu\text{moles } ^{14}\text{CO}_2 / \text{min}$

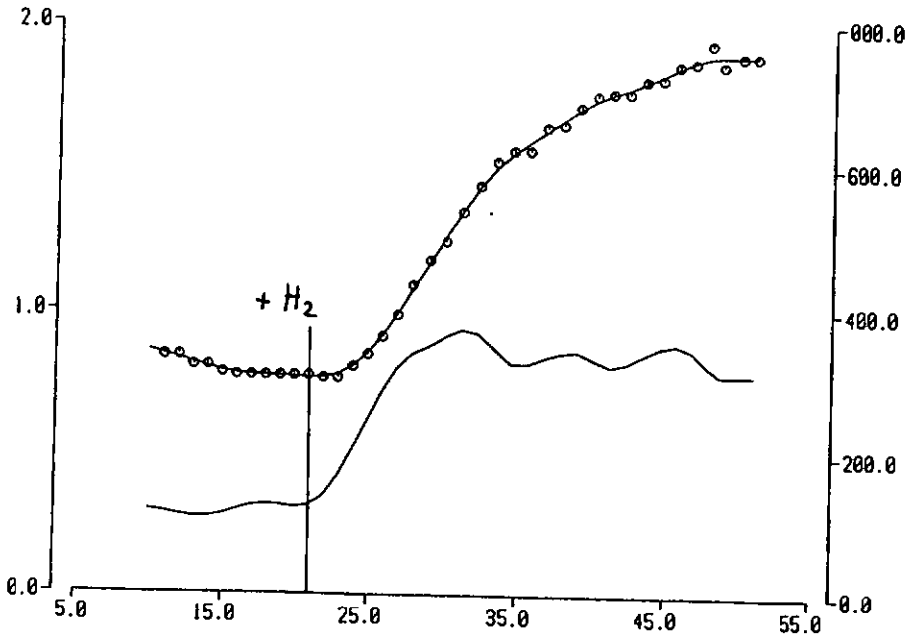


Figure 4 b

Expérience présentée à la fig. 4 a :
courbe de croissance linéaire et évolution du rendement de
la croissance par rapport au pyruvate.

o———o DO
——— rendement

Abscisse: temps (h)

Ordonnée de gauche: DO

Ordonnée de droite: rendement de la croissance
(DO / mole pyr.)

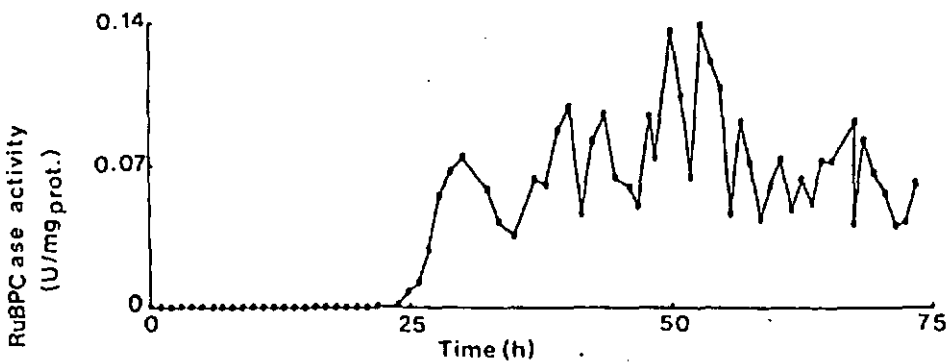
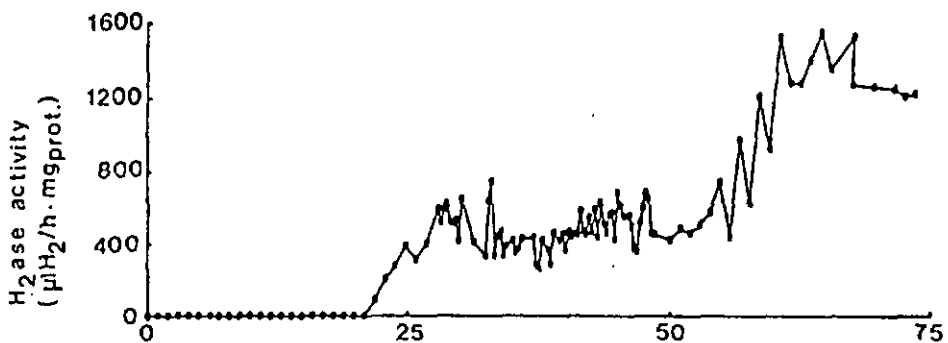
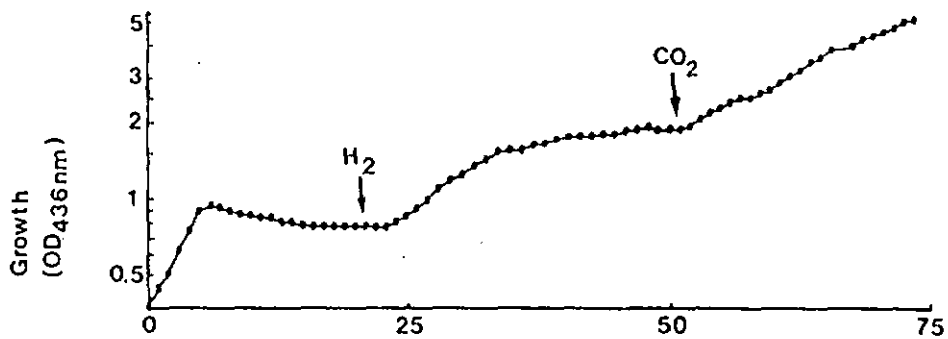


Figure 5

Culture continue d'Aquaspirillum autotrophicum (inoculum hétérotrophe), limitée par le pyruvate (concentration dans la cuve $< 3 \mu\text{M}$ dès le début du petit plateau).

Transition de conditions lithohétérotrophes:

6 mM pyruvate

95% H_2 , 5% O_2

à des conditions mixotrophes:

6 mM pyruvate

85% H_2 , 5% O_2 , 10% CO_2

U: $\mu\text{mole } ^{14}\text{CO}_2 / \text{min}$

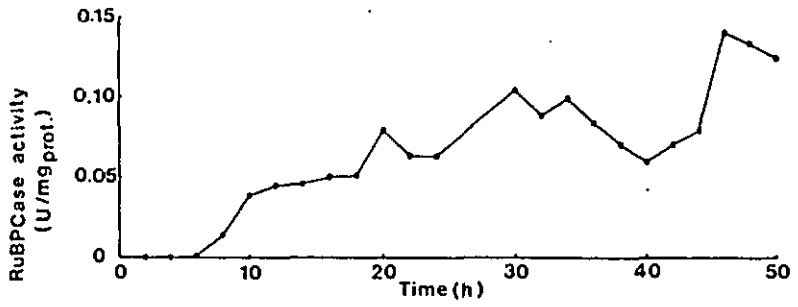
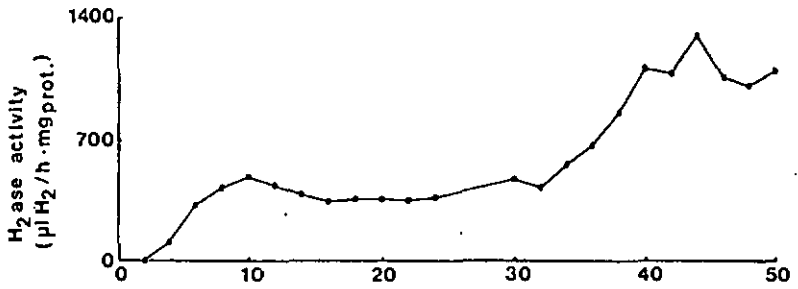
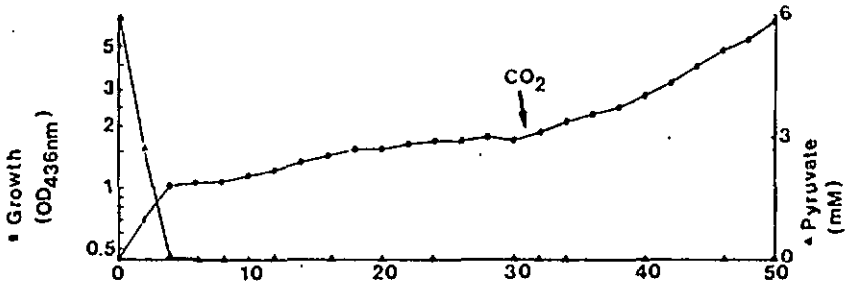


Figure 6

Incorporation de $^{14}\text{CO}_2$ par des cellules d'Aquaspirillum
autotrophicum fraîchement récoltées, cultivées en
conditions lithohétérotrophes.

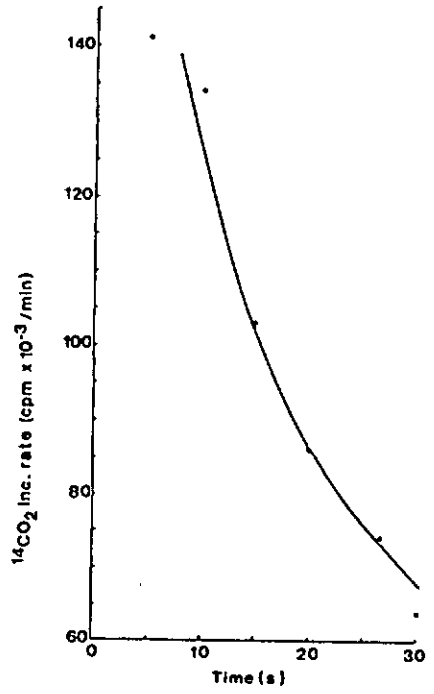
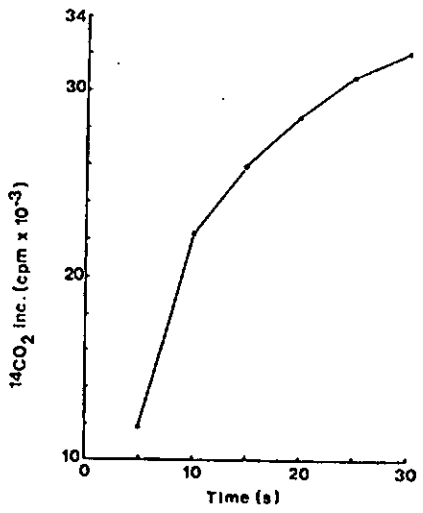


Figure 7

Induction de l' H_2 ase d'Agrospicillum autotrophicum

A: en absence de CO_2 (phase gazeuse: 95% H_2 , 5% O_2)

B: en présence de CO_2 (phase gazeuse:

85% H_2 , 5% O_2 , 10% CO_2)

Les cellules ont été cultivées en conditions

hétérotrophes avec le pyruvate, lavées et resuspendues

dans du milieu minéral de base.

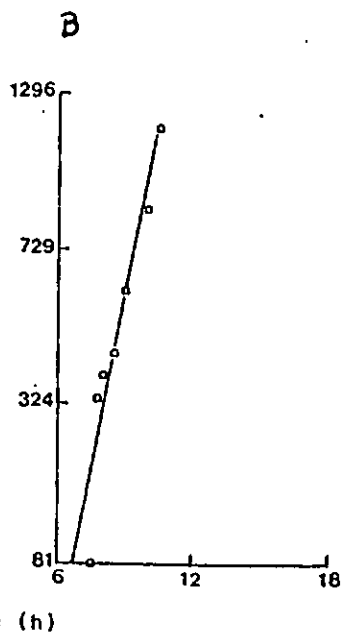
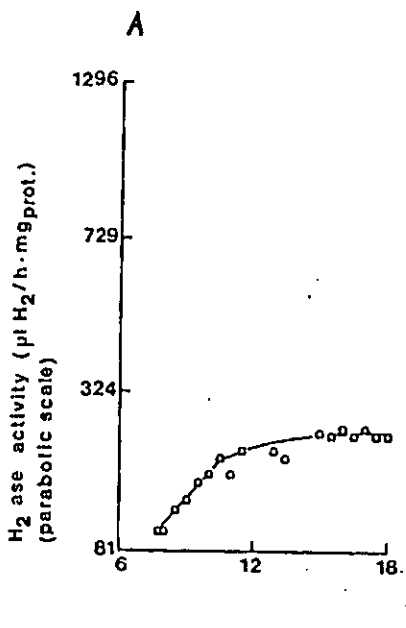


Figure 8 a

Culture continue d'Aquaspirillum autotrophicum (inoculum hétérotrophe), limitées par l'acétate (indécelable dès l'équilibre hétérotrophe).

Transitions de conditions hétérotrophes:

12 mM acétate

95% N₂, 5% O₂

à des conditions lithohétérotrophes:

12 mM acétate

95% H₂, 5% O₂

puis à des conditions mixotrophes:

12 mM acétate

85% H₂, 5% O₂, 10% CO₂

U: $\mu\text{moles } ^{14}\text{CO}_2 / \text{min}$

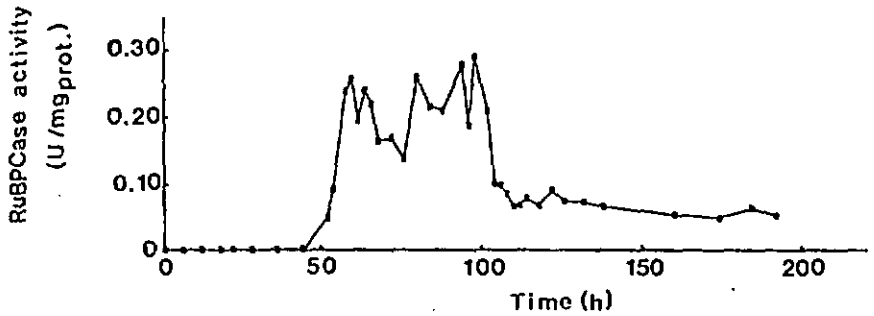
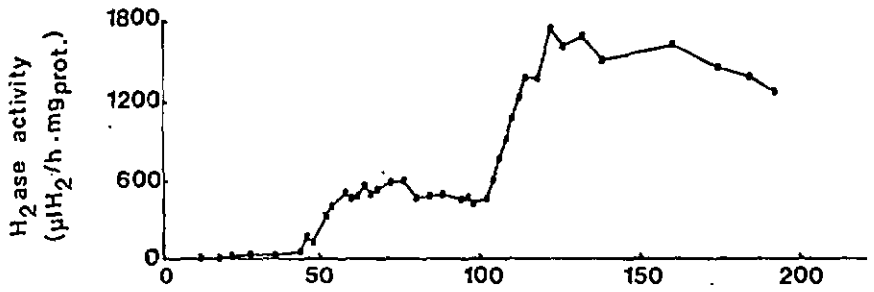
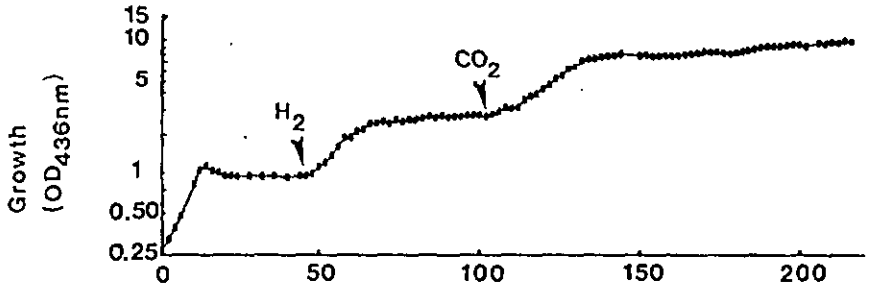


Figure B b

Expérience présentée à la fig. B a:

courbe de croissance lissée et évolution du rendement de la croissance par rapport à l'acétate.

o-----o DD
----- rendement

Abscisse: temps (h)

Ordonnée de gauche: DD

Ordonnée de droite: rendement de la croissance
(DD / mole ac.)

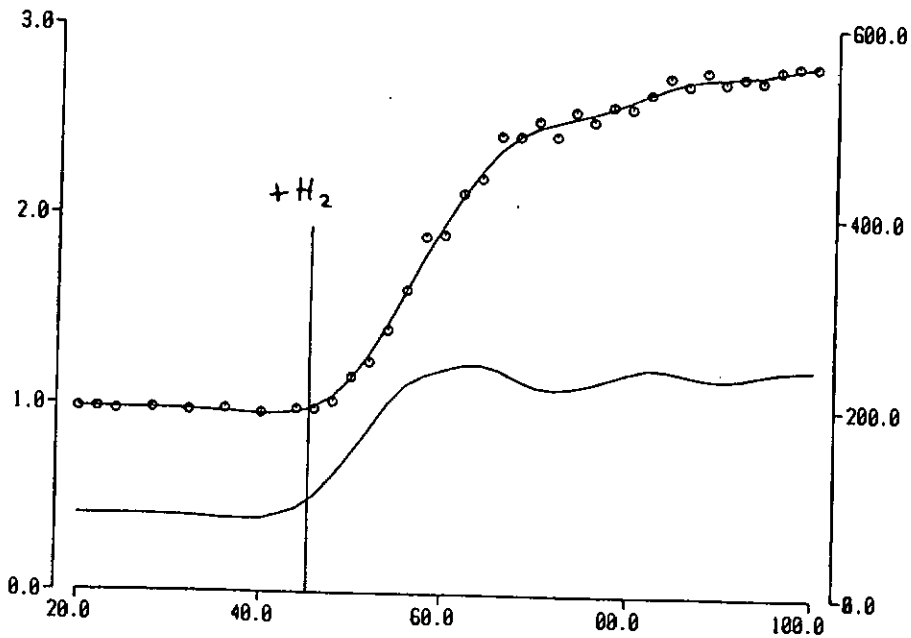


Figure 9

Activités de l'H₂ase et de la RuBPCase dans des cellules d'Aquaspirillum_eutotrophicum prélevées aux différents équilibres d'une culture continue mixotrophe limitée par l'azote, en fonction de la concentration de pyruvate fournie à cette culture.

• H₂ase

‡ RuBPCase

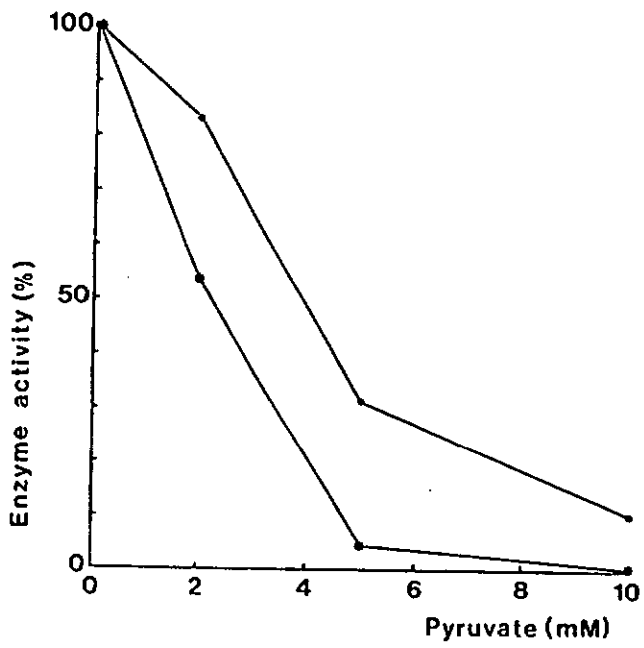


Figure 10

Culture mixte d'Aquaspirillum autotrophicum type sauvage, et d'un mutant de cette bactérie, incapable d'oxyder l' H_2 . Culture continue limitée par le pyruvate (concentration dans la cuve $< 3 \mu M$ dès l'équilibre hétérotrophe).

Transition de conditions hétérotrophes:

6 mM pyruvate

95% N_2 , 5% O_2

à des conditions lithohétérotrophes:

6 mM pyruvate

95% H_2 , 5% O_2

puis à des conditions mixotrophes:

6 mM pyruvate

85% H_2 , 5% O_2 , 10% CO_2

Le % d'autotrophes est donné par le rapport du nombre de cellules autotrophes (colonies de taille normale sur milieu autotrophe) au nombre total de cellules (colonies de taille normale + colonies minuscules sur milieu autotrophe).

Le nombre de cellules est donné par le nombre de colonies se développant sur milieu au pyruvate.

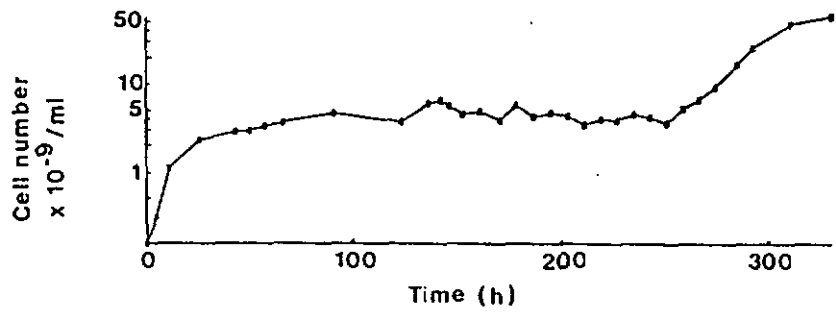
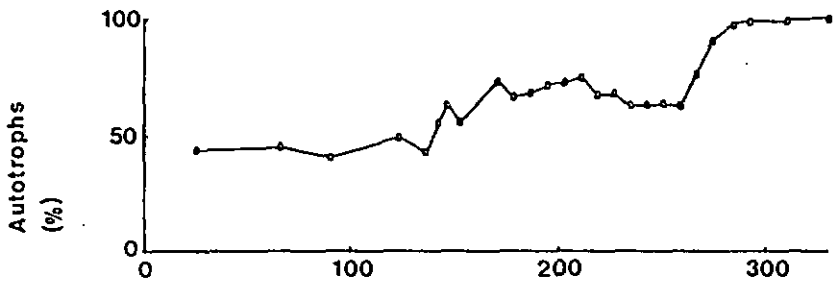
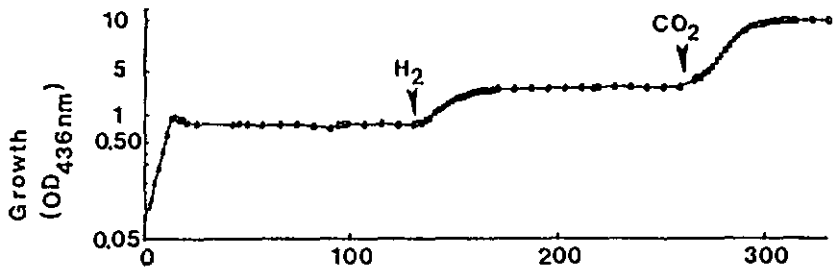


Figure 11

Culture batch d'Aquaspirillum autotrophicum (inoculum lithoautotrophe), en conditions lithoautotrophes (85% H₂, 5% O₂, 10% CO₂).

Pyr: adjonction de pyruvate (concentration finale: 10 mM).

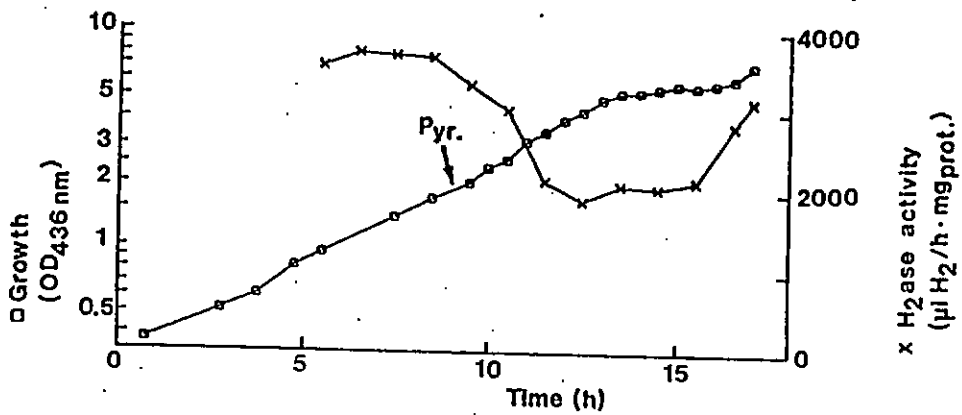


Figure 12

Appareillage de culture et collection d'échantillons.

(Schéma selon Aragno et Schlegel, 1981, modifié).

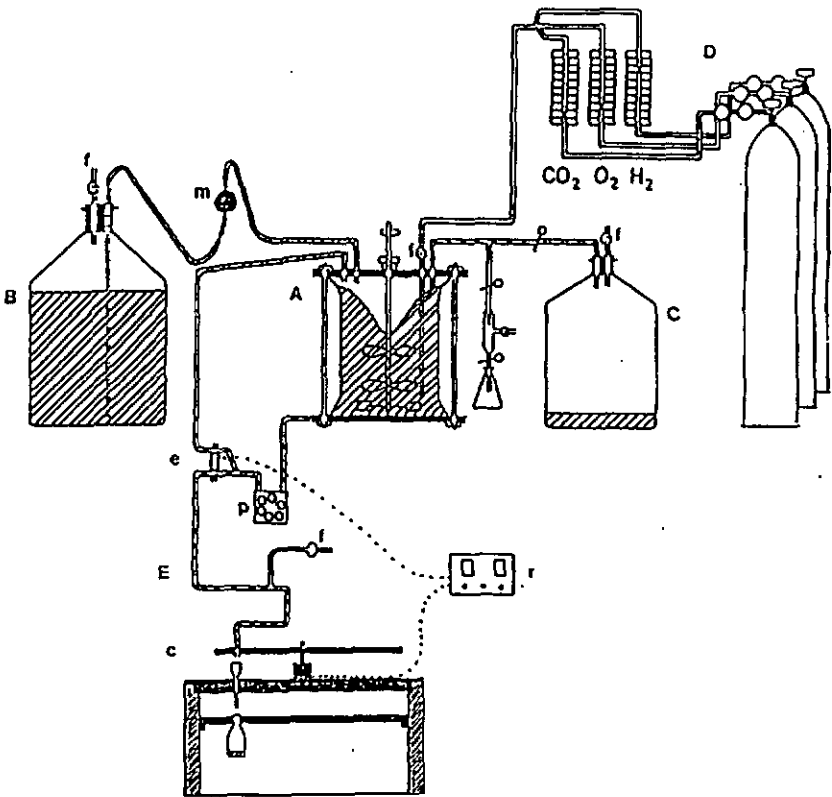


Figure 13

**Dispositif de filtration servant à stériliser
d'importantes quantités de milieu.**

A: récipient avec entrée d'air comprimé

B: filtre amiante

C: récipient à milieu

