



HAL
open science

importance écologique des bactéries photohétérotrophes dans l’océan arctique

Dominique Boeuf

► **To cite this version:**

Dominique Boeuf. importance écologique des bactéries photohétérotrophes dans l’océan arctique. Biodiversité et Ecologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2013. Français. NNT: . tel-00830741

HAL Id: tel-00830741

<https://theses.hal.science/tel-00830741>

Submitted on 5 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE
Spécialité Microbiologie Marine
Ecole doctorale des sciences de l'environnement d'Ile de France (ED129)

Présentée par
M. Dominique BOEUF

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (Paris VI)

**IMPORTANCE ÉCOLOGIQUE des BACTÉRIES
PHOTOHÉTÉROTROPHES dans l'OCÉAN ARCTIQUE**

soutenue le 2 Mai 2013, devant le jury composé de :

- M. Christian JEANTHON** Directeur de thèse
Station Biologique de Roscoff, CNRS/UPMC
- M. Philippe LEBARON** Co-Directeur de thèse
Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, CNRS/UPMC
- Mme. Anne GODFROY** Rapporteur
Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, Ifremer/CNRS/UBO
- M. Thierry BOUVIER** Rapporteur
Laboratoire Ecologie des Systèmes Marins Côtiers, CNRS/IRD/Ifremer/UM2
- M. Carlos PEDRÓS-ALIÓ** Examineur
Institut de Ciències del Mar CMIMA-CSIC, Barcelone
- M. Marcelino SUZUKI** Examineur
Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, CNRS/UPMC

Équipe Procaryotes Phototrophes Marins – Groupe Phytoplancton
UMR 7144 – Adaptation et Diversité en Milieu Marin
Station Biologique
Place Georges Teissier
29680 ROSCOFF

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de ce jury, Mme Anne Godfroy, M Thierry Bouvier, M Carlos Pedrós-Alió et M Marcelino Suzuki, je suis honoré que vous ayez accepté d'évaluer ce travail. Merci à M Pierre Galand et M Marcelino Suzuki pour avoir suivi ce travail et pour leurs remarques constructives lors de mes comités de thèses. Je tiens également à remercier M Philippe Lebaron, co-directeur de cette thèse et directeur de l'observatoire océanologique de Banyuls-sur-Mer, et M François Lallier, directeur de l'unité adaptation et diversité en milieu marin, qui m'ont accueilli au sein de leurs équipes. Merci également à Frédéric Partensky, pour les bons jeux de mots laids, et Laurence Garczarek (Banana ?) qui m'ont accueilli au sein de l'équipe Procaryotes PHOTOTROPHES Marins. Un merci également à Daniel Vaultot, pour cette belle équipe phytoplancton ainsi que pour les discussions photo sous-marine qui m'ont permis de m'évader un peu, on se retrouvera un jour en mer Rouge...

Un grand merci à toi Christian, mon papa de science, pour tout ce que tu m'as appris, ta patience, m'avoir permis de m'impliquer dans de nombreux projets et de participer à de nombreux congrès, avoir tenté de sonder les méandres de mon esprit qui fonctionne à l'envers, ton jeu de sourcils et bien-sûr pour les Louboutins. Je suis heureux que l'aventure continue avec toi. Merci aussi à Valérie qui la première m'a fait confiance et a toujours suivi mon parcours. Je suis sincèrement navré que l'administration ait empêché que tu fasses partie de mon jury.

Merci à M Matthew Cottrell, M David Kirchman pour leur généreux accueil, leurs formations instructives et leur aide dans l'écriture de mes papiers. Thanks Dave for your kindness, the unforgettable NYC trip, the Christmas party and your expert driving that saved my life. Many thank Matt for your help and your friendly discussions. Un grand merci aussi aux doctorants du Delaware, Vanessa, Nich, Musti et Sharon pour l'accueil si chaleureux et les soirées dépaysantes. Vanessa & Nich, I'll never forget the Pumpkin's pie, THE Tequila, the « smell-like-feet »-wine tasting, the road trips and the Stairway to Heaven... It was an incredible month. Mrina, un merci tout spécial pour toi, ta bonne humeur, ton aide et les discussions en français. Thanks to black-buzzards that haven't devoured me.

Merci à tous les membres de phytoplancton qui m'ont rendu la vie bretonne plus douce. Une mention spéciale pour Pris, Momo, Roseline et Fabienne qui ont supportées (entre autre) ma mémoire défaillante, sans oublier DomiM, le MacGyver de l'équipe qui répare un cyto avec un couteau suisse et du scotch (le chewing-gum, ce n'est pas stérile pour le tri cellulaire). Je reste convaincu que les sondes et les sécurités doivent avoir une utilité dans ces appareils... Estelle pour ce merveilleux séjour phylogénistique à Banyuls qui envoyait du rêve ! Laure pour m'avoir

supporté dans ton bureau pendant 3 ans et je sais que ce n'est pas facile. Merci à Céline, Brigitte, Béatrice et Nathalie pour leur soutien administratif et à tout le personnel de la SBR pour leur travail afin de faire tourner la boutique. Une pensée aux marins ainsi qu'aux membres du service séquençage, du service technique et du service info qui m'ont sans doute vu plus que de raison.

Merci à tous les doctorants et étudiants que j'ai pu croiser et avec qui j'ai bien rit. Une pensée particulière pour Anne-Laure, Marine la cagole, Sergio, Pandi-Panda (je t'ai bien pourri pour une décennie au moins avec ce surnom), Noan-apple-addict et Aliou (un des rares avec Sergio à avoir compris mon choc thermique breton). Compagnon-galérien, FH, un dicton dit qu'un breton est comme une huître, rude à l'extérieur mais recélant des trésors à l'intérieur... (à moins que ce soit un breton est souvent plein comme une huître...) tu m'as fait découvrir, en même temps qu'un autre illustre breton -bien qu'il soit plus Marseillais quoiqu'il n'en dise- que ce dicton était vrai. Merci pour ton soutien, courage, force et robustesse, gloire et honneur pour ta fin de thèse. Je maintien toutefois que le Sidi Brahim, ben c'est dégueu. Merci également à Justine, ma collègueuh, partageant les mêmes difficultés à tremper ses palmes dans une eau à cette température. Telle un petit Synechococcus, quelle sera sa réponse au stress thermique ? Merci aux copains banyuliques, Marinobacter, Mamaw, Alicia, Sabrina et Raphaël avec qui j'ai bien rigolé, que ce soit en congrès, en galère ou devant une pizza, courage à toutes !

Merci à ceux qui ne m'ont pas aidé, me permettant de renforcer mon sens à me débrouiller seul. Merci également aux reviewers de mes articles pour leurs remarques très constructives sans lesquelles ma chevelure ne serait pas aussi éparse.

Pour finir, bien que des mots sur du papier n'exprimeront jamais la profondeur de mes sentiments pour vous, je souhaite remercier pour leur soutien indéfectible, même si la distance qui nous sépare est difficile, tous les membres de ma famille et belle-famille. En particulier, ceux qui ont toujours été là pour moi, mes deux menhirs-qui-aiment, le petit caillou des Alpes et le lutin qui danse autour, le phasme hyperactif et la bonbonophage, ceux qui viennent d'arriver, le petit guerrier phocéén et la petite lumière, et ceux qui sont parti. Au vrai avec un « x » et à Milie, qui, bien plus que des amis, font partie de ma famille et ont été là pour moi, même si des fois cela consistait à grater de la rouille avec une brosse à dent ou à prendre le jus pour éviter que l'on ne sombre.

A ma femme qui partage ma vie et me supporte (c'est un exploit) depuis tant de belles années. Bien que je n'aurai jamais fini d'apprendre, mes études sont (enfin) terminées et je te suis très reconnaissant de ton soutien et de ton amour sans limite. Tu m'as fait le plus beau des cadeaux et je suis très heureux de partager ma vie avec vous deux. Simplement MERCI. Vous êtes ma force.



« La connaissance est une navigation dans un océan d'incertitudes à travers des archipels de certitudes. »

Edgar Morin, 1999

Nuage de mots-clés, synthèse graphique de ce manuscrit.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	i
Liste des Abréviations	v
Liste des Figures.....	vi
Liste des Tableaux.....	x
INTRODUCTION.....	1
1.CHAPITRE 1. Les bactéries, l'essentiel est invisible.....	3
1.1.Des <i>animalcules infusoires</i> aux cultures d'enrichissement.....	3
1.1.1.L'observation des Animalcules infusoires	3
1.1.2.Les premiers cultivateurs	4
1.1.3.Diversité culturelle, le sommet de l'iceberg.....	5
1.2.Des classifications descriptives à la phylogénie moléculaire.....	7
1.2.1.De Microcosmus aux Moneres.....	7
1.2.2.La révolution nucléique.....	9
1.2.3.La phylogénie moléculaire	10
1.3.L'écologie microbienne marine	12
1.3.1.L'écologie microbienne moléculaire et ses outils	12
1.3.2.Microbes marins, d'une importance insoupçonnée.....	16
1.3.3.Bactéries marines, diversité et distribution	17
1.3.4.Structure des communautés bactériennes marines	29
1.4.« Dis-moi ce que tu manges... »	33
1.4.1.Écotypes, niches écologiques et diversité fonctionnelle	33
1.4.2.Métabolismes, flux d'énergie et de matière	35
1.4.3.Cycle du carbone et réseau trophique microbien	38
2.CHAPITRE 2. La photohétérotrophie, un art de (sur)vivre.....	45

2.1.La remise en question d'une vue dichotomique.....	45
2.1.1.Découverte de la mixotrophie bactérienne.....	45
2.1.2.Un gradient de métabolismes phototrophes.....	47
2.1.3.Structures impliquées dans la phototrophie bactérienne.....	52
2.2.Importance écologique des bactéries photohétérotrophes.....	60
2.2.1.Outils d'étude.....	60
2.2.2.Diversité des photohétérotrophes.....	64
2.2.3.Importance numérique et distribution.....	70
2.3.Hypothèse sur le rôle et la fonction.....	75
2.3.1.Plasticité écologique.....	75
2.3.2.Croissance, nutrition et génération d'énergie.....	75
2.3.3.Processus de survie et succès écologique.....	78
3.CHAPITRE 3. L'Océan Arctique, extrême en changements.....	81
3.1.L'environnement arctique.....	81
3.1.1.Généralités.....	81
3.1.2.L'océan arctique et sa courantologie.....	85
3.1.3.Cryosphère et apports terrigènes.....	88
3.2.Variations et changement climatiques.....	92
3.2.1.L'Arctique, sentinelle du réchauffement global.....	92
3.2.2.Oscillations climatiques en Arctique.....	94
3.2.3.Impacts des variabilités et du réchauffement climatiques en Arctique.....	95
3.3.Les bactéries pélagiques de l'océan arctique.....	99
3.3.1.Productivité dans l'océan arctique.....	99
3.3.2.Diversité du bactérioplancton arctique.....	102
3.3.3.La vie bactérienne dans le froid.....	106
OBJECTIFS.....	109
4.CHAPITRE 4. Objectif de la thèse et le projet MALINA.....	107

4.1.MALINA, une problématique liée au réchauffement global	107
4.2.Description du système fleuve Mackenzie / mer de Beaufort.....	108
4.2.1.Présentation, caractéristiques physiques et saisonnalité	108
4.2.2.Activité et diversité microbiennes dans le plateau du Mackenzie.....	112
4.2.3.Echantillonnage	114
4.3.Intégration du travail de thèse	117
4.3.1.Problématique.....	117
4.3.2.Objectifs	118
4.3.3.Approches techniques	121
RÉSULTATS	124
5.CHAPITRE 5. Les BPAA dans l’océan arctique ouest.	125
5.1.Préambule.....	125
5.1.1.Etat des connaissances en Arctique.....	125
5.1.2.Ambitions	126
5.1.3.Point technique	127
5.2. Article 1: <i>Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean</i>	130
5.3.Epilogue	172
5.3.1.Résultats complémentaires	172
5.3.2.Evolutions possibles dans un contexte de réchauffement global	176
6.CHAPITRE 6. Les B-PR dans l’océan arctique ouest.	177
6.1.Préambule.....	177
6.1.1.Etat des connaissances en Arctique.....	177
6.1.2.Ambitions	178
6.1.3.Point technique	178
6.2.Article 2: <i>Alphaproteobacteria</i> dominates the summer proteorhodopsin-containing community in the western Arctic Ocean	181

6.3.Epilogue	222
6.3.1.Résultats complémentaires	222
6.3.2.Evolutions possibles dans un contexte de réchauffement global	234
DISCUSSION GÉNÉRALE	236
CONCLUSION et PERSPECTIVES	254
READER DIGEST.....	258
Article 3: Diversity of Arctic Pelagic Prokaryotes with an Emphasis on Photoheterotrophic Bacteria: A Review.	258
VALORISATION	292
BIBLIOGRAPHIE	314
ANNEXES.....	344

Liste des Abréviations

ADN : Acide désoxyribo – nucléique	BPA_nA (ou BPAA) : bactéries phototrophes anoxygéniques aérobies (AAPB)
ADN_c : ADN complémentaire	BChl <i>a</i> : Bactériochlorophylle <i>a</i>
ARN : Acide ribo – nucléique	PR : Protéorhodopsine
ARN_r : ARN ribosomal	B-PR : bactérie à protéorhodopsine (PRB)
ARN_m : ARN messenger	MeSH : methanethiol
PCR : <i>Polymerase chain reaction</i>	RuBisCO : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
FISH : <i>Fluorescent in situ hybridization</i>	TCA : cycle des acides tricarboxiliques
qPCR : <i>quantitative polymerase chain reaction</i>	BR : bactériorhodopsine
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole	HR : halorhodopsine
ICoMM : <i>International Census of Marine Microbes</i>	SR I ou II : <i>sensory rhodopsin</i> I ou II
GOS : <i>Global Ocean Sampling</i>	PS I ou II : Photosystème I ou II
NGS : <i>Next Generation Sequencing</i>	PSU : <i>Photosystem unit</i>
ITS : <i>Internal Transcribed Spacer</i>	LH I ou II : <i>light harvesting complex</i> I ou II
bp : paire de base	NAD(P) : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
Mbp : million de paires de base	e^- : électron
DMSP : dimethylsulfoniopropionate	H^+ : proton
DMS : sulfure de diméthyle	IREM : <i>Infrared epifluorescence microscopy</i>
SAG : <i>single-cell amplified genome</i>	Sv : Sverdrup (million de m ³)
MOD : matière organique dissoute (DOM)	GES : Gaz à effet de Serre
MOP : matière organique particulaire (POM)	NAO : Oscillation nord Atlantique
ATP : adénosine triphosphate	AO : Oscillation Arctique
ADP : adénosine diphosphate	AMO : Oscillation multi-décennale Atlantique
Pi : phosphate inorganique	PDO : Oscillation décennale Pacifique
CO₂ : dioxyde de carbone	TPD : Dérive transpolaire
O₂ : dioxygène, oxygène	PML : Polar mixed layer
CO₃²⁻ : ion carbonate	IPCC : Intergovernmental panel on climate change (ou GIEC : Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat)
HCO₃⁻ : ion bicarbonate	CTD : <i>Conductivity-temperature-depth</i>
NO₃⁻ : ion nitrate	ROS : <i>Reactive oxygen species</i>
NO₂⁻ : ion nitrite	
NH₄⁺ : ion ammonium	
PO₄³⁻ : ion phosphate	
Gt : Gigatonnes (10 ¹⁵ kg)	
COD : carbone organique dissous (DOC)	
CID : carbone inorganique dissous (DIC)	
MODR : MO dissoute réfractaire (RDOM)	
BPA_nAn : bactéries phototrophes anoxygéniques anaérobies (AnAnPB)	

Liste des Figures

Figure 1. Planches de description des <i>Animalcules</i> par Leeuwenhoek.	3
Figure 2. Arbre phylogénétique d'Ernst Haeckel (1866).....	8
Figure 3. Arbre universel du vivant proposé par Woese <i>et al.</i> (1990)	11
Figure 4. Tendances générales d'utilisation des approches de séquençage.	16
Figure 5. Illustration schématique des relations phylogénétiques entre les grands groupes incultivés parmi les souches cultivées en 2000 (Giovannoni et Rappé 2000).....	19
Figure 6. Composition et richesse spécifique du bactérioplancton marin de surface	20
Figure 7. Illustration schématique des relations phylogénétiques entre les groupes majeurs de bactéries marines, d'après Giovannoni et Stingl (2005).....	21
Figure 8. Diagrammes des 20 phylotypes bactériens les plus abondants obtenus par pyroséquençage dans divers habitats marins	23
Figure 9. Schéma conceptuel de la biodiversité des taxons bactériens	30
Figure 10. Vue globale du métabolisme.....	36
Figure 11. Sources et flux unidirectionnel d'énergie (en jaune) et cyclique de matière (en orange), parmi les métabolismes existants.	37
Figure 12. Cycle simplifié du carbone dans l'environnement.	39
Figure 13. Evolution de la vue du réseau trophique océanique et de la place des <i>Bacteria</i>	40
Figure 14. Concept de la boucle microbienne replacée dans le contexte du réseau trophique microplanctonique.	42
Figure 15. Cycle du carbone dans l'océan mondial présentant les principales pompes et les principaux flux de carbone.	44
Figure 16. Vue des relations complexes entre énergie lumineuse, production d'énergie biologique et matière organique dissoute (DOM) en milieu marin.	48
Figure 17. Exemples des structures et des fonctions des rhodopsines microbiennes connues au milieu des années 2000s..	51
Figure 18. Schémas conceptuels des structures impliquées dans la phototrophie aérobie chez les bactéries pélagiques.....	54
Figure 19. Schéma structurel simplifié du centre réactionnel, du cycle des électrons et de la translocation de protons chez les BPAA.	56
Figure 20. Schéma structurel simplifié de la protéorhodopsine et du transport de protons photo-induits..	58

Figure 21. Principaux pigments bactériens et longueurs d'ondes captées dans les océans.	59
Figure 22. Exemple de comptage de BPAA en microscopie à épifluorescence.	62
Figure 23. Arbre phylogénétique basé sur l'ADNr 16S des souches BPAA connues en 2006..	66
Figure 24. Arbre phylogénétique basé sur le gène <i>pufM</i>	67
Figure 25. Comparaison entre les phylogénies basées sur le gène 16S (à gauche) et les protéines de l'opsine (à droite)..	70
Figure 26. Pénétrations moyennes des longueurs d'ondes en fonction du type de zones océaniques.....	74
Figure 27. Comparaison de la croissance bactérienne de 4 B-PR cultivées en condition de cycles lumineux par rapport à l'obscurité permanente.....	77
Figure 28. Fonctions bactériennes pouvant potentiellement bénéficier de l'apport énergétique, sous forme d'ATP ou de potentiel électrochimique de protons, fourni par les systèmes phototrophes (photosystème des BPAA ou protéorhodopsine des B-PR).....	79
Figure 29. « <i>Septentrionalium Terrarum descriptio</i> ». Description des Terres Septentrionales par Gérard Mercator en 1595.....	82
Figure 30. Délimitations (haut) et topographie (bas) de la région arctique.	84
Figure 31. Principaux courants en Arctique.....	85
Figure 32. Profil en profondeur des masses d'eau arctiques et de leur temps moyen de résidence le long d'un transect du détroit de Béring au détroit de Fram.	87
Figure 33. Répartition du pergélisol en Arctique.....	89
Figure 34. Processus de précipitation accélérée des particules et accumulation en maximum de turbidité (ETM) à la frontière entre eaux douces et intrusions marines.....	91
Figure 35. Estimations actuelles des flux entrants de sédiments et carbone organique en Arctique (en gris) et de carbone produit en milieu marin (en blanc, voir § 3.3.1)..	92
Figure 36. Variations observées de la température moyenne à la surface du globe (a), du niveau moyen de la mer à l'échelle du globe (b), et de la couverture neigeuse dans l'hémisphère Nord en mars–avril (c) (IPCC 2007) ; ainsi que de l'étendue de la calotte glaciaire de fin d'été en 1980 et pendant les événements exceptionnels des minimums glaciaires de 2007 et 2012 (NOAA).	94
Figure 37. Directions générales de dérive de la glace de mer.....	96
Figure 38. Décharge en eaux douces (moyennée sur 3 ans) du Yenisei, Ob' et Mackenzie en fonction de l'indice moyen de l'Oscillation Arctique	98

Figure 39. Production primaire totale dans l'océan arctique (a) et vues d'efflorescence du phytoplancton par les satellites SeaWiFs et MODIS. Efflorescences d'été en mer des Tchouktsches (b) ; de Béring (c), de Barents (d) et d'hiver dans une polynie e).....	101
Figure 40. Distribution et diversité des groupes majeurs de bactéries marines arctiques de surface évaluées par pyroséquençage de la région V6 de l'ARNr 16S..	104
Figure 41. Vues du fleuve Mackenzie. Selon Mercator (a, voir Figure 29) ; bassin de drainage (b) ; photographie de la zone humide du delta (c) ; vues satellites centrées sur l'embouchure (d), les grands lacs de l'Ours (e) et des esclaves (f) ainsi que la zone humide du delta (g).....	109
Figure 42. Carte de localisation de la Mer de Beaufort et principaux courants (haut) ainsi que la cinétique de fonte des glaces sur le plateau du Mackenzie (bas).....	111
Figure 43. Carte de l'échantillonnage de la campagne MALINA en mer de Beaufort.....	115
Figure 44. Indice de NAO et AO moyens de début 1995 à fin 2009 (haut), conditions de vents et de glace (milieu) et panache du Mackenzie pendant la campagne MALINA en mer de Beaufort (leg2).....	116
Figure 45. Représentation schématique simplifiée des composants de l'écosystème du plateau du Mackenzie et les compartiments ciblés par le projet MALINA dans son ensemble (haut) et par notre étude (bas).....	120
Figure 46. Arbre phylogénétique des séquences <i>pufM</i> d'été 2007 et hiver 2008 obtenues par Cottrell et Kirchman (2009).....	125
Figure 47. Système optique de détection des souches produisant de la BChl <i>a</i>	129
Figure 48. Arbre phylogénétique des séquences codant pour l'opsine de la PR d'été 2007 et hiver 2008 retrouvées par Cottrell et Kirchman (2009).....	177
Figure 49. Détermination du pourcentage d'homologie définissant l'OTU pour la protéine PR.	179
Figure 50. Abondances relatives des PRB dans l'hémisphère Nord.....	223
Figure 51. Vue graphique des contributions des SAR11 et des SAR11 à PR dans la communauté bactérienne, de la PR dans la communauté SAR11 et des SAR11 à PR dans la communauté B-PR en fonction des masses d'eau.....	224
Figure 52. Carte des corrélations de Pearson entre les SAR11 et les autres groupes quantifiés par qPCR (gauche) et les paramètres environnementaux les plus significatifs (droite).	225

Figure 53. Montage expérimental de culture et suivi de la température moyenne durant l'expérience.....	228
Figure 54. Courbes de croissance des isolats B-PR en conditions éclairées (cercle clair) et à l'obscurité permanente (cercle foncé).....	230
Figure 55. Diagramme de Venn des OTUs constituées de séquences d'ADN, d'ARN ou des deux avec ou sans les OTUs constituées d'une seule séquence (singletons).....	234
Figure 56. Abondances relatives dans le bactérioplancton de la communauté BPAA (a) et B-PR (b) en fonction des masses d'eau dans la mer de Beaufort.....	237
Figure 57. Abondances relatives moyennes des groupes B-PR majoritaires dans le bactérioplancton quantifiées par qPCR en fonction des masses d'eau.....	239
Figure 58. Abondance de la communauté bactérienne totale libre et attachée aux particules (> 3 µm) obtenue par pyroséquençage de la région V6 du 16S (400 bp).....	240
Figure 59. Interpolation des abondances des communautés Nanophytoplancton, Picophytoplancton et BPAA en surface lors de MALINA.....	241
Figure 60. Estimation du nombre de bactéries possédant la PR (haut) et de SAR11 B-PR (bas).	245
Figure 61. Effet de la température sur le ratio production bactérienne sur production primaire (haut) et sur le taux de croissance bactérienne (bas)	246
Figure 62. Distribution du bactérioplancton et des B-PR ainsi que la proportion des B-PR dans le bactérioplancton en fonction de l'isotherme 3°C.....	247
Figure 63. Place des bactéries photohétérotrophes dans la balance absorption/émission de CO ₂	253

Liste des Tableaux

Tableau I. Nombre de noms valides publiés dans « <i>Approved Lists of Bacterial Names</i> » (en date du 4 octobre 2012, visible à l'adresse : http://www.bacterio.cict.fr/number.html)	6
Tableau II. Flux moyens en eaux douces, particules et carbone organique déchargés dans l'océan arctique par les grands fleuves. Les dégradés de couleurs symbolisent le rang de chaque fleuve en fonction de ce paramètre. D'après Gordeev <i>et al.</i> (1996), Holmes <i>et al.</i> (2002) et Stein (2008).	90
Tableau III. Affiliation phylogénétique et numéros d'accèsion des OTU retrouvées dans les librairies <i>pufM</i> et caractéristiques générales de leurs plus proches parents dans GenBank obtenus par BLASTn.....	174
Tableau IV. Contributions moyennes des SAR11 et des SAR11 à PR dans la communauté bactérienne, de la PR dans la communauté SAR11 et des SAR11 à PR dans la communauté B-PR en fonction des masses d'eau le long d'un fort gradient en carbone organique. Entre parenthèses, la valeur minimale et maximale.	224
Tableau V. Affiliation phylogénétique et numéros d'accèsion des OTUs retrouvées dans les banques de clones PR et caractéristiques générales de leurs proches parents obtenus par BLASTp. Les variants verts et bleus de la PR sont représentés par les couleurs correspondantes ; L = Leucine, M = Methionine, Q = Glutamine and P = Proline.	231

INTRODUCTION

1.CHAPITRE 1. Les Bactéries, l'essentiel est invisible.	3
1.1. Des <i>Animalcules infusoires</i> aux cultures d'enrichissement	3
1.1.1. L'observation des <i>Animalcules infusoires</i>	3
1.1.2. Les premiers cultivateurs	4
1.1.3. Diversité culturelle, le sommet de l'iceberg.....	5
1.2. Des classifications descriptives à la phylogénie moléculaire	7
1.2.1. De <i>Microcosmus</i> aux <i>Moneres</i>	7
1.2.2. La révolution nucléique.....	9
1.2.3. La phylogénie moléculaire	10
1.3. L'écologie microbienne marine	12
1.3.1. L'écologie microbienne moléculaire et ses outils	12
1.3.2. Microbes marins, d'une importance insoupçonnée.....	16
1.3.3. Bactéries marines, diversité et distribution	17
1.3.4. Structure des communautés bactériennes marines	29
1.4. « Dis-moi ce que tu manges... ».....	33
1.4.1. Écotypes, niches écologiques et diversité fonctionnelle	33
1.4.2. Métabolismes, flux d'énergie et de matière	35
1.4.3. Cycle du carbone et réseau trophique microbien	38
2.CHAPITRE 2. La photohétérotrophie, un art de (sur)vivre.	45
2.1. La remise en question d'une vue dichotomique	45
2.1.1. Découverte de la mixotrophie bactérienne.....	45
2.1.2. Un gradient de métabolismes phototrophes	47
2.1.3. Structures impliquées dans la phototrophie bactérienne	52
2.2. Importance écologique des bactéries photohétérotrophes	60

2.2.1. Outils d'étude	60
2.2.2. Diversité des photohétérotrophes	64
2.2.3. Importance numérique et distribution	70
2.3. Hypothèse sur le rôle et la fonction	75
2.3.1. Plasticité écologique.....	75
2.3.2. Croissance, nutrition et génération d'énergie.....	75
2.3.3. Processus de survie et succès écologique.....	78
3.CHAPITRE 3. L'Océan Arctique, extrême en changements.....	81
3.1. L'environnement arctique	81
3.1.1. Généralités.....	81
3.1.2. L'océan arctique et sa courantologie.....	85
3.1.3. Cryosphère et apports terrigènes	88
3.2. Variations et changement climatiques, la place de l'homme.....	92
3.2.1. L'Arctique, sentinelle du réchauffement global.....	92
3.2.2. Oscillations climatiques en Arctique	94
3.2.3. Impacts des variabilités et du réchauffement climatiques en Arctique..	95
3.3. Les bactéries pélagiques de l'océan arctique	99
3.3.1. Productivité dans l'océan arctique	99
3.3.2. Diversité du bactérioplancton arctique.....	102
3.3.3. La vie bactérienne dans le froid	106

CHAPITRE 1. Les bactéries, l'essentiel est invisible.

1.1. Des *animalcules infusoires* aux cultures d'enrichissement

1.1.1. L'observation des *Animalcules infusoires*

Bien que pressenti depuis l'antiquité par Aristote (-384 – -322), qui avait formulé l'idée d'une contagion invisible de certaines maladies, la réalité d'un monde microbien invisible à l'œil nu ne fut établie qu'à la fin du XVII^{ème} siècle avec les observations d'Antonie van Leeuwenhoek (1632–1723). Ce drapier utilisant et construisant des microscopes simples mais puissants pour vérifier la pureté des étoffes, a pu observer de petits êtres qu'il appelle alors « *Animalcules infusoires* » (en opposition aux *Animalcules spermatices* c.à.d. les spermatozoïdes). Dans les planches de descriptions très précises de ces *Animalcules*, de nombreuses bactéries et autres microbes sont alors, pour la première fois, décrits (Figure 1).

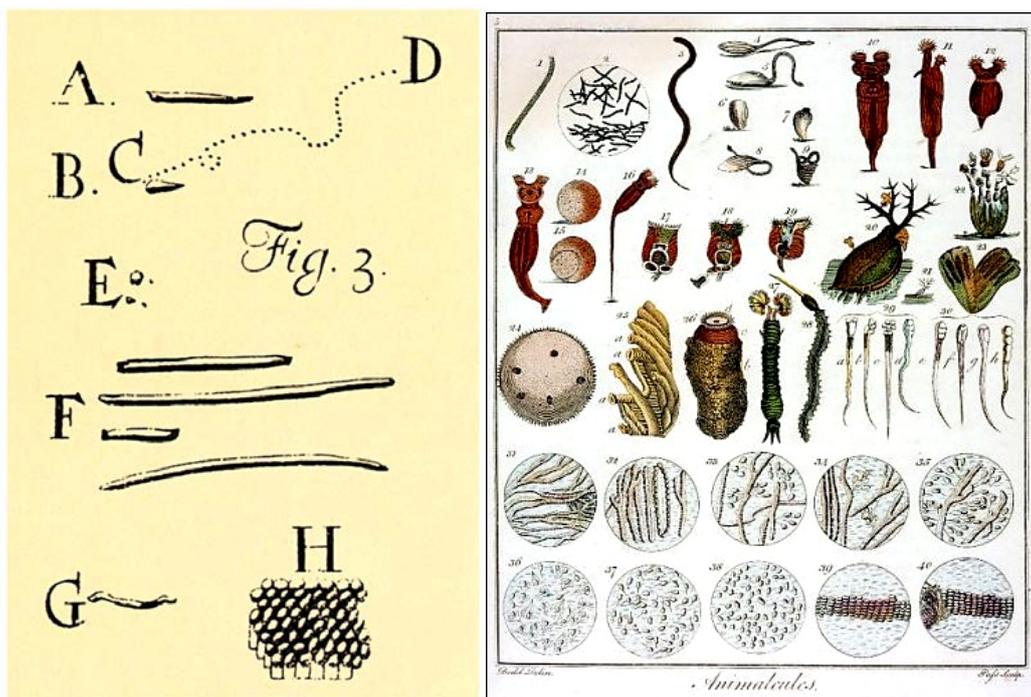


Figure 1. Planches de description des *Animalcules* par Leeuwenhoek. A droite, une planche publiée en 1684 présentant les premières observations des bactéries en bâtonnets (A, C, F, G), coccoïdes libres (E) ou en paquet (H). A gauche un exemple du monde microbien (eucaryote comme procaryote) observé par Leeuwenhoek, planche de reproduction publiée en 1795.

1.1.2. *Les premiers cultivateurs*

Le premier précurseur à cultiver des microbes¹ dans des milieux nutritifs fut Lazaro Spallanzani (1729–1799). Utilisant du jus de viande bouilli dans une bouteille fermée (introduisant les concepts de milieu nutritif et de stérilisation), cet abbé fut le premier à porter atteinte à la théorie de la génération spontanée (hétérogénie) qui fut définitivement réfutée par Louis Pasteur (1822–1895) un siècle plus tard. Outre la mise au point de la pasteurisation et de la stérilisation, ce dernier révolutionna la bactériologie en démontrant l'implication des microbes (comme cause et non conséquence) dans divers processus comme la fermentation et les infections responsables de nombreuses maladies. Les micro-organismes invisibles avaient désormais un rôle, une action visible. Bien que Pasteur ait également mis au point quelques milieux nutritifs, le docteur Robert Koch (1843–1910) développa avec son équipe les principales méthodes de culture microbienne encore utilisées de nos jours comme l'isolement de bactérie en culture pure, la culture de bactéries sur des milieux nutritifs solidifiés grâce à de l'agar² et l'utilisation de colorants spécifiques pour l'identification des micro-organismes. La plus célèbre des méthodes de coloration est également née à cette époque avec Hans Gram (1853–1938) permettant de mettre en évidence deux groupes majeurs de bactéries en fonction de la composition de leur(s) membrane(s) (Gram positif ou négatif).

Les premières études environnementales des microbes du sol et de l'eau de Sergei Winogradsky (1856–1953) et Martinus Beijerinck (1851–1931) ont également permis une grande avancée dans les méthodes de culture. Tous deux, de façon indépendante, dans la volonté de reproduire le plus fidèlement possible, dans les milieux de culture, les conditions de l'environnement naturel des bactéries, arrivent plus facilement à isoler directement de l'environnement et en culture pure, des bactéries peu ou pas cultivées. En faisant varier les conditions de croissance, ils obtiennent des cultures enrichies en certaines bactéries spécifiques et déterminent que chaque type bactérien nécessite des nutriments et des conditions de culture différentes. Grâce à ces cultures d'enrichissement, ils mirent en

¹ **Microbes** : (littéralement « petite vie ») ou microorganismes, organismes vivants invisibles à l'œil nu comprenant diverses formes de vies dont les procaryotes (bactéries et archaeae), les eucaryotes unicellulaires (« champignons » et protistes) et éventuellement les virus selon la définition du vivant utilisée.

² **Agar** : gélifiant (polymère de galactose) issu d'une « algue rouge » (*Gracilaria*, rhodophycée)

évidence la diversité de nutrition (métabolisme³) des bactéries et purent ainsi isoler des bactéries capables d'utiliser certains composés clés qu'elles seules pouvaient métaboliser.

1.1.3. *Diversité culturelle, le sommet de l'iceberg*

Le développement des techniques de cultures et d'enrichissement a permis d'accéder à un certain nombre de bactéries et d'acquérir, au fil des décennies, des informations clés dans leur fonctionnement, leur rôle et leur relation avec leur environnement. Toutefois, isoler des bactéries sur un milieu nutritif revient à sélectionner uniquement les bactéries adaptées à ce milieu et ne reflète pas la réalité des populations bactériennes naturelles. Cela est particulièrement frappant quand on compare pour un même échantillon naturel le nombre de colonies ayant poussé sur un milieu de culture et le nombre de bactéries obtenu par comptage direct par microscopie. Ce phénomène, constaté pour la première fois en 1932 par Razumov, est connu aujourd'hui comme « la grande anomalie de comptage sur boîte » (Staley et Konopka 1985) et a été observé dans un grand nombre d'environnements. Comme résumé par Amann *et al.* (1995), on estime grossièrement qu'en mer, seulement 0,001% à 0,1% des bactéries est cultivable, environ 0,25% dans les eaux douces et dans les sédiments, 0,1% à 3% dans les estuaires et 0,3% dans le sol.

Il était donc nécessaire de développer d'autres techniques pour appréhender la diversité bactérienne. En revanche la culture reste, de nos jours, toujours primordiale pour de nombreux aspects de l'étude des bactéries, notamment les études physiologiques ou la validation des hypothèses émergentes des nouvelles techniques d'analyse (Giovannoni et Stingl 2007). C'est pourquoi la mise au point de nouvelles techniques et l'amélioration de l'adéquation entre les milieux de culture et d'isolement sont encore d'actualité pour tenter de « cultiver l'incultivé ». Parmi elles, celles qui ont permis les plus grandes avancées sont probablement les méthodes de cultures en extinction (Button *et al.* 1993) exploitables à haut débit (Connon et Giovannoni 2002) et permettant, au même titre que des milieux de culture gélosés pauvres en nutriments (Eilers *et al.* 2001, Cho et Giovannoni 2004), la culture d'organismes spécialisés en milieux très pauvres en nutriments (oligotrophes) ne formant

³ **Métabolisme** : Ensemble des processus physico-chimiques de transformation de matière et d'énergie par la cellule ou l'organisme, au cours des phénomènes de biosynthèse et de dégradation organiques (anabolisme et catabolisme).

généralement pas de colonies visibles (pouvant être considérés comme des stratèges K^4). D'autres techniques ont également vu le jour, telles que la micro-encapsulation (Zengler *et al.* 2002) isolant et faisant croître les bactéries dans des microcapsules de milieu de culture, ou les chambres de diffusion (Kaeberlein *et al.* 2002) permettant l'échange de petites molécules avec l'environnement mais retenant les bactéries. Toutes ces méthodes de cultures se basent sur la recherche des paramètres environnementaux convenant aux métabolismes des bactéries ciblées. Il est alors à noter que les stratégies classiques d'enrichissement ciblent en fait des organismes avec des métabolismes particuliers (Schlegel et Jannasch 1967) et une stratégie de développement r^5 , c'est-à-dire des organismes avec la capacité de produire beaucoup de biomasse en peu de temps (court temps de génération) quand les conditions environnementales sont optimales (espèces à efflorescences).

L'effort d'isolement perdure et le nombre de taxons⁶ décrit a très fortement augmenté durant les trois dernières décennies, par exemple, le nombre d'espèces microbiennes décrites a été multiplié par près de 10 entre 1980 et 2012 en atteignant de nos jours 11 587 espèces tous environnements confondus (Tableau I).

Tableau I. Nombre de noms valides publiés dans « *Approved Lists of Bacterial Names* »⁷ (en date du 4 octobre 2012, visible à l'adresse : <http://www.bacterio.cict.fr/number.html>)

	Classe	Sous-classe	Ordre	Sous-ordre	Famille	Genre	Espèce	Sous-espèce
avant 1980	7	1	21	3	66	290	1 792	131
1980's	5	0	11	0	28	245	1 392	158
1990's	2	5	9	10	45	434	2 082	106
2000's	63	1	86	6	145	987	5 137	115
2011 & 2012	11	0	11	1	36	185	1 136	21
Total	88	7	138	20	322	2 151	11 587	532

⁴ **Stratège K** : (s'oppose à stratège r) organismes dont la reproduction est faible et généralement le temps de vie long dû à une adaptation à des conditions de vie prévisibles (c.-à-d. « stable » : approvisionnement régulier en ressources, taux de mortalité faible)

⁵ **Stratège r** : organismes à fort taux de reproduction et de croissance en réponse à des conditions de vie imprévisibles et à fort taux de mortalité (compenser par le nombre)

⁶ **Taxon** : entité conceptuelle regroupant des organismes vivants possédant certains caractères communs et descendant d'un même ancêtre commun

⁷ **Approved Lists of Bacterial Names** : Liste internationale des noms officiels des bactéries régie par le *Code International de la Nomenclature Bactérienne* dont la revue officielle actuelle est : *International Journal for Systematic and Evolutionary Microbiology*.

1.2. Des classifications descriptives à la phylogénie moléculaire

1.2.1. *De Microcosmus aux Moneres*

Bien qu'Aristote ait déjà séparé dans l'Antiquité, sur le critère de la mobilité, le monde vivant entre végétal et animal, aucune classification concrète des êtres vivants n'avait été faite avant les travaux de Carl von Linné (1707–1778). Ce dernier classe les *Animalcules infusoires* de Leeuwenhoek dans un groupe qu'il nomme *Microcosmus* en 1735 avant d'inclure, en 1758, les *Animalcula* dans la classe des *Vermes*, les organismes sans forme propre. En utilisant le système de nomenclature binaire de Linné, Otto Müller (1730–1784) est le premier à établir une classification générale des micro-organismes en deux types morphologiques distincts *Bacillum* et *Spirillum*. Par la suite, le botaniste Ferdinand Cohn (1828–1898), en se basant sur le manque de tissu contractile (critère qu'il utilise pour différencier animaux et plantes) classe les microbes dans le règne des plantes et définit les bactéries comme « *des cellules sans chlorophylle de forme sphérique, oblongue ou cylindrique, parfois tordue ou courbée, qui se multiplient exclusivement par division transversale et vivant isolés ou en famille de cellules* ». Il les divise en quatre groupes en fonction de leurs caractéristiques morphologiques : *Sphaerobacteria* (sphérique), *Microbacteria* (petit bâtonnet ou cylindrique), *Desmobacteria* (long bâtonnet ou filaire) et *Spirobacteria* (hélice ou spirale).

Plus tard, le zoologiste Ernst Haeckel (1834–1919), influencé par les travaux de Charles Darwin (1809–1882), classa les organismes vivants, alors connus, dans un arbre avec un ancêtre commun (*Radix communis*) se séparant en trois branches principales correspondant aux trois royaumes : les plantes, les animaux et les protistes parmi lesquels se trouvent les *Moneres*. C'est le premier arbre phylogénétique⁸ dans le concept moderne et il est à noter que l'ancêtre commun apparaît comme appartenant aux *Moneres* (Figure 2). Le groupe des *Moneres* fut créé après observation de la structure très différente des bactéries par rapport aux autres microbes : elles ne possèdent pas de noyau différencié ou de membrane nucléaire ni de mitochondries, c'est à peu de choses, la définition actuelle des Procaryotes. La distinction

⁸ **Arbre phylogénétique** : arbre schématisant les relations de parentés entre les groupes d'êtres vivants, chaque nœud représentant l'ancêtre commun des deux branches.

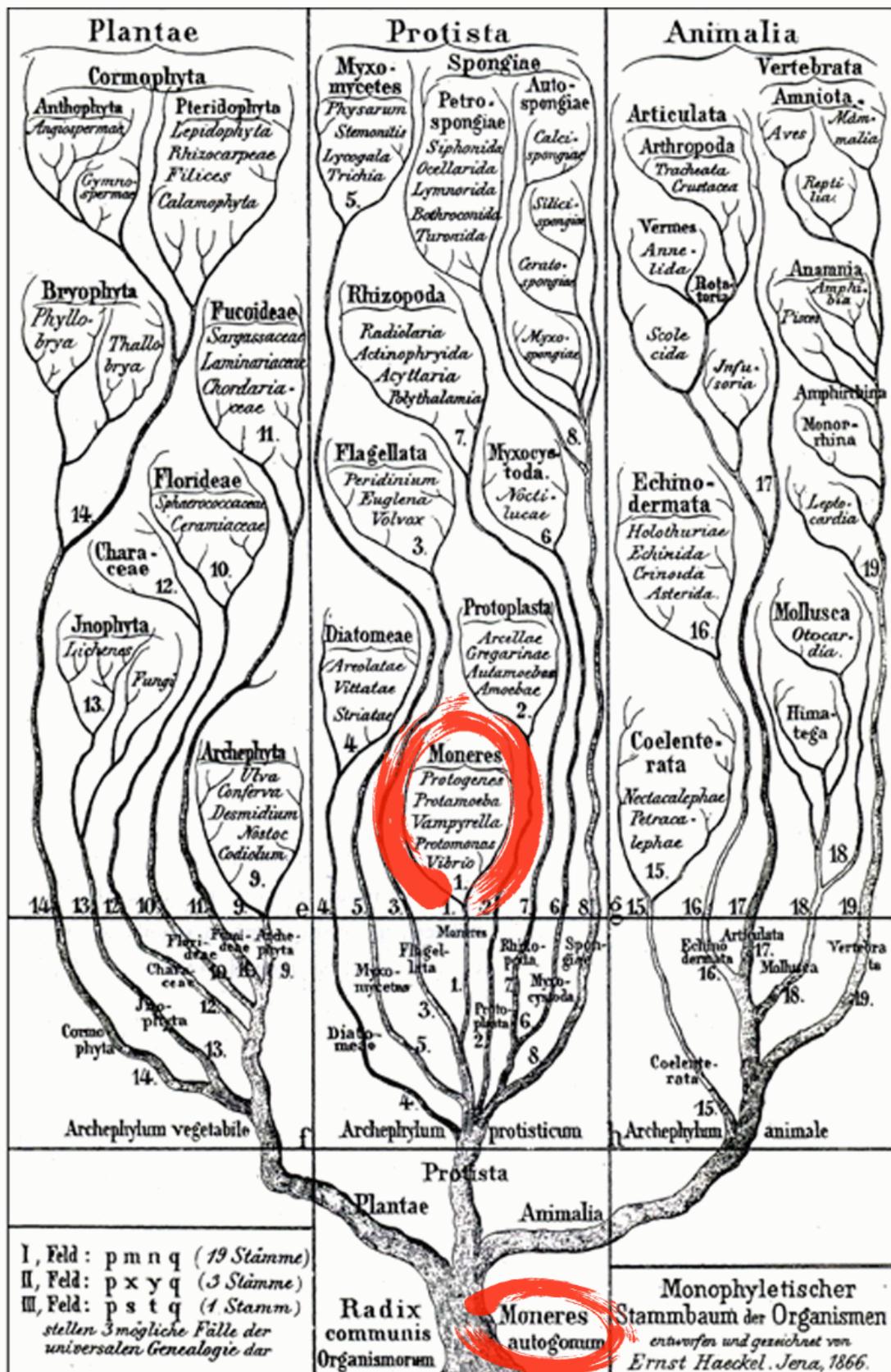


Figure 2. Arbre phylogénétique d'Ernst Haeckel (1866). Les procaryotes sont entourés en rouge.

entre procaryote et eucaryote⁹ fut proposée plus tard (1925) par le biologiste marin Edouard Chatton (1883–1947). La première classification systématique moderne fut entreprise et publiée en 1923 par la société des bactériologistes américains dirigée par David Bergey (1860–1937). Ce manuel contient une classification et une description précises de tous les microorganismes connus à cette époque (1335 espèces) et reste avec les éditions successives, de nos jours encore, une référence en la matière.

1.2.2. *La révolution nucléique*

En 1869, Friedrich Miescher (1844–1895) est le premier à avoir isolé des noyaux cellulaires une substance non protéique et non lipidique riche en phosphore (une première en biochimie) qu'il nomme « *nucléine* ». En montrant sa présence dans les spermatozoïdes, il émet l'hypothèse de son rôle dans la transmission des caractères héréditaires ; l'hérédité des caractères ayant été mise en évidence auparavant par Grégor Mendel (1822–1884). Richard Altmann (1852–1900) sépare vingt ans plus tard, des protéines et une substance acide, l'acide nucléique, à partir de la nucléine. En 1896, Albrecht Kossel (1853–1927) découvre dans l'acide nucléique les quatre bases azotées : adénine (A), cytosine (C), guanine (G), thymine (T). En 1928 est mis en évidence le désoxyribose, on parle alors d'acide désoxyribo-nucléique (ADN) et en 1944, Oswald Avery (1877–1955) et ses collaborateurs confirment le rôle de support de l'hérédité. Sa structure en double hélice sera déterminée en 1953 par James Watson (né en 1928) et Francis Crick (1916–2004), à partir des travaux de Rosalind Franklin (1920–1958).

Le concept de gène comme « unité de comptage ou de calcul » impliqué dans la transmission de l'information héréditaire est connu depuis les années 1890 avec Hugo de Vries (1848–1935) puis vingt ans plus tard avec Wilhelm Johannsen (1857–1927) qui dégagea la notion de toute interprétation morphologique. Toutefois, la réalité génétique du « gène » ainsi que le mécanisme de sa régulation et de son expression (opéron¹⁰) seront mis en évidence en 1961 par Jacques Monod (1910–1976) et François Jacob (né en 1920). Avec la découverte, en 1946, de la transmission latérale (sans relation de parenté) d'information

⁹ **Eucaryote** : s'opposant aux procaryotes (*Bacteria* et *Archeae*), ce sont les organismes possédant un noyau vrai et des organelles comme les mitochondries.

¹⁰ **Opéron** : groupement de gènes, généralement concourant à la réalisation d'une même fonction physiologique, et de séquences régulatrices permettant leur transcription de manière coordonnée.

génétique sous forme de plasmide¹¹ entre deux bactéries, pas nécessairement de la même espèce, lors de la conjugaison¹² par Joshua Lederberg (1925–2008) et Edward Tatum (1909–1975) puis la mise au point, en 1973, de plasmides vecteurs permettant de multiplier des gènes dans des bactéries (clonage moléculaire) par Cohen *et al.* (1973), il est devenu possible de produire une grande quantité de copies d'un même gène. Dans la même période, a été développée la première technique de séquençage de l'ADN par Sanger *et al.* (1977), basée sur l'intégration de nucléotides¹³ terminaux possédant un marqueur (radioactif ou fluorescent) générant un grand nombre de fragments de l'ADN répliqué, de tailles croissantes, visibles et séparables sur gel (une autre méthode a également été développée en parallèle par Maxam et Gilbert (1977), mais sa difficulté d'exécution et sa toxicité l'ont fait disparaître de nos jours). Avec également le développement de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) par Mullis *et al.* (1987), de nouvelles perspectives se sont ouvertes. Ces 3 techniques de base ont permis l'émergence d'une nouvelle discipline, la « biologie moléculaire » et l'essor des études de phylogénie et d'écologie moléculaire.

1.2.3. *La phylogénie moléculaire*

Entre 1962 et 1965, grâce aux travaux d'Emile Zuckerkandl, Linus Pauling (1962, 1965b, a) et d'Emmanuel Margoliash (1963), apparaît pour la première fois la notion que les gènes, au même titre que les protéines, peuvent être considérés « *comme des documents de l'histoire évolutive* » des organismes. Cette hypothèse révolutionnaire fut nommée « *horloge moléculaire* » et repose sur le concept que le nombre de différences entre les séquences d'un gène ou d'une protéine de deux organismes est conditionné en grande partie par le temps qui s'est écoulé depuis la divergence évolutive de ces espèces. Ce concept sous-entend que les séquences évoluent au cours du temps par mutations génétiques¹⁴ aléatoires et que leur maintien et accumulation dans les populations sont soumis à pression de sélection (une mutation ne sera conservée que si elle ne représente pas un désavantage à l'individu qui la

¹¹ **Plasmide** : molécule d'ADN, souvent circulaire, surnuméraire et non essentielle à la survie de cellule, distincte de l'ADN chromosomique et capable de répllication autonome.

¹² **Conjugaison** : transfert unidirectionnel non sexué d'informations génétiques par transmission de plasmides de conjugaison d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse.

¹³ **Nucléotide** : pentose de 1 à 3 groupements phosphates liant une base azotée, ceux liant une des bases A, T (ou U), C ou G forment l'unité de base de l'ADN ou ARN.

¹⁴ **Mutation** : modification de l'information génétique dans le génome d'une cellule qui, selon la localisation peut avoir des conséquences variés (aucun effet ou transformation voire suppression de la structure codée).

porte et fait baisser sa capacité de reproduction). Cette théorie a été émise par Motoo Kimura en 1968 et est connu comme la « *théorie neutraliste de l'évolution* » ou encore la « *théorie de la mutation et de la dérive aléatoire* » (Kimura 1968, 1983).

Grâce à ces nouveaux concepts et à l'évolution des techniques de biologie moléculaire, la classification des organismes et leur relation de parenté pouvaient être inférées non plus sur des critères phénotypiques¹⁵ mais sur des critères génétiques. La phylogénie moléculaire était née. Cette révolution pris un fort essor vers la fin des années 1970 lorsque Carl Woese et George Fox (1977) publièrent la première phylogénie universelle du vivant (Figure 3) basée sur un gène, commun à tous les organismes, codant pour l'ARN de la petite sous-unité du ribosome¹⁶ (16S pour les procaryotes, 18S pour les eucaryotes). Encore actuellement, ces gènes sont les marqueurs moléculaires de référence pour matérialiser les relations de parenté des organismes même si, depuis, la prise en compte de nombreux gènes orthologues¹⁷ est nécessaire (approche multi-locus) pour résoudre à fine échelle l'arbre de la vie (Ciccarelli *et al.* 2006).

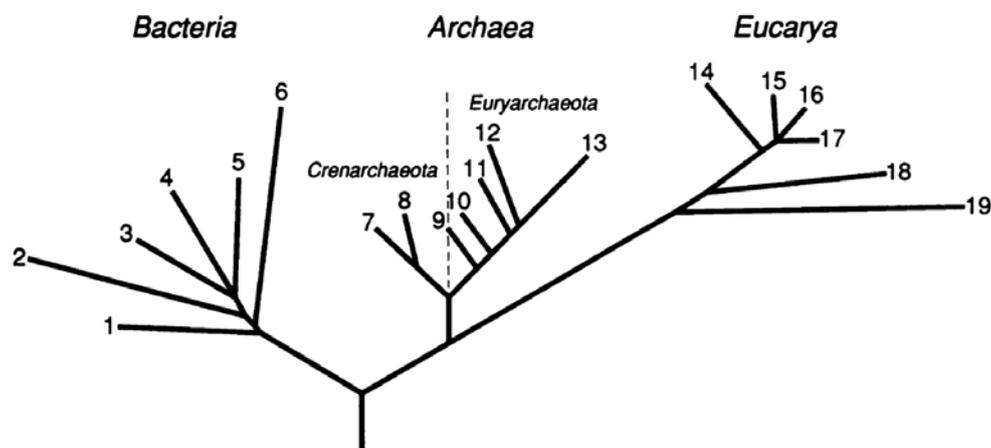


Figure 3. Arbre universel du vivant proposé par Woese *et al.* (1990) séparant les organismes en 3 grands règnes, Les Bacteria, les Archaea et les Eucarya. 1, *Thermotogales* ; 2, *Flavobacteriaceae* ; 3, *Cyanobacteria* ; 4, bactéries pourpres ; 5, bactéries Gram positives ; 6, bactéries vertes non sulfureuses ; 7, *Pyrodictium* ; 8, *Thermoproteus* ; 9, *Thermococcoïdes* ; 10, *Methanococcoïdes* ; 11, *Methanobacterales* ; 12, *Methanomicrobiales* ; 13 Halophiles extrêmes ; 14, Animaux ; 15, Ciliés ; 16, Plantes vertes ; 17, Champignons ; 18, Flagellés ; 19, *Microsporidia*.

¹⁵ **Phénotype** : caractère ou ensemble de caractères observables chez un organisme vivant.

¹⁶ **Ribosome** : complexe composé de protéines et d'ARN, présent chez tous les organismes vivants, décodant l'information des ARN messagers (fonction de la petite sous-unité) pour synthétiser les protéines correspondantes (fonction de la grosse sous-unité) suivant un **code génétique** pouvant varier selon le groupe d'organismes considéré (près d'une vingtaine sont connus actuellement)

¹⁷ **Gènes orthologues** : se dit de gènes descendants d'un même gène ancestral (homologues) qui après l'évènement de spéciation, ont évolué séparément.

En étudiant d'autres gènes que le 16S ou 18S, la phylogénie moléculaire permet non plus la visualisation de relation de parenté entre les organismes mais également l'exploration de la diversité moléculaire, de la répartition d'un gène dans l'environnement ou le mode de dispersion d'un gène (comme les transferts horizontaux). En ciblant un gène impliqué dans un processus ou un métabolisme particuliers, le suivi et la répartition d'une fonction est alors possible. Dans ce contexte, les cultures apparaissent également cruciales car elles permettent de lier les informations entre les gènes marqueurs de la relation de parenté et les gènes fonctionnels.

1.3. L'écologie microbienne marine

1.3.1. *L'écologie microbienne moléculaire et ses outils*

L'écologie microbienne, qui se définit comme « l'étude du comportement et des activités des micro-organismes dans leurs environnements naturels » (ce qui comprend également les interactions avec d'autres organismes), a réellement débuté avec les premières études des microbes du sol et de l'eau de Winogradsky et Beijerinck. Grâce aux cultures d'enrichissement, ils mirent en évidence la diversité de nutrition (métabolisme) des bactéries et purent ainsi isoler des bactéries capables d'utiliser certains composés clés qu'elles seules pouvaient métaboliser. Ainsi fut mise en lumière pour la première fois l'importance du compartiment bactérien dans les cycles des éléments chimiques (dit « cycles biogéochimiques¹⁸ ») tels que celui de l'azote ou du soufre. L'activité des micro-organismes pouvant avoir des impacts à grande échelle, dépassant leurs environnements (micro-habitat), l'écologie microbienne rejoint souvent la microbiologie environnementale qui ne considère ni l'environnement ni les interactions biotiques¹⁹.

Les avancées dans les techniques de « biologie moléculaire » ont permis à la fin des années 1980, de s'affranchir de la culture pour étudier les communautés microbiennes. Le groupe de Norman Pace propose l'idée que les « *organismes peuvent être identifiés sans les cultiver en récupérant et en séquençant les macromolécules [p. ex. ADN, ARN] de la nature,*

¹⁸ **Cycles biogéochimiques** : processus de transport et de transformation cyclique d'un élément ou composé chimique entre les grands réservoirs que sont la géosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère, dans lesquels se retrouve la biosphère.

¹⁹ **Biotique** : en rapport avec la vie ou les êtres vivants en général ; s'oppose à abiotique.

et les sondes oligonucléotidiques²⁰ peuvent permettre de manipuler, d'identifier et de quantifier les molécules de différents organismes » (Olsen *et al.* 1986). Ce principe fut vite appliqué et de nombreuses techniques virent le jour à cette époque et sont encore utilisées de nos jours. A des fins d'identification, se développe notamment la technique de « clonage-séquençage » dont la première application marquante en milieu marin fût l'étude de la diversité du bactérioplancton en mer des Sargasses de Giovannoni *et al.* (1990) :

- 1- les acides nucléiques totaux compris dans un échantillon naturel sont extraits,
- 2- le gène d'intérêt est amplifié par PCR en utilisant des amorces oligonucléotidiques spécifiques,
- 3- les fragments d'ADN générés sont insérés dans des vecteurs de clonage (souvent des plasmides),
- 4- ces vecteurs sont transformés (insérés) dans des bactéries (le plus souvent) afin d'individualiser le gène d'intérêt et d'en générer un grand nombre de copies,
- 5- les clones comprenant ces vecteurs sont sélectionnés (souvent en utilisant des gènes de résistance à des antibiotiques portés par le vecteur ^{et/ou} des gènes rapporteurs indiquant leur présence par une activité spécifique),
- 6- le gène d'intérêt est alors extrait de ces clones sélectionnés, éventuellement ré-amplifié par PCR puis séquencé.

Les séquences ainsi obtenues sont alors comparées à celles d'organismes cultivés ou connus permettant l'identification des groupes majeurs de bactéries présentes dans la communauté échantillonnée (ou la mise en évidence de nouveaux groupes). La diversité obtenue dans un échantillon dépendra alors en partie de la profondeur de séquençage (c.-à-d. le nombre de clones séquencés).

Dans les années 1990, des techniques d'empreinte moléculaire (« *fingerprinting* ») sont mises au point et permettent d'avoir une vue synoptique de la diversité des communautés bactériennes environnementales (voir revue de Dorigo *et al.* (2005)). En effet, au lieu de juger la diversité d'un échantillon sur la base de l'effort de séquençage, ces techniques permettent d'obtenir une vue globale de la diversité sans avoir à séquencer *a priori* et sont toutes basées

²⁰ **Sonde/amorce oligonucléotidique** : courts segments d'acides nucléiques (ARN ou ADN) artificiels pouvant être couplés à un marquage radioactif ou fluorescent servant à retrouver une séquence d'acide nucléique complémentaire par hybridation

sur le polymorphisme de séquence. On distingue les techniques séparant les fragments générés par PCR (qui ont des séquences différentes en fonction de l'espèce/genre) sur la base de la composition en séquences (DGGE, TTGE (Fischer et Lerman 1979, Muyzer *et al.* 1993) et SSCP (Orita *et al.* 1989, Lee *et al.* 1996))²¹ ou sur la base de la longueur de séquences soit naturelle car la région amplifiée est de nature hypervariable ([A]RISA (Borneman et Triplett 1997, Fisher *et al.* 2000))²² soit après coupure par des enzymes de restrictions²³ ([T]RFLP (Liu *et al.* 1997))²⁴. Bien que souffrant de plusieurs biais (Muyzer et Smalla 1998) notamment dus à leur sensibilité limitée, ces techniques permettent la comparaison standardisée et rapide des communautés bactériennes globales d'environnements différents.

Parallèlement se développent également des techniques moléculaires permettant de quantifier les groupes bactériens en utilisant des sondes oligonucléotidiques spécifiques de chaque groupe (à diverses échelles, de l'espèce à la classe jusqu'au règne) dessinées en utilisant les phylogénies moléculaires. Parmi elles, le FISH (*Fluorescent in situ hybridization* (Amann *et al.* 1990, 1995)) et ses dérivés, technique de microscopie (ou de cytométrie en flux) utilisant des sondes couplées à des fluorochromes²⁵, ainsi que la PCR quantitative (qPCR (Porcher *et al.* 1992, Suzuki *et al.* 2000)) utilisant un fluorochrome permettant de suivre en temps réel l'amplification génique par PCR, sont les plus populaires dans les études environnementales.

Plus récemment, de nombreuses nouvelles techniques de séquençage se sont développées. La première fut le « *shotgun sequencing* », dont l'idée est basée sur la

²¹ **DGGE, TTGE** : *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* et *Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis* sont basées sur la dénaturation des fragments obtenus par PCR par gradient croissant de composés chimiques (DGGE) ou de température (TTGE) pendant leur migration dans un gel d'acrylamide. Les fragments de séquences différentes présenteront des distances de migration différentes. **SSCP** : *Single Strand Conformation Polymorphism* est basée sur la séparation par électrophorèse de fragments dénaturés simple brin sur la base de leur repliement tridimensionnel qui est dépendant de leur séquence.

²² **[A]RISA** : *[Automated] Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* est basée sur la séparation par électrophorèse des séquences hypervariables intergéniques 16S-23S (*internal transcribed spacer* ou ITS) en fonction de leur poids (*ie* longueur de séquence)

²³ **Enzyme de restriction** : enzyme, à l'origine de défense produite par les bactéries, pouvant couper un fragment d'ADN au niveau d'une courte séquence de nucléotides caractéristique (site de restriction) en clivant les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides ; chaque enzyme de restriction reconnaissant un seul site spécifique

²⁴ **[T]RFLP** : *[Terminal]-Restriction Fragment Length Polymorphism* est basée sur la séparation par électrophorèse des fragments digérés par des enzymes de restriction, les patrons de digestion étant dépendant de la séquence des fragments générés par PCR.

²⁵ **Fluorochrome** : substance chimique composée de cycle(s) aromatique(s) capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation

fragmentation aléatoire de l'ADN environnemental ou d'un individu puis son clonage-séquençage massif. En faisant chevaucher les séquences obtenues, il est alors possible de recréer *in silico*²⁶ un génome²⁷ (*whole genome sequencing*) ou un métagénome²⁸. Vraiment exploitable à haut débit à partir de 1990, cette technique a notamment permis le séquençage du génome humain, et la réalisation du premier métagénome d'une mer, la mer des Sargasses (Venter *et al.* 2004). Cette technique est longue et coûteuse et fut surpassée au milieu des années 2000 par les techniques automatisées de séquençage dit de « haut débit », appelées NGS (*Next Generation Sequencing*). Toutes résultantes d'un mélange de nouvelles technologies, elles sont tout de même basées soit sur une amélioration des techniques de Sanger (par exemple, la technologie Illumina) soit sur un principe différent tel que le pyroséquençage, né en 1988 (Hyman 1988), dont le principe est de suivre la réaction en temps réel de synthèse de l'ADN (par le suivi de la formation de pyrophosphate). Ces techniques permettent de générer un grand nombre de séquences, rendant possible notamment le séquençage de génome entier, d'explorer en profondeur la diversité et de quantifier l'importance des groupes microbiens dans un environnement (voir par exemple Rusch *et al.* (2007) ou Zinger *et al.* (2011)). Ces outils puissants génèrent énormément de données mais souvent de courtes séquences contenant également beaucoup d'erreurs, le recul nécessaire pour la validation des données acquises par ces méthodes n'est probablement pas encore suffisant. Cependant, elles permettent d'obtenir un niveau très fin d'analyse, la question restante étant de savoir si, dans le cadre de certaines études environnementales, l'outil est réellement nécessaire (c.-à-d. à quel niveau de finesse la diversité doit être analysée) et si les techniques de clonage-séquençage et d'empreinte moléculaire, ayant l'avantage de rendre possible la comparaison avec les études précédentes, ne permettent pas d'obtenir une vue suffisante pour la compréhension du système étudié. Un exemple quelque peu caricatural peut apparaître à la lecture du livre de Claude Zobell (*Microbiology: A Monograph on Hydrobacteriology* (1946)) qui, à partir d'études uniquement culturelles et microscopiques (à transmission), expose une compréhension très fine des systèmes microbiens marins ainsi que des concepts écologiques étonnamment modernes. L'évolution et la persistance des divers types de techniques pour évaluer la diversité microbienne ont été représentés (Figure 4) par

²⁶ **In silico** : réalisé à l'aide d'un ordinateur ou via une simulation sur ordinateur

²⁷ **Génome** : ensemble du matériel génétique (séquences codantes et non-codantes) d'un individu ou d'une espèce codé dans son ADN (à l'exception de certains virus dont le génome est porté par des molécules d'ARN).

²⁸ **Métagénome** : génome non plus d'un individu mais ensemble des génomes d'un écosystème

Zinger *et al* (2012). Cet histogramme montre clairement la généralisation des techniques de biologie moléculaire, la persistance et la dominance des techniques de clonage-séquençage, le maintien des techniques d'empreinte moléculaire et de l'effort d'isolation et de séquençage de culture ainsi que l'apparition des techniques de séquençage haut débit.

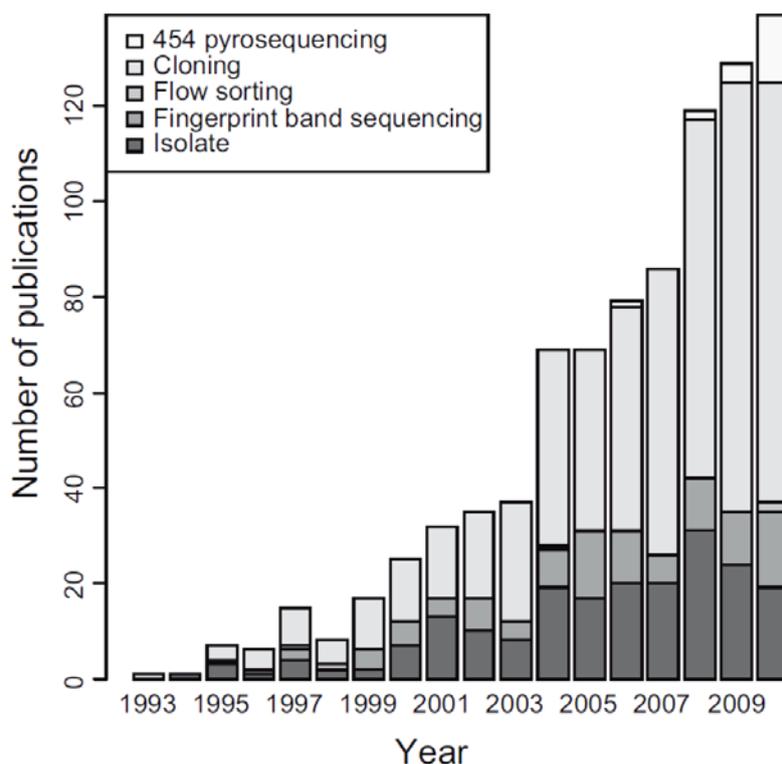


Figure 4. Tendances générales d'utilisation des approches de séquençage en nombre de publications entre 1990 et 2010. Recherche faite en mai 2011 avec « *ISI Web of Knowledge v5.2* » et les mots-clés : ('aquatic' or 'water') and 'micro*' and 'diversity' and ('sequence*' or 'librar*'). L'adéquation des 3169 publications obtenues a été contrôlée manuellement et les publications ne générant pas de séquences nouvelles (revues, méta-analyses, articles théoriques) ont été enlevées, il restait 885 articles pour l'analyse.

1.3.2. *Microbes marins, d'une importance insoupçonnée*

En utilisant des techniques culturelles, les travaux pionniers de Certes (1884), Fischer (1886) et Russel (1891) puis Waksman (1934) avaient déjà établi que les bactéries (cultivables) étaient largement distribuées dans les océans (études résumées en détail dans le livre de Zobell (1946)), y compris dans les environnements extrêmes telles que les eaux froides des pôles (études de Gazert (1906), Hesse (1914) et Issatchenko (1914)). Toutefois de par les limitations techniques des cultures (voir § 1.1.3) et les difficultés à discriminer les cellules par la microscopie classique (même à contraste de phase), l'importance numérique des bactéries marines est restée insoupçonnée jusque dans les années 1970.

A cette période se développent, à partir de l'idée de Ferguson Wood (1955), les techniques de microscopie à épifluorescence avec les protocoles de Zimmermann et Meyer-Reil (1974) et de Hobbie *et al* (1977), ainsi que des fluorochromes ciblant des composants cellulaires tels que l'acridine orange (Hobbie *et al.* 1977), le DAPI (Porter et Feig 1980) ou le SYBR green (Noble et Fuhrman 1998) se liant tous à l'ADN (ou ARN). Ces techniques permettent de nouvelles estimations de l'abondance bactérienne dans les océans : de quelques dizaines à plusieurs centaines de bactéries par millilitre d'eau de mer auparavant, on les estime alors, pour le même volume, à des dizaines de milliers voire des millions. Dans les régions les plus pauvres en nutriments, l'estimation brute est de 100 à 500 millions de bactéries par litre d'eau de mer (Cho et Azam 1990) et peut atteindre jusqu'à 2 milliards d'individus pour le même volume dans les eaux riches des estuaires (Ducklow et Shiah 1993). La Terre étant recouverte à 70% par des masses d'eau connectées formant l'océan mondial, leur abondance globale laisse alors à penser que ces organismes jouent probablement un rôle plus important qu'estimé auparavant, modifiant profondément la considération qui leur était apportée jusqu'alors. Les microbes apparaissent désormais comme dominants dans la biosphère et en particulier dans le milieu marin où ils peuvent atteindre 90% de la biomasse des écosystèmes, correspondant, d'un point de vue global, à une quantité de carbone fixée entre 60% et 100% de celle contenue dans les plantes terrestres (Whitman *et al.* 1998). Leur importance est désormais assise mais la réelle compréhension de leur rôle passe par la connaissance nécessaire de leur diversité ainsi que de leur répartition.

1.3.3. *Bactéries marines, diversité et distribution*

Que seulement 86 espèces bactériennes marines soient listées parmi les 1335 espèces répertoriées dans la première édition du Bergey's (1923) montre la faible attention apportée à la diversité des bactéries marines auparavant. Cependant, l'effort d'isolement et surtout l'avènement des phylogénies moléculaires dans les décennies qui ont suivi, ont mis en évidence une diversité inattendue et conséquente. En 2003, sur les 52 phyla²⁹ bactériens répertoriés (tous environnements confondus) grâce à l'approche de clonage-séquençage de l'ARNr 16S, seulement 26 comprenaient des représentants cultivés (Rappé et Giovannoni 2003). La majorité de la diversité bactérienne apparaît alors comme inconnue et

²⁹ **Phylum** : dans la classification classique, le phylum correspond au rang en-dessous du règne et au-dessus de la classe. Dans notre cas, il peut se comprendre comme « lignée majeure »

l'environnement marin ne fait pas exception. Avec la première étude visant à répertorier la diversité moléculaire dans la mer des Sargasses, Giovannoni *et al.* (1990) ont mis en évidence, même si leur étude reste très restreinte, une diversité largement méconnue de groupes bactériens pourtant dominants. Dans la décennie suivante, il a été mis en évidence de nombreux clades qui n'avaient pas de représentants cultivés (Figure 5). De nos jours, des représentants sont cultivés pour quasiment tous les phylums marins connus, cette réalité est très différente à plus fine échelle phylogénique (espèce, genre voire famille) où la grande majorité de la diversité reste inaccessible en culture.

Connaitre la diversité spécifique est un pré-requis nécessaire pour notre compréhension de la structuration de la communauté bactérienne marine, sa biogéographie et les interactions entre les assemblages qui la composent. Toutefois, la difficulté réside dans la définition d'une espèce chez les bactéries compte-tenu de leurs caractéristiques phénotypiques et génétiques. En particulier, outre le manque de caractères morpho-anatomiques discriminants, leur court temps de génération (pour la plupart des groupes), leur capacité à la reproduction clonale, les nombreux échanges de gènes entre taxons sans relation de parenté (c.-à-d. les transferts horizontaux (Ochman *et al.* 2000) et les multiples copies d'opérons par génomes (Acinas *et al.* 2004b)) résultent en un continuum de diversité génétique dans les génomes microbiens compliquant l'identification des taxons proches (Acinas *et al.* 2004a). Ceci rend la classification des bactéries en unités discrètes difficile et a amené à la création d'unité pratique (« *Operational Taxonomic Units* » ou OTU) en fixant un pourcentage de similarité de séquence (Rosselló-Mora et Amann 2001), rendant la classification possible mais n'ayant pas forcément un réel sens écologique. Même imparfait, le système de classification en OTUs a permis d'avoir un aperçu de la biogéographie des communautés bactériennes marines et des impacts du type d'écosystème ou des gradients latitudinaux sur cette dernière (Pommier *et al.* 2007, Zinger *et al.* 2011). De grandes avancées ont notamment été rendues possibles par les campagnes d'exploration de la diversité microbienne globale. En utilisant une approche de clonage-séquençage, Pommier *et al.* (2007) ont analysé en profondeur (c.-à-d. grand nombre de clones séquencés) les communautés bactérioplanktoniques³⁰ côtières (à 10 km des côtes)

³⁰ **Plancton** : ensemble des êtres vivants qui dérivent dans les masses d'eau (dont la mobilité ne permet pas de s'affranchir de la masse d'eau) de taille variable. On traitera dans cette thèse du pico-(0,2 – 2 ou 3µm), du

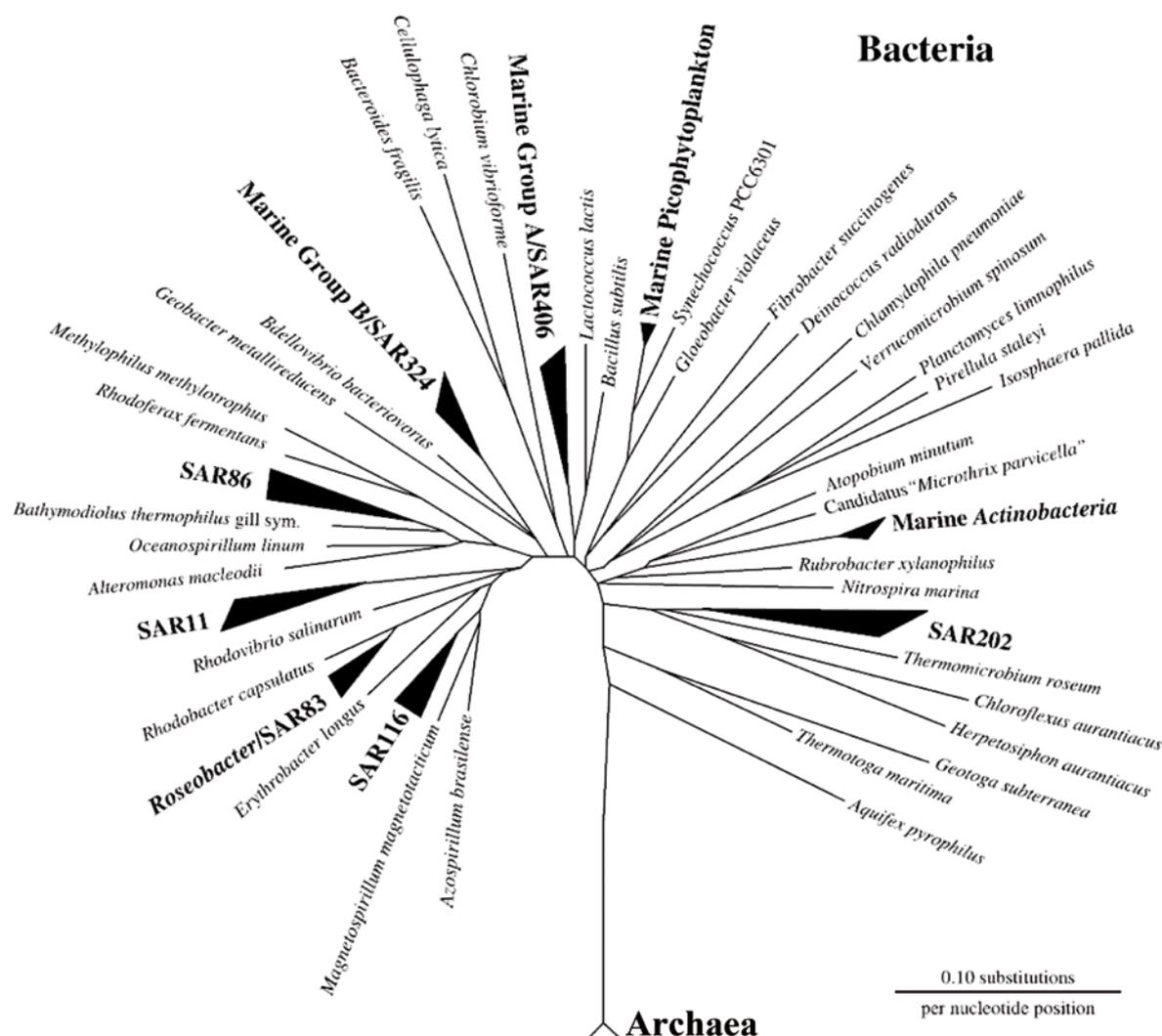


Figure 5. Illustration schématique des relations phylogénétiques entre les grands groupes incultivés parmi les souches cultivées en 2000 (Giovannoni et Rappé 2000).

de surface échantillonnées au même moment autour du monde. Cette étude a mis en évidence que la communauté globale du bactérioplancton marin présentait une richesse spécifique décroissante avec l'augmentation de la latitude (Figure 6). Plus récemment, en utilisant les techniques de séquençage à haut débit dans le cadre du métagénome de la mer des Sargasses (Venter *et al.* 2004), du projet GOS (« *Global Ocean Sampling* » (Rusch *et al.* 2007, Yooshep *et al.* 2007, 2010)) mais également par l'analyse d'un très grand nombre de séquences courtes (comme les régions variables de l'ARNr 16S) provenant de nombreux échantillons dans le cadre de l'ICoMM (« *International Census of Marine Microbes* » regroupant de nombreuses

nano (2 – 20 µm) et du micro-plancton (20 – 200 µm) ; le bactérioplancton étant l'ensemble des *Bacteria* (et *Archaea*) planctoniques.

études de pyroséquençage (Amaral-Zettler *et al.* 2010, Zinger *et al.* 2011)), la diversité microbienne a été explorée profondément à travers les écosystèmes majeurs de l'océan mondial.

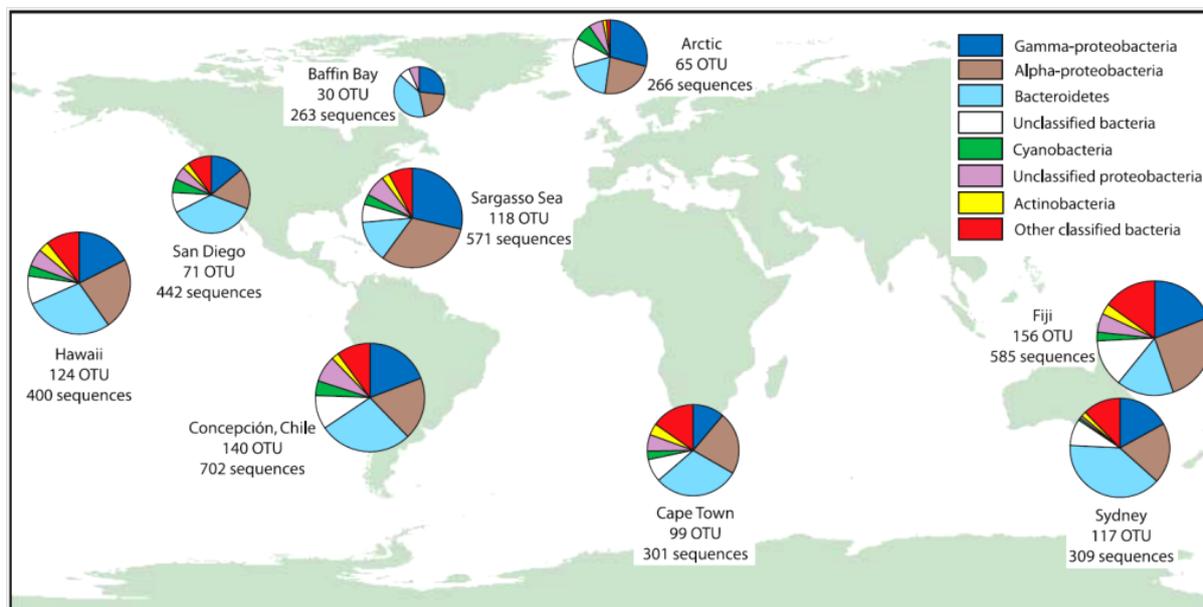


Figure 6. Composition et richesse spécifique du bactérioplancton marin de surface d'après Pommier *et al.* (2007). Neuf communautés ont été échantillonnées à 5 m de profondeur. Le nombre d'OTUs ainsi que le nombre de clones séquencés sont indiqués, la taille des graphiques étant proportionnelle au nombre total d'OTUs échantillonnés.

La grande majorité des bactéries marines connues se répartie en une douzaine de phylums avec des différences génétiques très importantes (Figure 7) de l'ordre de celles qu'on peut retrouver au sein des insectes. A partir d'une vue globale basée sur des techniques utilisant la PCR (qui peut fournir une vue biaisée de la réalité (Suzuki et Giovannoni 1996)), les deux classes dominantes (en proportion de séquences ribosomiques) en milieu marin sont les *Alphaproteobacteria* et les *Gammaproteobacteria* et des différences marquées de répartition sont observables. En effet, les communautés benthiques³¹ sont dominées par les *Gammaproteobacteria*, les *Deltaproteobacteria* (les *Epsilonproteobacteria* dans les sources hydrothermales profondes), les *Planctomycetes*, les *Actinobacteria* et les *Acidobacteria* qui sont souvent des taxons possédant des métabolismes particuliers. Les communautés benthiques en milieu côtier sont plus hétérogènes en composition qu'en milieu profond mais ne montrent pourtant pas de différences globales très marquées (Zinger *et al.* 2011).

³¹ **Benthique** : qui occupe le fond, c.-à-d. le substrat et/ou la couche d'eau à proximité

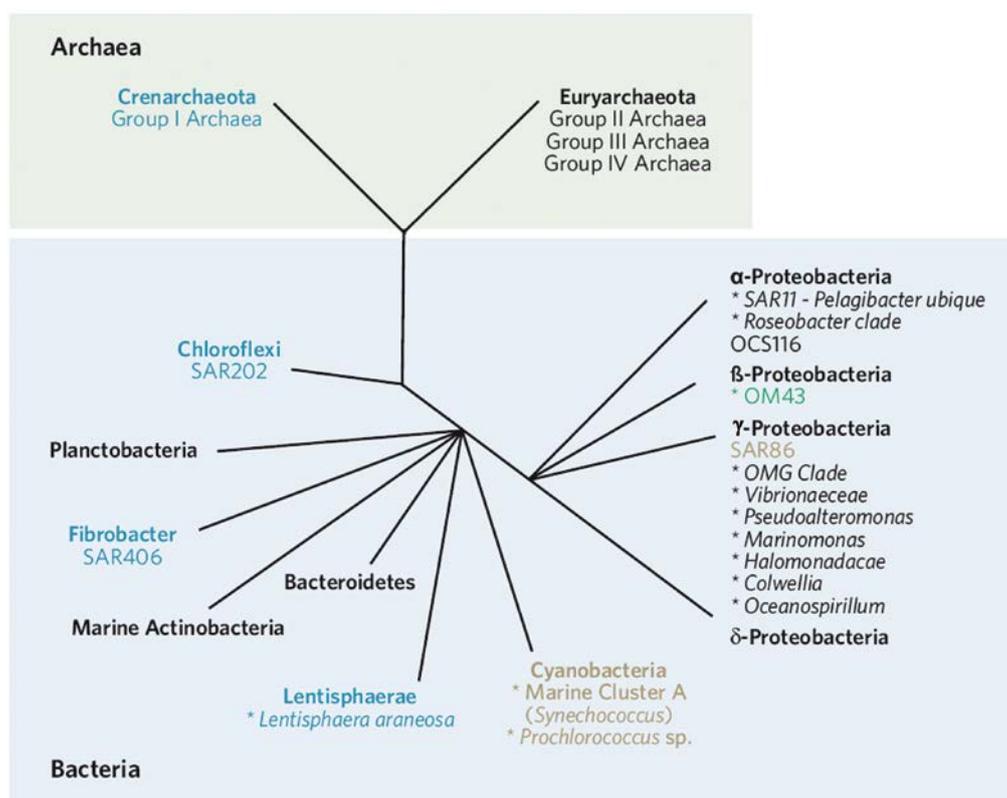


Figure 7. Illustration schématique des relations phylogénétiques entre les groupes majeurs de bactéries marines, d'après Giovannoni et Stingl (2005). En brun les taxons trouvés dans la zone euphotique³², en bleu dans la zone mésopélagique³³ et les eaux polaires hivernales de surface, en vert les groupes qui semblent n'être retrouvés que dans l'océan côtier, en noir les taxons les plus souvent rencontrés dans les océans.

En revanche, les communautés pélagiques³⁴ sont dominées par les *Alphaproteobacteria*, les *Cyanobacteria* et les *Bacteroidetes* (en particulier les *Flavobacteria*). Les communautés pélagiques et benthiques ne partagent que peu de taxons (bien qu'en milieu côtier le nombre d'OTUs partagées augmente) et leurs compositions diffèrent globalement. En surface, les habitats côtier et hauturier sont liés mais les proportions de *Flavobacteria* et de *Rhodobacterales* (*Alphaproteobacteria*) augmentent dans les milieux côtiers plus riches en nutriments et en particules (Kirchman 2002, Buchan *et al.* 2005) en même temps que la diminution de la proportion du groupe des SAR11 (groupe proche des *Rickettsiales*, *Alphaproteobacteria*) et des *Cyanobacteria*, groupes qui dominent en milieu hauturier

³² **Zone euphotique** : zone dans une colonne d'eau s'étendant de la surface jusqu'à la profondeur à laquelle l'intensité lumineuse résiduelle correspond à 1 % de celle de surface correspondant à la limite de lumière permettant encore la photosynthèse ; habituellement de 0 m à ~ 200 m de profondeur au large.

³³ **Zone mésopélagique** : zone dans une colonne d'eau s'étendant de la limite inférieure de la zone euphotique jusqu'à la limite de pénétration de la lumière (*ie* où l'intensité lumineuse résiduelle est comprise entre 1 % et 0 % de celle de surface) ; habituellement de ~ 200 m à ~ 1 000 m de profondeur au large.

³⁴ **Pélagique** : qui occupe la colonne d'eau.

pauvres en nutriments. Les *Betaproteobacteria*, classe abondante dans les eaux douces (Glöckner *et al.* 2000, Zwart *et al.* 2002), sont présentes en milieu marin mais semblent restreintes aux milieux côtiers (Rappé *et al.* 2000, Riemann *et al.* 2008). Les milieux hauturiers présentent une variabilité de communautés réduite et montrent des patrons de distributions verticales communs (Giovannoni et Stingl 2005, DeLong *et al.* 2006, Arístegui *et al.* 2009) : les *Cyanobacteria* diminuent avec la profondeur en accord avec leur dépendance à la lumière alors que les *Deltaproteobacteria* et les *Actinobacteria* augmentent.

Globalement, les *Alphaproteobacteria* marines représentent 43,1 % des séquences d'ARNr 16S du GOS (40,8 % en océan hauturier, 51,3 % en océan côtier et 36,8 % en estuaires ; Biers *et al.*(2009)). Parmi elles, le groupe des SAR11 et les *Rhodobacterales* (principalement le clade des *Roseobacter*) sont dominants dans de nombreux écosystèmes. Le groupe des SAR11 est le premier groupe majeur de bactéries marines découvert par clonage-séquençage (Giovannoni *et al.* 1990). Il est très abondant dans l'océan mondial, Morris *et al.* (2002) le décrivent comme le clade dominant de l'océan de surface et l'avaient estimé à 35 % avec des valeurs pouvant dépasser les 50 % du bactérioplancton de la zone euphotique (avec un maximum à 40m) et 25% dans la zone mésopélagique. Sa dominance dans l'océan mondial a été confirmée depuis par les études globales utilisant le séquençage à haut débit. Giovannoni et Stingl (2005) l'estiment au total à plus de 40 % des séquences d'ARNr 16S dans le métagénome des Sargasses, Biers *et al.* (2009) à 30,9 % des séquences totales d'ARNr 16S du GOS (31 % au large, 36,7 % en côtier et 32,9 % dans les estuaires) et Zinger *et al.* (2011) et Amaral-Zettler *et al.* (2010) l'estiment à 37 ± 21 % du total de séquences identifiées au niveau taxonomique de la famille dans le projet de pyroséquençage ICoMM (Figure 8). De nombreuses études le décrivent comme un groupe ubiquiste en milieu marin, c.-à-d. présent dans tous les environnements marins. Toutefois cette réalité peut être nuancée, en effet, ce groupe présente une grande microdiversité avec une biogéographie marquée et différents sous-clades de SAR11 sont présents à diverses profondeurs (Field 1997), dans divers types d'habitats (il existe même des sous-clades dans les eaux douces (Bahr *et al.* 1996)) et à diverses saisons (García-Martínez et Rodríguez-Valera 2000, Brown et Fuhrman 2005). Cependant, les membres des SAR11 semblent suivre un mode de vie commun. Ce sont des bactéries gram négatives (possédant deux membranes cellulaires), de très petites tailles (faisant partie de l'ultramicrobacterioplancton dont le volume cellulaire de $0,01$ à $0,12 \mu\text{m}^3$ est plus d'un tiers plus petit que les bactéries marines isolées communément de $0,34$ à $6 \mu\text{m}^3$), vivant libres en milieu pélagique mais non mobiles.

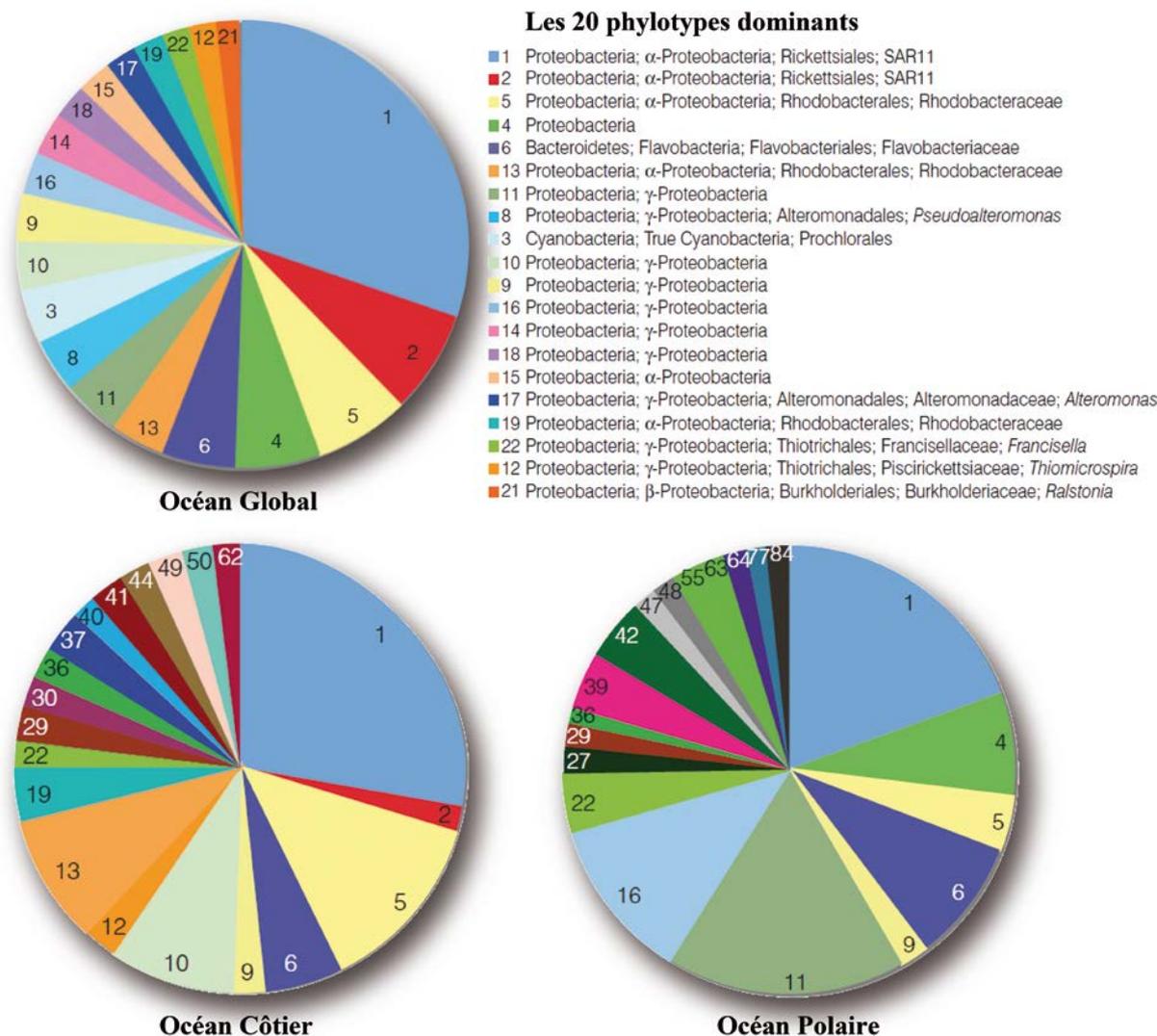


Figure 8. Diagrammes des 20 phylotypes bactériens les plus abondants obtenus par pyroséquençage dans divers habitats marins, d'après Amaral-Zettler *et al.* (2010). En haut, pour le projet ICoMM dans son ensemble (*pelagos + benthos*) ; en bas à gauche, pour les échantillons provenant de l'océan côtier (projets de pyroséquençage : Coastal New England, Hood Canal Washington, LaCAR Cooperative Run, MPI Helgoland, PML English Channel, Eel Pond Winter Pilot Study, Little Sippewissett Salt Marsh, Mount Hope Bay) ; en bas à droite, pour l'océan polaire (Active But Rare, Arctic Chukchi Beaufort, Amundsen Sea Antarctica, Census Antarctic Marine, Deep Arctic Ocean). Numéros des taxons : (1) SAR11 ; (2) SAR11 ; (3) *Prochlorales* ; (4) *Proteobacteria* ; (5) *Rhodobacteraceae* ; (6) *Flavobacteriaceae* ; (8) *Pseudoalteromonas* ; (9) γ -*Proteobacteria* ; (10) γ -*Proteobacteria* ; (11) γ -*Proteobacteria* ; (12) *Thiomicrospira* ; (13) *Rhodobacteraceae* ; (14) γ -*Proteobacteria* ; (15) α -*Proteobacteria* ; (16) γ -*Proteobacteria* ; (17) *Alteromonas* ; (18) γ -*Proteobacteria* ; (19) *Rhodobacteraceae* ; (21) *Ralstonia* ; (22) *Francisella* ; (27) *Flavobacteriaceae* ; (29) *Flavobacteriaceae* ; (30) α -*Proteobacteria* ; (36) *Methylophilus* ; (37) *Roseovarius* ; (39) γ -*Proteobacteria* ; (40) *Flavobacteriaceae* ; (41) *Rhodobacteraceae* ; (42) γ -*Proteobacteria* ; (44) *Glaciicola* ; (47) *Flavobacteriaceae* ; (48) α -*Proteobacteria* ; (49) γ -*Proteobacteria* ; (50) *Rhodospirillales* ; (55) γ -*Proteobacteria* ; (62) γ -*Proteobacteria* ; (63) *Bacteria* ; (64) *Sulfitobacter* ; (77) *Flavobacteriaceae* ; (84) *Methylophaga*.

Les organismes appartenant à ce groupe sont perçus actuellement comme oligotrophes³⁵ c.-à-d. qui ont la capacité de se développer en fortes concentrations dans les milieux limités en carbone préférentiellement (zones oligotrophes). Comme pour tous les membres de l'ultramicrobactérioplancton, la petite taille des cellules serait une réponse adaptative à la vie en milieu dilué. En effet, l'optimisation du prélèvement de nutriments résiderait en partie dans l'augmentation du ratio entre la surface de contact avec l'environnement extérieur et le volume intracellulaire. En outre, une petite taille permet en théorie de dépenser moins d'énergie pour la croissance. L'oligotrophie des SAR11 a rendu très longtemps impossible leur isolement en culture pure. Les premières souches de « Candidatus *Pelagibacter ubique* », appartenant au clade Ia du groupe SAR11, ont été isolées grâce aux techniques de dilution par extinction aux débuts des années 2000 (Rappé *et al.* 2002, Simu et Hagström 2004). Le génome d'une de ces souches (HTCC1062) a été entièrement séquencé (Giovannoni *et al.* 2005b) et s'est révélé être de très petite taille (1,3 Mbp) pour un organisme ne vivant pas en symbiose. Cette petite taille de génome pourrait être une preuve de l'adaptation de ces organismes à un environnement pauvre par réduction du génome (« *genome streamlining* » consistant en une perte des gènes superflus, ou n'ayant pas un ratio coûts de synthèse/apports suffisamment avantageux, par processus de sélection génétique). Cette vue semblerait être appuyée par l'analyse des gènes de transport et de métabolisme présents (Giovannoni *et al.* 2005b) ainsi que du protéome³⁶ de cette souche (Sowell *et al.* 2008). Ils montrent une grande quantité et diversité de transporteurs impliqués dans l'import de multiples substrats (notamment de divers composés organiques phosphorés et contenant du soufre réduit) ainsi qu'un métabolisme assez simple (c.-à-d. sans système alternatif de métabolisme, sans structure de mobilité ou autre structure complexe). Les mesures *in situ* de l'assimilation de composés organiques par les SAR11 laissent penser que ce groupe est très actif et joue un rôle important, surtout par leur abondance, dans les cycles du carbone, de l'azote et du soufre dans les océans (Malmström *et al.* 2004a). Cependant, en milieu contrôlé, les SAR11 semblent avoir un taux de croissance très faible ($\sim 0.07 \text{ jour}^{-1}$) laissant à penser que d'autres groupes bactériens sont plus efficaces dans le recyclage du carbone en milieu marin (Ferrera *et al.* 2011).

³⁵ **Oligotrophe** : milieu (extrêmement) pauvre en éléments nutritifs ou métabolisme permettant aux organismes l'utilisant de se reproduire de façon optimale à (très) faible concentration d'éléments nutritifs.

³⁶ **Protéome** : ensemble des protéines exprimées dans une cellule ou un organisme.

À l'inverse parmi les groupes d'*Alphaproteobacteria* abondants, les *Rhodobacterales*, et principalement le clade des *Roseobacter*, est un groupe avec de nombreux représentants cultivés (notamment isolés sur milieux riches ; voir revue de Brinkhoff *et al.* (2008)). Ce groupe, présentant des physiologies hétérogènes, est retrouvé dans de nombreux écosystèmes marins souvent riches, principalement, mais pas exclusivement, en milieu côtier, des tropiques aux pôles (Buchan *et al.* 2005, Wagner-Döbler et Biebl 2006), mais n'est pas retrouvé en milieu d'eau douce ou en milieu terrestre. Très souvent en interaction avec des eucaryotes photosynthétiques (uni- et pluricellulaire), ce groupe présente de hautes abondances locales correspondant le plus souvent à des conditions d'efflorescence ou post-efflorescence de ce phytoplancton³⁷ (Moran *et al.* 2007). Typiquement, il constitue plus de 20 % du bactérioplancton côtier et près de 15 % des communautés bactériennes dans la couche d'eaux mélangées mais en revanche est quasi-absent en dessous de la couche euphotique. Les très fréquentes relations symbiotiques ainsi que les capacités métaboliques particulières trouvées dans ce groupe, permettant la transformation de composés issus des eucaryotes photosynthétiques tels que le dimethylsulfoniopropionate (DMSP) et des composés aromatiques difficilement dégradables, laissent à supposer que ces organismes ont un métabolisme copiotrophe³⁸. Cette tendance est appuyée par les larges génomes (en moyenne 4,4 Mbp) des souches séquencées montrant, à l'inverse des SAR11, de multiples voies d'acquisition et de dégradation de divers éléments nutritifs ainsi que de nombreux mécanismes senseurs et d'interaction avec l'environnement (Brinkhoff *et al.* 2008).

Le groupe des SAR116 est un autre groupe dominant d'*Alphaproteobacteria* incultivées découvert lors de l'étude de Giovannoni *et al.* (1990). Comme pour les SAR11, ce groupe est considéré comme ubiquiste en milieu marin bien qu'il semble moins abondant que les SAR11 et présente également une grande microdiversité (Giovannoni et Rappé 2000). Biers *et al.* (2009) estiment l'abondance de ce groupe à environ 3 % des séquences totales d'ARNr 16S du GOS avec des contributions variables en fonction du type de zones océaniques considéré : 2,3 % au large, 4,1 % en côtier et 0,8 % dans les estuaires. Bien que les données sur ce groupe sont encore trop insuffisantes, il semble que sa répartition soit préférentiellement côtière (Giovannoni et Rappé 2000, Biers *et al.* 2009). Allant dans ce sens, en 2010, le génome du

³⁷ **Phytoplancton** : ensemble des organismes, procaryotes et eucaryotes uni- et pluricellulaires, pratiquant la photosynthèse et dont la mobilité ne permet pas de s'affranchir des courants,

³⁸ **Copiotrophes** : métabolisme permettant une reproduction optimale à forte concentration de nutriments.

premier représentant cultivé de ce groupe a été publié (Oh *et al.* 2010) et la présence de nombreuses voies métaboliques laisse penser que ce groupe pourrait être généraliste et participer à de multiples cycles biogéochimiques dans les océans.

De nombreux groupes de *Gammaproteobacteria* marines sont actuellement cultivés (Fuhrman et Hagström 2008) dont les plus connus sont les *Vibrionaceae* et les *Alteromonadaceae*. Ces groupes ont la capacité de se reproduire très vite et en très fortes abondances (fortes efflorescences) ainsi que de résister aux périodes de famines (mode de vie « *feast and famine* »), expliquant la facilité à les cultiver mais aussi leur succès écologique. De nombreux représentants cultivés vivent en interaction avec d'autres organismes parfois de manière pathogène et la plupart des membres cultivés sont connus pour vivre en mode agrégé à des surfaces en milieu marin. Du fait de leur facilité à être cultivé, l'abondance des *Gammaproteobacteria* marines cultivables a été longtemps surestimée dans les études en environnements marins (Giovannoni et Rappé 2000). Dans les données du GOS, les *Gammaproteobacteria* marines représentent globalement 17,3 % des séquences totales d'ARNr 16S (21,2 % en océan hauturier, 14 % en océan côtier et 4,9 % en estuaires ; Biers *et al.* (2009)), dans les données de l'ICoMM elles représentent globalement $25 \pm 14,6$ % (Zinger *et al.* 2011). Dans les années 1990, sur la base des études basées sur l'ARNr 16S, il a été déterminé que d'autres groupes, très abondants, de *Gammaproteobacteria* existaient en mer (Britschgi et Giovannoni 1991, Schmidt *et al.* 1991). En 1995, Mullins *et al.* (1995) créent, le vaste groupe de *Gammaproteobacteria* marines SAR86 (voir par exemple la Figure 5), et les études suivantes vont trouver des membres de ce groupe dans de très nombreux environnements répartis mondialement dans l'océan de surface (González *et al.* 2000, Morris *et al.* 2005, Malmström *et al.* 2007). Ce groupe apparaît alors comme ubiquiste, toutefois, des études ultérieures ont montré qu'il était en réalité, à l'instar de SAR11, constitué de nombreux sous-clades (Treusch *et al.* 2009). L'analyse couplée de fragments métagénomiques issus du GOS et de séquençage de cellule unique (méthode « *single-cell genomics* » générant après WGA³⁹ des « *single-cell amplified genome* » ou SAG) a permis la reconstitution de génomes partiels de membres des SAR86 montrant le même processus de réduction du génome que chez SAR11 avec probablement les mêmes implications écologiques et les mêmes préférences oligotrophes bien que les sources carbonées diffèrent dans le menu de ces deux

³⁹ WGA : *Whole genome amplification*, technique dérivée de la PCR permettant de générer de multiples copies du génome entier d'un organisme afin de permettre son séquençage

groupes (Dupont *et al.* 2012, Molloy 2012). Dans le métagénome de la mer des Sargasses, les membres des SAR86 comptent pour environ 10 % des séquences totales d'ARNr 16S (Giovannoni et Stingl 2005) et pour 6,3 % avec un maximum de 7,4 % en habitat côtier dans les données du GOS (Biers *et al.* 2009). D'autres groupes oligotrophes appartenant aux *Gammaproteobacteria*, appelés OMG (*oligotrophic marine Gammaproteobacteria*) ont également été mis en évidence dans les milieux océaniques côtiers et au large (Cho et Giovannoni 2004) dont le plus communément retrouvé est le clade OM60/NOR5 (Rappé *et al.* 1997). Toutefois, tout comme le groupe des SAR92 (Britschgi et Giovannoni 1991), ce groupe est le plus souvent présent en faible abondance (< 1 %) mais certains de ses membres peuvent ponctuellement dépasser les 10 % dans les zones côtières souvent lors d'augmentations brutales des ressources nutritives comme lors des efflorescences de phytoplancton (Pernthaler et Pernthaler 2005, Stingl *et al.* 2007a, Yan *et al.* 2009). Ces comportements suggèrent une écologie plus complexes que supposé initialement avec possiblement au sein de ces groupes, des clades à tendance oligotrophe et d'autres à tendance copiotrophe.

Le groupe des *Bacteroidetes*, anciennement connu comme le groupe des *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes*, est également une composante importante du bactérioplancton. Des représentants de ce groupe sont présents dans tous les habitats de la biosphère. Ce groupe peut atteindre près de la moitié des *Bacteria* comptées par FISH en milieu océanique et être très abondant en eau douce (Kirchman 2002). Toutefois, les contributions à la communauté bactérienne obtenues par FISH et par d'autres techniques moléculaires (comme les banques de clones) diffèrent très souvent et l'importance numérique de ce phylum est encore sujette à débat. Il est en revanche à noter que dans l'étude globale des océans côtiers de Pommier *et al.* (2007), ce groupe représente le plus souvent le troisième groupe le plus abondant dans les banques de clones après les *Alphaproteobacteria* et les *Gammaproteobacteria* qu'il les domine dans de nombreux environnements (principalement dans l'hémisphère sud). Dans les données de pyroséquençage, les séquences flavobactériennes représentent 17 ± 12.5 % des séquences totales d'ARNr 16S retrouvées en milieu côtier dans l'ICoMM (Zinger *et al.* 2011), 8% en milieu côtier, 7,3 % en milieu estuarien et 3,3 % au large dans les données du GOS (Biers *et al.* 2009). Les clades marins des *Flavobacteriaceae* sont d'une nature épiphyte avec une grande capacité de colonisation des surfaces inertes et vivantes (Bowman 2006), avec un fort taux de croissance, pouvant en faire des composants importants du bactérioplancton (jusqu'à plus de 70%) associé aux efflorescences algales (Glöckner *et al.* 1999, Riemann *et*

al. 2000, Fandino *et al.* 2005). Comme pour les *Gammaproteobacteria* marines cultivées ou les *Rhodobacterales*, ces capacités font que ce groupe est particulièrement bien représenté en nombre de cultures actuellement disponibles (Bowman 2006). Cependant, il semble également que des groupes d'incultivés, comme celui des AGG58 (DeLong *et al.* 1993, O'Sullivan *et al.* 2004), existent également mais très peu représentés dans les banques de clones possiblement dû aux biais de PCR défavorisant les *Bacteroidetes*.

Le groupe des *Cyanobacteria*, bien que n'étant pas systématiquement parmi les plus abondant membres de bactérioplancton, est toutefois probablement l'un des plus extensivement étudié et des mieux compris dans son écologie et sa génétique. Les données de l'ICoMM (Zinger *et al.* 2011) montrent que les séquences de ce groupe sont plus présentes dans les eaux de surface hauturières ($13 \pm 11,1$ %) que côtières ($3 \pm 7,4$ %), en revanche les séquences du GOS (Biers *et al.* 2009) ne présentent pas un contraste si marqué avec respectivement 6,7 % et 5,3 %. Cependant, ce groupe est commun dans tous les océans et représente souvent les organismes les plus abondants du phytoplancton. Les plus abondants genres des *Cyanobacteria* dans les systèmes océaniques sont les *Prochlorococcus* et *Synechococcus*, et plus ponctuellement les *Trichodesmium*, genre à efflorescences. Ces genres sont principalement présents dans les zones oligotrophes pour les premiers et les zones plus riches ou dans les environnements changeants pour les seconds. Principalement contraint par la température, la distribution du plus abondant de ces organismes, *Prochlorococcus*, est limité à la zone comprise entre 40° Sud et 48° Nord (Partensky *et al.* 1999b, Johnson *et al.* 2006). Bien que ce genre puisse être encore détectable en très faible abondance en zone subpolaire (Marchant *et al.* 1987, Buck *et al.* 1996), il est considéré comme absent des eaux polaires. En revanche, *Synechococcus* a, quant à lui, une distribution virtuellement ubiquiste même si son abondance varie grandement entre les régions océaniques (Partensky *et al.* 1999a). Du fait de leur dépendance vis-à-vis de la lumière, ces groupes sont présents uniquement dans la zone euphotique et tout comme SAR11 ou SAR86, présentent des sous-clades de distribution différente que ce soit en fonction de la luminosité présente pour *Prochlorococcus* ou de la province océanique et de son régime trophique pour *Synechococcus* (Zwirgmaier *et al.* 2008). Les *Cyanobacteria* en général sont de très importantes actrices dans les cycles biogéochimiques (Li 1994, Scanlan et West 2002) par leur forte contribution à la production primaire globale mais également, entre autre, par leur capacité unique à fixer le diazote inerte contenu dans l'atmosphère.

Nombreux d'autres groupes de bactéries marines sont encore mal connus. Parmi eux, un des plus représentatifs est celui des *Betaproteobacteria* marines qui comprendrait de nombreux genres (au moins 75 genres et 220 espèces connus en 2006) avec des métabolismes variés et une présence globale (Kersters *et al.* 2006). Un grand clade incultivé de clones environnementaux a été retrouvé dans de nombreuses études en milieu marin et forme le clade OM43 (Rappé *et al.* 1997, Uphoff *et al.* 2001, Connon et Giovannoni 2002). Ce dernier peut représenter un groupe dominant lors d'efflorescences de diatomées (Morris *et al.* 2006). Même s'il semble être réparti en milieu côtier (Rappé *et al.* 2000, Riemann *et al.* 2008), son écologie reste encore mal comprise, notamment avec la découverte de sa présence dans les eaux profondes du bassin arctique eurasiatique (Galand *et al.* 2010).

1.3.4. *Structure des communautés bactériennes marines*

Une des grandes questions cristallisant l'attention des microbiologistes environnementaux, particulièrement en milieu marin, est la réalité du dogme énoncé en 1934 par Baas-Becking et Beijerinck : « *Everything is everywhere, but, the environment selects* » (*Tout est partout mais l'environnement sélectionne* ; voir revue de De Wit et Bouvier (2006)). Les études de la diversité bactérienne dans l'océan global, par clonage-séquençage (Pommier *et al.* 2007) ou par pyroséquençage (Venter *et al.* 2004, Rusch *et al.* 2007, Yooseph *et al.* 2007, 2010, Zinger *et al.* 2011), ont mis en évidence la présence d'un petit nombre d'espèces cosmopolites (*c.-à-d.* retrouvées dans tous les échantillons) très abondantes, distribuées suivant un modèle log-normale (Curtis *et al.* 2002). Toutefois la grande majorité des espèces est endémique, chaque espèce étant le plus souvent de faible abondance, elles forment une longue queue suivant une distribution log-series (Galand *et al.* 2009a) et constituent la majorité de la biodiversité (Figure 9). Cette vue n'est pas forcément incompatible avec l'idée de Baas-Becking puisque ce dernier avait émis l'idée que la distribution des microbes était mondiale mais que dans certains environnements les espèces microbiennes n'étaient présentes que sous forme quiescente. La plupart de la biodiversité microbienne restant ainsi hors de notre portée car les densités des espèces en dormance⁴⁰ sont si basses qu'elles seraient en dessous de la limite de détection des techniques utilisées. Dans cette idée, en comparant un

⁴⁰ **Dormance ou quiescence** : état de vie au ralenti permettant aux organismes de survivre à des conditions environnementales défavorables, chez les bactéries peut s'accompagner d'une structure particulièrement résistante et compacte appelée endospore représentant à la fois une forme de résistance et une forme de dissémination.

pyroséquençage très profond (c.-à-d. un très grand nombre de séquences ~10 millions) d'un site en Manche avec les nombreux pyroséquençages moins profonds de l'ICoMM, Gibbons *et al.* (2013) appuient que la profondeur de séquençage influe énormément sur le nombre d'OTU retrouvées dans tous les environnements marins. Ainsi ils extrapolent que pour retrouver en Manche, l'ensemble des OTUs présents dans l'ICoMM (échantillonnant une grande diversité de biomes) il faudrait obtenir près de 200 milliards de séquences nécessitant la filtration de plus de 200 litres d'eau (alors qu'environ 2L sont filtrés actuellement). Le concept de « *seed bank* » actuel, « banque de graines » constituée par les espèces bactériennes rares (dont l'occurrence est très faible et qui ne se divisent pas ou très peu) rejoint cette idée. Selon Pedrós-Alió (2006), les taxons les plus abondants forment le cœur de la biodiversité d'un écosystème, ils se multiplient activement car ils sont « adaptés » à cet environnement et, du fait de la large taille de leur population, sont soumis aux pressions de prédation par les protistes et d'infection par les virus (Figure 9). Ainsi ils sont les principaux acteurs des flux de carbone et d'énergie.

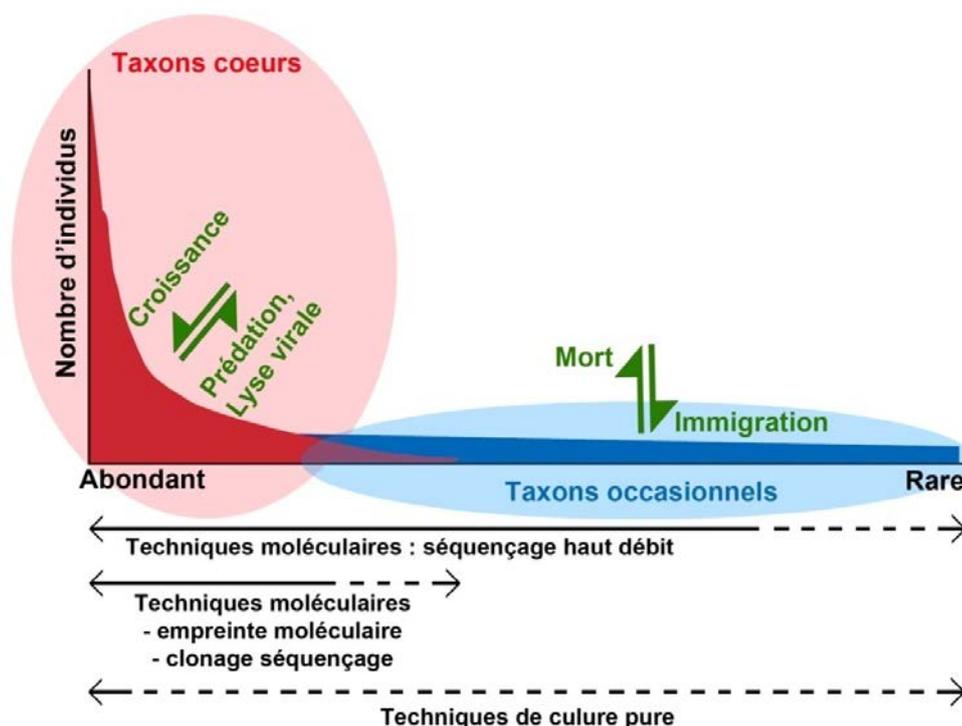


Figure 9. Schéma conceptuel de la biodiversité des taxons bactériens (i) abondants (en rouge) ayant un rôle actif dans les flux de carbone et d'énergie et formant le cœur de la diversité d'un écosystème, (ii) rares (en bleu) survivant à faible abondance dans un écosystème et pouvant être sous forme d'endospore (*seed bank*), et des processus biotiques la contrôlant selon la théorie cosmopolite (en vert). En bas, les limites de la biodiversité accessibles par les diverses techniques de microbiologie environnementale actuelles (voir § 1.3.1 et 1.1.3). Modifié d'après Pedrós-Alió (2006).

Les taxons peu abondants (donc rares car la probabilité de les échantillonner est faible) formant une longue queue (vue dans ce cas comme « *seed bank* ») sont plus occasionnels, avec une présence sporadique dépendant des limites de leur tolérance. Ces taxons sont recrutés par immigration, résultant des processus de dispersion physique, et se multiplient peu (voire pas). Leur faible abondance leur permet de se soustraire de la prédation et de l'infection car les bactérivores se nourrissent préférentiellement des plus abondantes (Pernthaler 2005) et les virus fonctionneraient selon la stratégie de « tuer le gagnant » (Thingstad 2000), c.-à-d. qu'ils sont dépendants des probabilités de rencontre de leur(s) hôte(s) et vont préférentiellement contaminer les organismes les plus abondants plutôt que les plus rares. Si, contrairement aux taxons cœurs, les taxons rares sont affranchis du contrôle « *top-down* » (prédation, infection), ils sont en revanche soumis au même contrôle par la ressource (« *bottom-up* ») et doivent être plus sensibles aux contrôles « latéraux » (« *sideways* » (Fuhrman et Hagström 2008)) c.-à-d. la compétition pour la ressource, les interactions négatives ou positives entre bactéries comme l'émission de composés chimiques néfastes (allélopathie) ou la coopération pour utiliser une ressource (syntrophie, symbiose).

Nuançant cette vue mais restant dans la théorie cosmopolite, Yooseph *et al.* (2010), sur la base des théories de Lauro *et al.* (2009), ont montré grâce aux métagénomes issus du GOS et aux génomes de plus d'une centaine d'isolats marins, des différences marquantes de capacités métaboliques et physiologiques entre les taxons abondants et les rares. Les taxons abondants et cosmopolites sont caractérisés par des génomes de petites tailles et un contenu génique suggérant qu'ils sont uniquement capables d'une croissance lente et d'une faible plasticité métabolique. Ces organismes seraient des oligotrophes car leurs traits seraient une adaptation à un environnement pauvre en nutriments. Inversement, les taxons plus rares seraient copiotrophes et auraient des capacités à survivre dans les environnements limités en énergie et à fortement croître occasionnellement quand les conditions nutritionnelles correspondent à leurs préférences (espèces capables d'efflorescences en milieu riche). Cette stratégie adoptée par les copiotrophes dans les océans leur permettrait d'échapper à la prédation (du moins spécifique) en devenant invisible comme source de nourriture potentielle par leurs faibles abondances et leurs volumes alors réduits. Ce concept écologique a été appelé par les auteurs la « fuite cryptique » (« *Cryptic escape* ») et compléterait les concepts de stratégies *r* et *K* (voir § 1.1.3).

Toutefois, en examinant par pyroséquençage plusieurs sites de l'océan arctique et à plusieurs saisons, Galand *et al.* (2009a) montrent que les taxons rares ont les mêmes patrons de distributions biogéographiques que les taxons abondants, suggérant qu'au moins un des deux postulats de la théorie cosmopolite n'est pas valide : soit les micro-organismes marins ne sont pas aussi facilement dispersés et des barrières à la dispersion existent ^{et/ou} les taux de mortalité (par prédation ou lyse virale) des taxons rares sont significatifs. De plus, tout comme Kirchman *et al.* (2010), ils montrent que la très grande majorité (99 %) des taxons rares n'est jamais retrouvée abondante, ni à d'autres saisons, ni dans d'autres écosystèmes échantillonnés lors d'autres études. Nombreux rares demeurent rares et ne se comportent pas comme une source potentielle d'abondants (« *seed bank* »). Ces auteurs avancent aussi que les rares sont tout aussi adaptés à leur environnement que les abondants et sont également importants pour les cycles biogéochimiques en réalisant des fonctions particulières. De plus, dans une autre étude conduite elle aussi en arctique, ces auteurs montrent une différence de populations entre les eaux profondes du bassin arctique canadien et eurasiatique alors qu'aucun paramètre chimique structurant n'ait pu être identifié, ce qui renforcerait le concept de « barrière physique à la dispersion » (Galand *et al.* 2010). Ce concept, proposé par Spencer-Cervato et Thierstein (1997), repose sur le principe que les densités spécifiques de chaque masse d'eau constituent une frontière bloquant la dispersion des micro-organismes pas assez mobiles pour la franchir. Dès lors, les communautés se structurent en suivant les forces évolutives en présence. Toutefois des événements de mélange des communautés pourraient survenir lors de mélange de masses d'eau ou par des éléments capables de franchir ces barrières physiques comme par exemple les particules lourdes de neige marine. La biogéographie et la structuration des communautés étant alors guidées par des interactions complexes entre les communautés autochtones⁴¹ et allochtones⁴² de la masse d'eau considérée et les forces sélectives en présence déterminant notamment le maintien et le succès d'une population ainsi que les processus génétiques/génomiques éventuels que cela entraîne (jouant sur les concepts de compétition ainsi que de fluctuation et de perturbation des communautés).

⁴¹ **Autochtone** : qui habite en son lieu d'origine

⁴² **Allochtone** : qui est étrangé au lieu considéré

1.4. « Dis-moi ce que tu manges... »

1.4.1. *Écotypes, niches écologiques et diversité fonctionnelle*

Le débat sur la biogéographie des organismes vivants a toujours partagé la communauté des écologues quel que soit le modèle d'étude et fut le moteur de nombreuses formulations de théories et concepts écologiques pour expliquer la structuration et la diversité des communautés notamment d'un point de vue évolutif. Un des premiers concepts fondamentaux est celui de la niche écologique, idée émise dès les débuts de la vision évolutionniste (Darwin) mais formellement décrit qu'en 1957 par Hutchinson, qui correspond à un espace multidimensionnel rassemblant la totalité des relations d'un organisme avec son environnement physico-chimique (environnement abiotique, habitat) et les autres organismes le partageant (environnement biotique). La niche écologique correspond donc aux capacités (traits écologiques) de l'espèce considérée en termes d'interactions biotiques et abiotiques mais il faut différencier la niche fondamentale, correspondant à la niche qu'une espèce peut théoriquement occuper, de la niche réalisée c.-à-d. qu'une espèce occupe réellement. En effet, deux espèces ne peuvent occuper simultanément la même niche écologique et si ces niches se recouvrent complètement ou même partiellement, c.-à-d. quand deux espèces cherchent à accéder à une même ressource pouvant être limitante, un phénomène de compétition s'engagera entre les espèces et leurs niches respectives auront tendance à se modifier (voire à s'exclure) en même temps que les traits écologiques des espèces. Ces traits étant également soumis à sélection naturelle, des événements de spéciation⁴³ peuvent se produire. Les deux mécanismes extrêmes de spéciation sont l'allopatrie, résultant d'un complet isolement géographique de 2 populations sans échanges génétiques possibles (mais sans forcément de différenciation de niche), et la sympatrie, se produisant en coexistence et résultant d'une compétition intra-spécifique disruptive conduisant à une différenciation de niche écologique.

Comme discuté par Pedrós-Alió (2006) et Galand *et al.* (2009a), savoir en quelle propension chacun de ces modèles (allopatrie et sympatrie) influe sur la distribution des communautés microbiennes marines (§ 1.3.4) permettrait d'apporter plus de poids à l'une ou l'autre des théories de distribution des microbes dans l'océan (dispersion ubiquiste ou limité par des barrières). En effet, la sympatrie pourrait s'appliquer si la diversité microbienne est

⁴³ **Spéciation** : phénomène conduisant à la création d'espèces à partir d'une espèce ancêtre commun

façonnée par la présence de multiples habitats (différentes conditions environnementales) au sein de la même province. Dans ce cas, chaque masse d'eau pourrait représenter un habitat spécifique et les différences de compositions des communautés entre elles seraient le reflet des différences des conditions environnementales entre les masses d'eau. A l'inverse, l'allopatrie pourrait entrer en scène si on considère que les communautés ont été historiquement isolées par les masses d'eau et que le manque de dispersion entre elles fait que chaque masse d'eau pourrait être considérée comme une province avec sa communauté qui évolue en fonction de son historique. Avec cette vue, il y aurait de multiples provinces mais un seul habitat.

A très fine échelle, l'analyse de la diversité des groupes dominants (§ 1.3.3) nous a montré l'existence de nombreux sous-clades, au sein d'une même espèce, phénomène notamment observable fréquemment chez les espèces oligotrophes et dont la distribution est souvent reliée à la variation d'un paramètre environnemental. Des observations similaires faites en système terrestre sur des espèces de *Plantae* ont notamment conduit à l'émergence du concept d'écotype par Gote Turesson en 1922. Les écotypes peuvent être définis comme des populations génétiquement différenciées au sein d'une même espèce, occupant des habitats spécifiques (c.-à-d. adaptées à des conditions environnementales spécifiques) et exprimant le plus souvent des différences phénotypiques. Autrement dit, ce sont des populations avec des caractères communs mais occupant des niches uniques (Cohan 2002). Ce concept, tout à fait applicable aux microbes marins, exacerbe le décalage entre les définitions moléculaires d'espèce bactérienne et la réalité de leur écologie et de leur fonction au sein d'un écosystème. En particulier, la classification de la diversité bactérienne a conduit à considérer l'évolution des organismes uniquement sur la base de leurs attributs (physiologique ou génétique) et n'a apporté que peu d'attention à leurs adaptations à des contextes environnementaux spécifiques ou même à leur activité. Ainsi, si la diversité a longtemps été considérée uniquement sous son aspect taxinomique/phylogénétique, la prise en compte que les espèces présentes et la fonction de l'écosystème étaient impactés par les traits écologiques des espèces présentes, a conduit à l'émergence du concept d'une diversité fonctionnelle. Cette diversité représente la diversité des traits écologiques mais également la diversité des niches et des fonctions des espèces présentes dans un écosystème. Elle permet ainsi de comprendre comment la richesse spécifique (nombre d'espèces) ou la diversité phylogénétique sont liées à la fonction d'un écosystème et comment ces derniers répondent aux stress environnementaux et aux perturbations (Cadotte *et al.* (2011) et les références

citées). Un des aspects de l'étude de la diversité fonctionnelle est le suivi d'une fonction particulière dans un écosystème étant couverte par de multiples espèces et dépendant également du degré de similarité des niches. Ainsi les microorganismes ne sont plus classés selon leur relation de parenté mais selon l'évolution d'une fonction (relation de parenté d'un ou de gène(s) codant pour une structure impliquée dans une fonction) souvent liée à leur métabolisme.

1.4.2. *Métabolismes, flux d'énergie et de matière*

Le métabolisme est la somme des réactions chimiques se produisant dans une cellule et peut être divisé en deux parties : le catabolisme, regroupant les réactions produisant (ou ne consommant pas) de l'énergie sous forme de molécules d'ATP (adénosine triphosphate), et l'anabolisme, ensemble de réactions permettant la synthèse de molécules complexes à partir de molécules simples (Figure 10). Les processus anaboliques nécessitent de l'énergie au même titre que du pouvoir réducteur qui fournit les électrons nécessaires au processus réducteur permettant l'assemblage des molécules de base en molécules plus complexes. Ils se déroulant en 4 grandes phases :

1. La conversion de la source de carbone de l'organisme en un certain nombre de molécules simples : les métabolites précurseurs,
2. La synthèse de monomères et autres unités de base de construction (comme les acides aminés, les nucléotides, les hydrates de carbone et lipides simples),
3. La synthèse de macromolécules (comme les protéines, les acides nucléiques (ADN, ARN), les hydrates de carbone et lipides complexes)
4. L'assemblage des macromolécules pour former les structures cellulaires.

Toute réaction physique ou chimique est le résultat de l'application ou du mouvement généré par l'énergie. L'énergie est la base de toute vie et peut être utilisée globalement pour 3 types essentiels de tâches communes à tous les organismes vivants :

- Les processus chimiques permettant la synthèse de molécules biologiques complexes à partir de molécules ou de constituants simples (anabolisme). Augmenter la complexité de molécules (ou de structures) demande nécessairement de l'énergie (permettant d'aller contre l'entropie).
- Les processus de transport permettant l'incorporation de certaines molécules, nécessaire par exemple pour la nutrition ou le maintien cellulaire, et l'excrétion des déchets.

Traverser la paroi cellulaire, le plus souvent contre le gradient électrochimique nécessaire à l'intégrité cellulaire demande de l'énergie (sous différentes formes),

- Les processus mécaniques permettant la motilité et l'arrangement des structures internes des cellules.

Ainsi, tous les organismes vivants nécessitent de l'énergie pour vivre mais plusieurs réponses pour son approvisionnement (nutrition) sont apparues au cours du temps. Tous les métabolismes se répartissent en 5 types nutritionnels majeurs en fonction de leurs sources de carbone (principalement), d'énergie et d'électrons. Sur la base de la source de carbone, les organismes peuvent être ségrégués en 2 modes métaboliques radicalement opposés : les autotrophes utilisant du carbone minéral (dioxyde de carbone, CO₂), et les hétérotrophes utilisant du carbone organique. Les premiers sont considérés comme des producteurs primaires par leur capacité à fabriquer de la matière organique à partir de matière minérale et les seconds sont considérés comme des producteurs secondaires car ils nécessitent de la matière organique pour vivre, donc dépendent des producteurs primaires. Par leurs activités, ils reminéralisent (régèrent) la matière organique. Ces deux modes métaboliques se diversifient en fonction des sources d'énergie et d'électrons (Figure 11). Les autotrophes utilisent tous des molécules inorganiques comme sources d'électrons (lithotrophes) mais 2 principales sources d'énergie existent. La plus courante est l'énergie lumineuse (phototrophes ; c'est le cas pour les *Plantae* et le phytoplancton ou les bactéries pourpres).

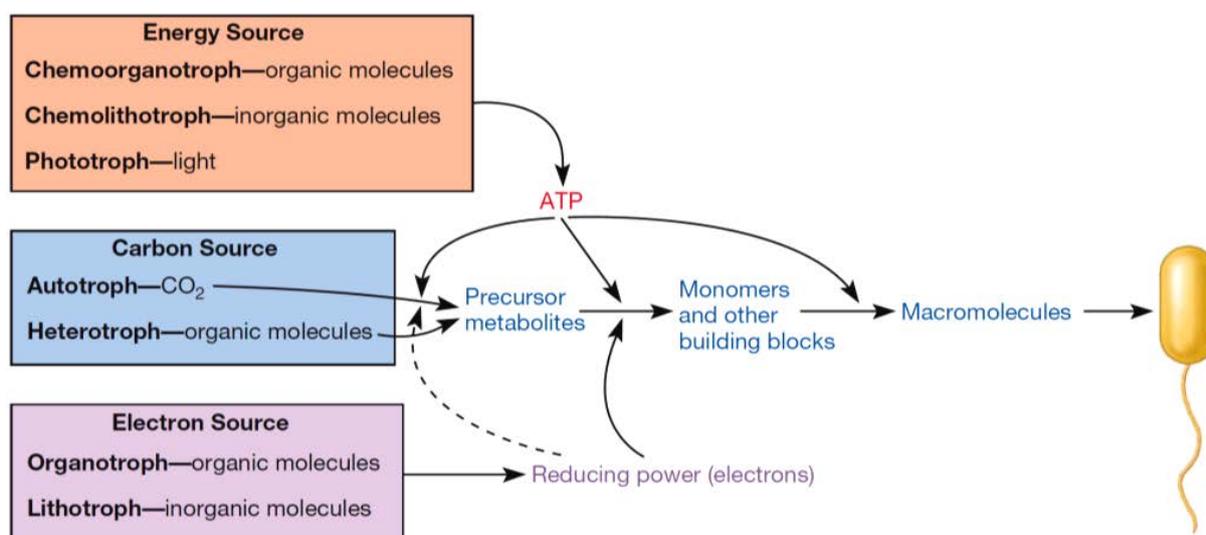


Figure 10. Vue globale du métabolisme. Les organismes sont composés de diverses macromolécules comme les acides nucléiques ou les protéines. La synthèse des macromolécules se fait à partir de monomères et d'autres facteurs comme les nucléotides et acides aminés qui sont les produits de voies métaboliques (enchaînement de réaction biochimiques) commençant avec des métaboliques précurseurs comme le pyruvate. D'après Wiley *et al.* (2008b).

Quand l'eau (H₂O) est utilisée comme donneur d'électrons (*Plantae*, phytoplancton) de l'oxygène (O₂) est dégagé, on parle alors de photosynthèse oxygénique mais certaines bactéries n'utilisent pas l'eau et ne produisent pas d'oxygène, on parle alors de photosynthèse anoxygénique. La génération d'énergie sous forme d'ATP par l'utilisation de l'énergie lumineuse est appelée photophosphorylation. La deuxième forme d'autotrophie utilise l'énergie générée par l'oxydation de composés chimiques inorganiques, c'est la chimiolithoautotrophie. Elle peut être rencontrée notamment en systèmes profonds ou sédimenteux, et regroupe des types bactériens aux métabolismes particuliers tels que les bactéries sulfo-oxydantes, hydrogène-oxydantes, ferro-oxydantes, méthanogènes et nitrifiantes. Les hétérotrophes utilisent des molécules organiques comme donneurs d'électrons (organotrophes) mais chez certains chimiohétérotrophes (des sulfo-oxydantes) le CO₂ peut également être utilisé ponctuellement (chimiolithohétérotrophes). Cependant tous les hétérotrophes utilisent principalement l'énergie chimique générée par la réduction des composés organiques. Certains groupes d'hétérotrophes ont la capacité d'utiliser en supplément l'énergie lumineuse (photo[organo]hétérotrophes). Tout comme pour les autotrophes, une part de l'énergie résiduelle est transmise au milieu par la chaleur générée.

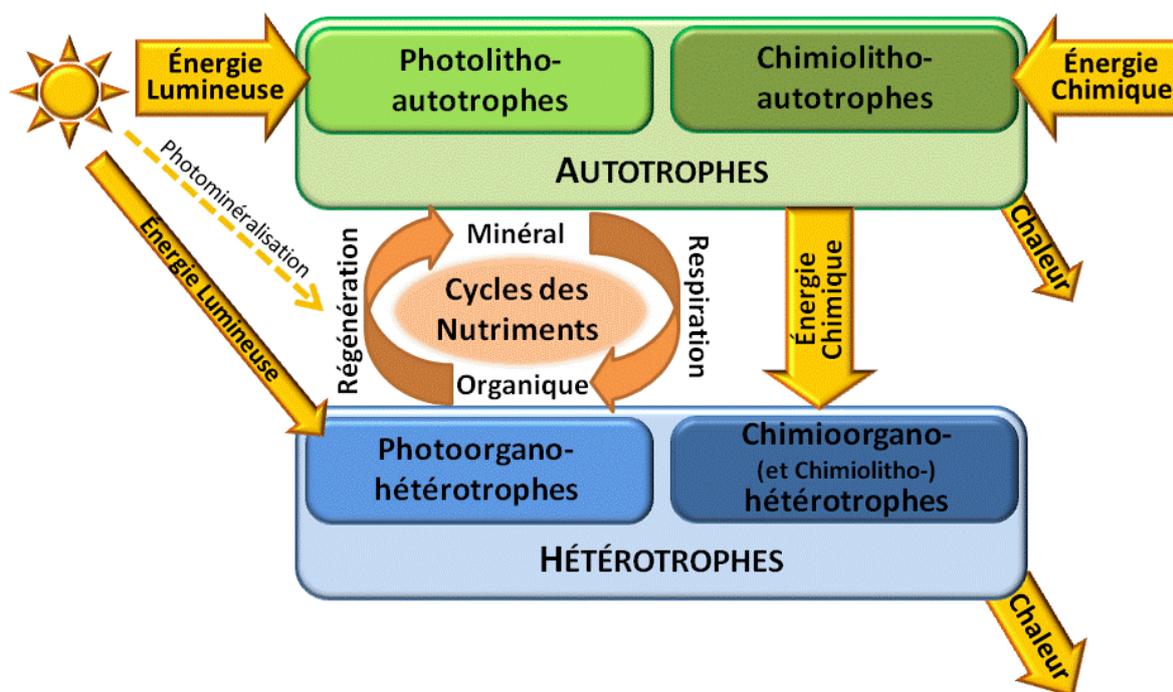


Figure 11. Sources et flux unidirectionnel d'énergie (en jaune) et cyclique de matière (en orange), parmi les métabolismes existants (en vert : les autotrophes, en bleu : les hétérotrophes). Modifié d'après Church (2008).

Si le flux global d'énergie au travers des organismes est unidirectionnel, les flux de matières est cyclique comme décrit précédemment. Le cycle des nutriments passant successivement d'un état minéral à un état organique n'est pas seulement restreint à celui du carbone, bien que ce soit le cycle majeur, mais s'applique à tous les éléments chimiques utilisables par les organismes. Ainsi les cycles biogéochimiques majeurs régis en partie par les organismes vivants sont ceux de l'azote, du phosphore et de l'oxygène, peuvent y être ajoutés celui du soufre, du fer, du manganèse et de la silice.

1.4.3. *Cycle du carbone et réseau trophique microbien*

Le composé carboné biodisponible le plus abondant sur Terre est le gaz CO₂. Il est fixé, c.-à-d. transformé en matière organique, par les organismes photolithotrophes et chimiolithotrophes en conditions aérobies (le plus commun en milieu marin) et anaérobies (dans les sédiments, au sein de particules, consortium ou de biofilms) (Figure 12). La matière organique est transformée en CO₂ par les mécanismes de respiration⁴⁴ aérobie ou anaérobie de même que la fermentation (anaérobie) chez les organismes hétérotrophes. Le CO₂ peut alternativement (au même titre que la matière organique), en anaérobiose, être transformé par les organismes méthanogènes en méthane (CH₄), un autre gaz abondant, qui peut être ré-oxydé en CO₂ de manière aérobie par les organismes méthanotrophes. Bien entendu, la Figure 12 correspond à un schéma très simplifié du cycle du carbone dans l'environnement. Pour une fonction donnée (fixation du carbone par exemple), les organismes la réalisant sont multiples, diversifiés et de taille différentes (de la cyanobactérie du micromètre à l'arbre de plusieurs dizaine de mètres par exemple) et les produits de la fonction, et leur biodisponibilité, sont variables (des glucides simples à la cellulose par exemple). Les organismes capables d'utiliser ces produits ou de les ingérer vont également différer (d'une bactérie hétérotrophe à l'homme par exemple). Cette évidence est à la base du concept de réseau trophique, c.-à-d. les flux de matières et d'énergie entre tous les organismes composant un écosystème, qu'ils soient producteurs primaires, secondaires (consommateurs) ou décomposeurs.

⁴⁴ **Respiration** : processus catabolique de dégradation des sucres (notamment) grâce au dioxygène afin d'en obtenir de l'énergie sous forme d'ATP

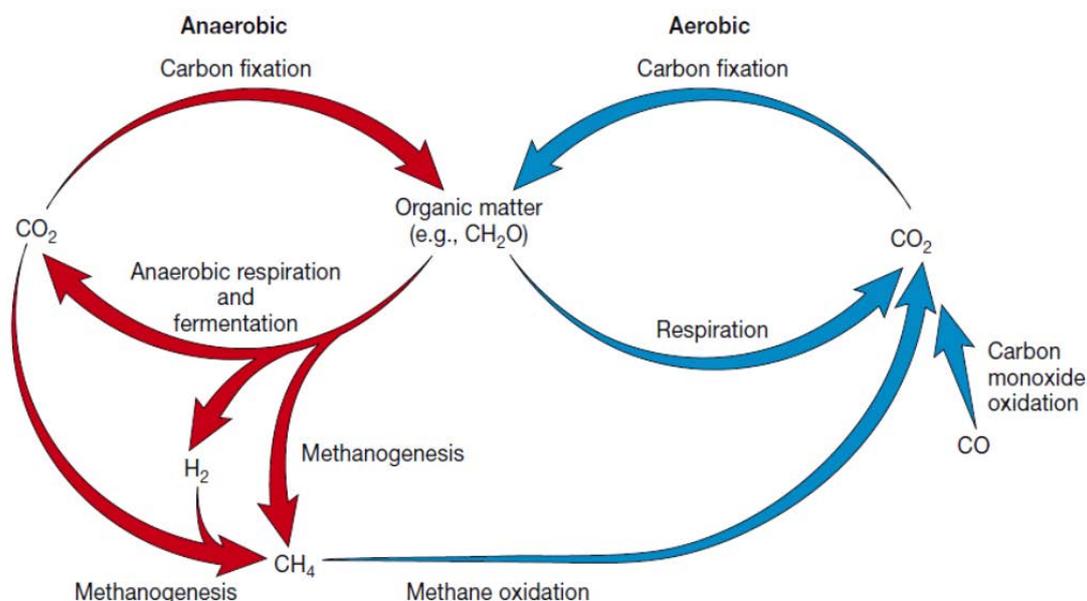


Figure 12. Cycle simplifié du carbone dans l'environnement. En bleu, les processus se déroulant en présence d'oxygène (aérobie) ; en rouge, les processus restreints aux zones dépourvues d'oxygène (anaérobie). D'après Wiley *et al.* (2008a).

Déjà pressenti en 1946 par Zobell (Figure 13, gauche) et se renforçant avec la découverte de l'importance numérique des microbes en milieu marin (§1.3.2), avec l'évolution des techniques permettant d'estimer les taux de croissance et de renouvellement (notamment les radiotraceurs (Steemann-Nielsen 1952, Karl 1979, Fuhrman et Azam 1982)), la place des *Bacteria* a évolué d'un compartiment mineur de la chaîne alimentaire⁴⁵ à un rôle crucial dans le réseau trophique⁴⁶ à la base de tout écosystème. Ce changement de vision a été fortement influencé par les travaux de Pomeroy, qui, en faisant la synthèse de nombreux travaux, a proposé que les microorganismes représentaient « *le plus gros moteur d'énergie et de matière compte-tenu de leur haut taux métabolique par unité de masse* » (Figure 13, droite). Il propose également que les microorganismes représentent la très grande majorité de la respiration dans les océans. L'évolution de la considération de la place des *Bacteria* dans les flux d'énergie et de matière au cours des années suivantes conduit à la conceptualisation de la boucle microbienne par Azam *et al.* (1983). Ce concept repose sur l'utilisation comme source d'énergie préférentielle par les bactéries pélagiques de la matière organique dissoute (MOD)

⁴⁵ **Chaîne alimentaire :** suite linéaire d'organismes liés par des relations de prédation censé représenter les relations de nutrition (et les flux de carbone et d'énergie) dans un écosystème. Dans les océans, la vue traditionnelle de la chaîne trophique est : le phytoplancton représente les producteurs primaires consommés par le zooplancton herbivore (consommateurs primaires), eux-mêmes consommés par les poissons consommateurs de plancton (consommateurs secondaires) consommés par les poissons piscivores (tertiaires).

⁴⁶ **Réseau trophique :** d'une vue réductrice peut être perçu comme un ensemble de chaînes alimentaires mais traduit plus l'ensemble des relations, parfois complexes, liant entre eux les organismes d'un écosystème.

d'origine majoritairement phytoplanctonique mais aussi zooplanctonique. Les bactéries hétérotrophes utilisant la MOD, au même titre que les *Cyanobacteria*, sont consommées par les Flagellés et le microzooplancton à leur tour consommés par du zooplancton de taille plus importantes. Le concept va se complexifier avec la découverte de nombreux processus modifiant les flux principaux décrits par Azam notamment l'absorption de MOD par certains membres des bactérivores ou la lyse virale exerçant un contrôle sur les bactéries. Ces découvertes vont conduire à une révision du concept de la boucle microbienne par Sherr et Sherr (1988) dont une version corrigée avec les données actuelles (Sherr et Sherr 2008) est représentée Figure 14 sur une vue graphique des principaux microorganismes pélagiques (Stocker 2012).

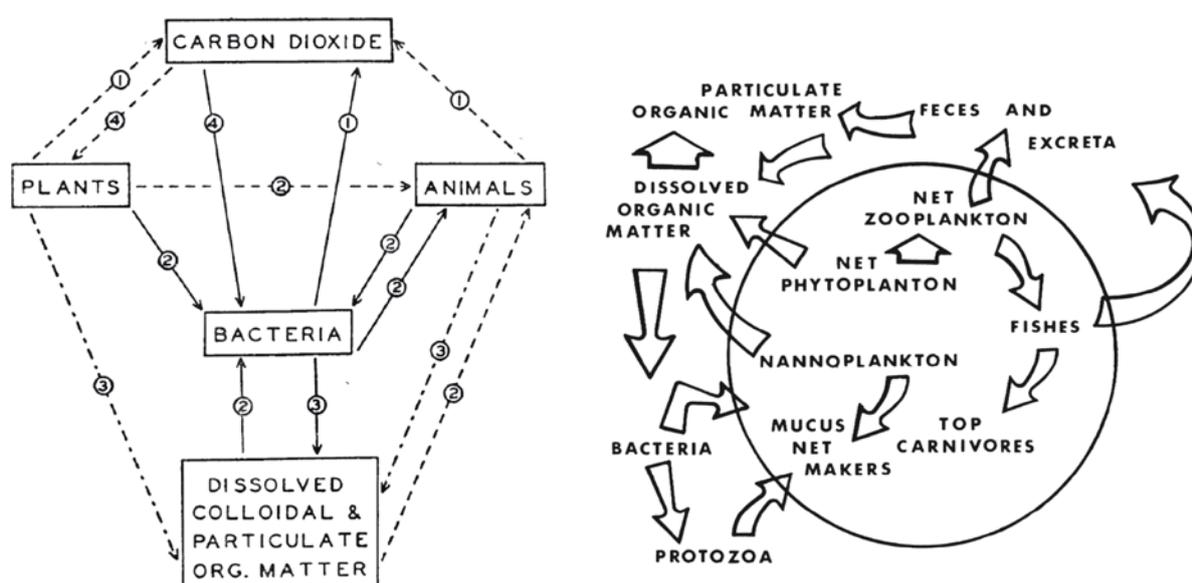


Figure 13. Evolution de la vue du réseau trophique océanique et de la place des *Bacteria*. A gauche le diagramme-cercueil de Zobell (1946), les traits pleins représentent les processus dans lesquels les *Bacteria* sont impliquées contrairement aux traits en pointillés. Les nombres correspondent à des processus biologiques spécifiques : 1 : respiration, 2 : nutrition, 3 : décomposition, 4 : fixation du CO₂. A droite le paradigme circulaire de Pomeroy (1974), dans le cercle les flèches représentent la vue classique des flux de matière et d'énergie dans le réseau trophique pélagique et à l'extérieur du cercle, les flux et les compartiments rajoutés par cet auteur parmi lesquels les *Bacteria*, comme pour le diagramme de gauche, jouent un rôle primordial.

Presque trente ans après, ce concept est encore d'actualité bien qu'il puisse souffrir de quelques insuffisances et qu'avec la complexification croissante des interactions entre microorganismes et de la diversité des métabolismes bactériens, la boucle microbienne soit actuellement plus vue comme un réseau trophique à part entière. L'insuffisance la plus criante se situe dans l'impact des virus sur les divers compartiments des réseaux trophiques. Bien que ces derniers ne constituent pas un groupe de microorganismes *sensu stricto* du fait de leur absence de métabolisme (critère pouvant définir « la vie »), ils sont ubiquistes et très

abondants en milieu marin (il est admis qu'il y a au moins 10 à 100 fois plus de virus que de bactéries) et peuvent exercer un réel contrôle du réseau trophique. En premier lieu, comme représenté dans la Figure 14, les virus bactériophages peuvent exercer un contrôle fort sur les bactéries (hétérotrophes ou autotrophes ; Suttle (2005)). Toutefois, des virus existent et infectent tous les compartiments représentés ici et par leurs actions létales libèrent ainsi directement une quantité importante (de 6 à 26 % du carbone organique fixé en milieu côtier et de 8% à 42% en milieu hauturier) carbone dissous (entre autres molécules directement utilisables) court-circuitant ainsi les flux de carbone organique (Wilhelm et Suttle 1999). Bien que ces processus puissent être sous-entendus dans les flux de mortalité de la Figure 14, l'imprécision du schéma repose ici sur l'importance des flux n'étant plus dominants dans la boucle microbienne mais dans une « boucle virale ».

Une autre imprécision est apparue avec l'exploration des relations liant microorganismes et énergie lumineuse. En particulier, la découverte que les *Cyanobacteria*, notamment les genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus*, sont responsables d'une grande part de la production primaire (Waterbury *et al.* 1979, Chisholm *et al.* 1988, 1992). Ici encore les virus peuvent jouer un rôle dans la productivité puisque de nouvelles études ont montré que certains virus cyanophages contenaient des éléments clés de la photosynthèse pouvant permettre l'augmentation du succès écologique des organismes les contenant (Mann *et al.* 2003, Lindell *et al.* 2004, 2005, Sharon *et al.* 2009). La découverte de l'existence et de l'importance d'organismes aux métabolismes hybrides entre photoautotrophie et organohétérotrophie posent également d'importantes questions sur les flux d'énergie et de carbone dans les océans tels qu'ils sont représentés dans le modèle de la boucle microbienne.

D'un point de vue global, l'activité des bactéries marines est cruciale dans le cycle du carbone planétaire. En effet, l'océan représente le plus gros stock de carbone de la planète avec près de $37,4 \cdot 10^{12}$ tonnes de CO_2 (équivalent CO_2 mais composé de CO_2 , HCO_3^- , et CO_3^{2-} formant le carbone inorganique dissout (CID)) séquestrées à très long terme, soit près de 93% du CO_2 total de la Terre (Nellemann *et al.* 2009, Jiao *et al.* 2010). Les écosystèmes marins produisent plus de matière organique que les réseaux trophiques ne peuvent utiliser et l'excès de carbone, s'agrégeant en partie en particules lourdes (MOP représentant 20 Gt C) qui chutent dans la colonne d'eau et s'accumulent lentement sur les fonds marins, c'est le

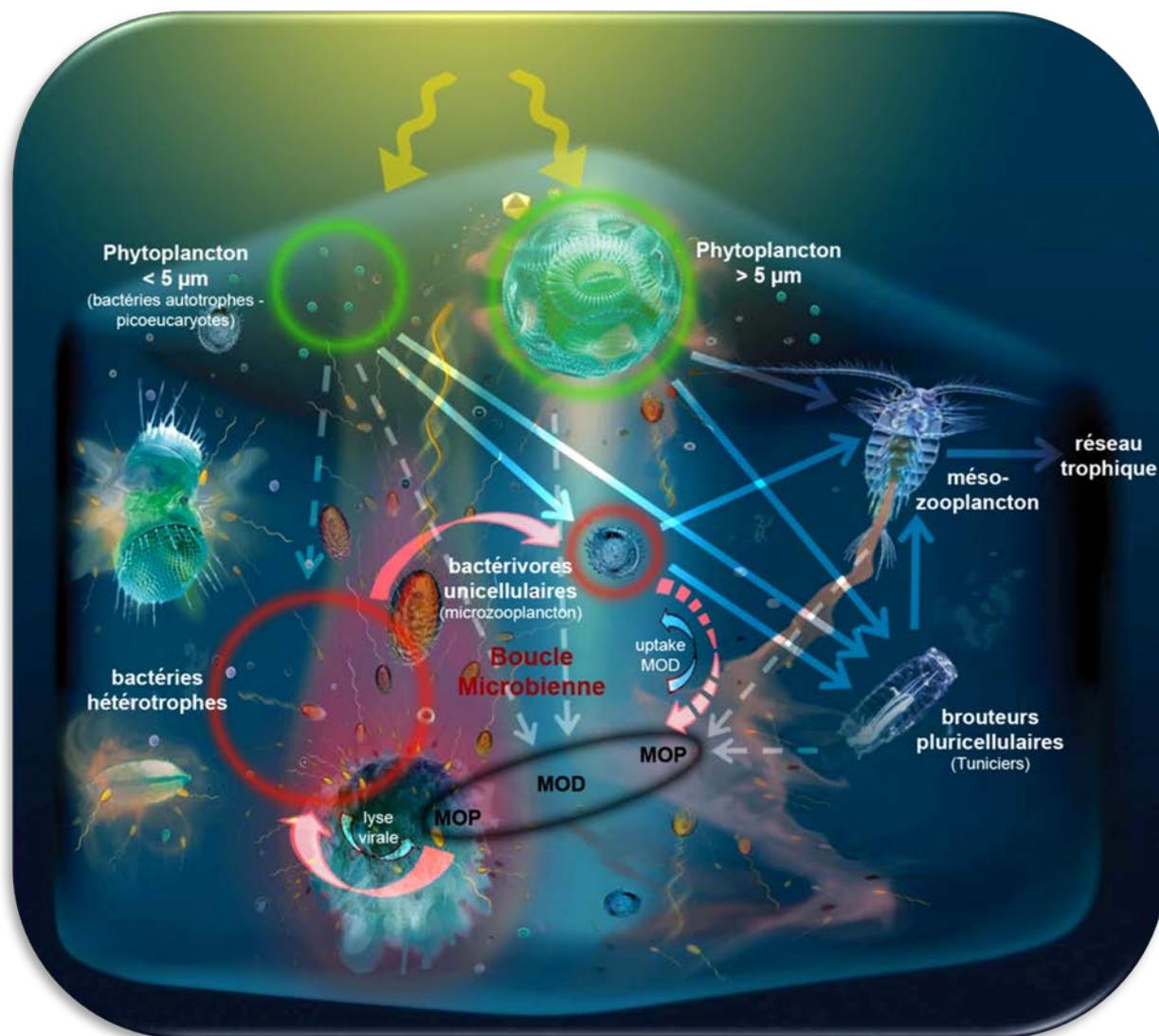


Figure 14. Concept de la boucle microbienne replacée dans le contexte du réseau trophique microplanctonique. Les flèches pleines représentent les flux de matière organique générés par consommation (prédation) et pointillées, par excrétion ou mortalité. Encadrés en vert, les organismes photoautotrophes ; en rouge la boucle microbienne avec les flux majeurs de matière organique dans la communauté microplanctonique. MOD/P : matière organique dissoute/particulaire. Les organismes présentés sont des exemples et ne sont pas à l'échelle. Modifié d'après le concept révisé de Sherr et Sherr (2008) et la représentation des microorganismes planctoniques de Stocker (2012).

processus de pompe biologique (Longhurst 1991). Bien que ce ne soit pas le seul mécanisme de séquestration du CO₂ atmosphérique, c'en est un des plus efficaces (Figure 15) permettant un stockage à long terme. La boucle microbienne permet un recyclage rapide de la matière organique, de nature très diverse (sucres, acides aminés, lipides) et labile, c.-à-d. facile à utiliser (à une vitesse de l'ordre du jour ou du mois), car elle provient majoritairement de l'excrétion du phytoplancton et du zooplancton. Toutefois, l'action de cette boucle générerait, principalement par l'action des bactéries, de la matière organique utilisable qu'à très long terme (Ogawa *et al.* 2001, Jiao *et al.* 2010) : la matière organique réfractaire (MODR). Cette

dernière compose la majorité du carbone organique dissout (COD) présent dans l'océan et représente un stockage important de carbone, équivalent à la quantité de carbone présent dans l'atmosphère sous forme de CO₂ (COD = 662 Gt C et CO₂ _{atm} = 750 Gt C), séquestré à long terme puisque son cycle n'est contrôlé que par des processus physicochimiques lents (de l'ordre de la centaine d'années voire du millénaire) comme la transformation photochimique (Jiao *et al.* 2010). Les microorganismes forment ainsi, par leur action spécifique sur le stock de COD, une pompe microbienne différenciable de la pompe biologique classique (Jiao et Azam 2011). Ces processus ont des répercussions globales puisque le CO₂ est, de par son abondance, l'un des principaux gaz à effet de serre rentrant en compte dans la régulation du climat planétaire.

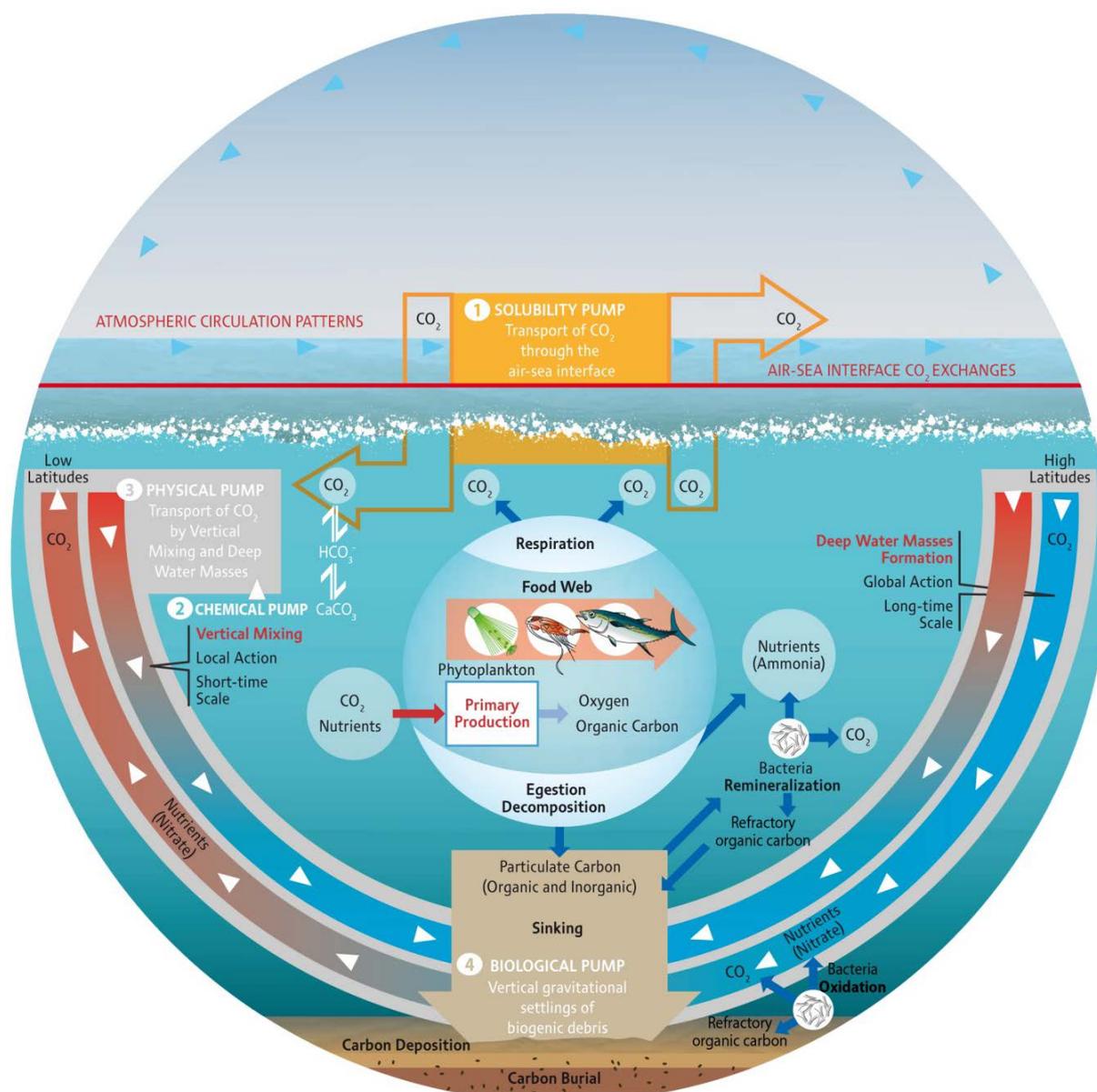


Figure 15. Cycle du carbone dans l'océan mondial présentant les principales pompes et les principaux flux de carbone. Le flux de CO_2 traversant l'interface air-mer est fonction de la solubilité du CO_2 dans l'eau de mer (1 : pompe de solubilité). Cette solubilité dépend en partie de l'équilibre de la réaction de formation des ions carbonates (CO_3^{2-}) se complexant en majorité en carbonate de calcium (2 : pompe chimique). La quantité de CO_2 capturée par ces deux pompes est fonction des conditions physico-chimiques de l'eau (température, salinité, alcalinité totale) et des processus biologiques (comme la production primaire ou la calcification). Le CaCO_3 et le CO_2 peuvent également être transportés en profondeur par l'action de pompes physiques (3) agissant par mélanges verticaux locaux ponctuels générés par les forçages physiques (tels que l'action du vent, du transport d'Eckman) ou par la formation d'eaux denses et la circulation thermohaline profonde, séquestrant le CO_2 à long terme. La formation d'eaux denses étant dépendante de la température de l'eau, ce processus ne se produit en majorité qu'à hautes latitudes (ou très ponctuellement en Méditerranée) faisant de ces régions des puits de carbone alors qu'inversement les basses latitudes sont des sources. La séquestration du carbone par les organismes vivants et leurs activités représentent cependant la principale pompe de carbone (4) s'accumulant sur le fond de l'océan et finissant par devenir réfractaire à toute utilisation par des organismes vivants. Modifié d'après Nellemann *et al.* (2009).

CHAPITRE 2. La photohétérotrophie, un art de (sur)vivre.

2.1. La remise en question d'une vue dichotomique

2.1.1. Découverte de la mixotrophie bactérienne

La photosynthèse est un processus connu pour être présent chez les bactéries depuis plus d'un siècle avec les *Cyanobacteria* anciennement nommées les « algues bleu-vert ». Cornelis B. Van Niel (1897–1985) découvre en 1931 le principe de la photosynthèse, à savoir une réaction d'oxydo-réduction dépendante de la lumière. Il met en évidence l'utilisation de composés organiques réduits comme donneurs d'électrons comme le sulfure d'hydrogène (H_2S) utilisé par les bactéries pourpres sulfureuses et sulfureuses vertes pour fixer le CO_2 en conditions anaérobies et suppose que l'eau (H_2O) pourrait remplacer l' H_2S en conditions aérobies, comme par exemple pour les plantes terrestres. Ainsi vont être mis en évidence deux grands types de photosynthèse :

- la photosynthèse oxygénique en conditions aérobies, dégageant du dioxygène (O_2) comme produit d'oxydation de l'eau (chez les cyanobactéries)
- la photosynthèse anoxygénique en conditions anaérobies (ou microaérobies), ne dégageant pas de dioxygène mais divers composés organiques et inorganiques oxydés comme le SO_4^{2-} chez les bactéries phototrophes anoxygéniques anaérobies (BPAnAn). La source de pouvoir réducteur varie chez les différentes BPAnAn : des composés organiques réduits chez certaines bactéries pourpres non sulfureuses et les héliobactéries, du lactate chez certaines héliobactéries, du dihydrogène (H_2) chez certaines bactéries pourpres non sulfureuses ou du sulfure d'hydrogène (H_2S) chez certaines bactéries pourpres sulfureuses et sulfureuses vertes.

Ces processus physiologiques permettent à ces bactéries de subvenir à leurs besoins nutritifs uniquement à partir de la fixation CO_2 et de lumière (voir §1.4.2), elles sont autotrophes. Depuis Aristote (-384 – -322), le monde vivant est classifié de façon dichotomique : tout organisme est soit animal (hétérotrophe) soit végétal (autotrophe), mais dès les années 1930, juste après les découvertes de Van Neil, l'idée que les cyanobactéries peuvent être facultativement hétérotrophes apparaît. En effet, Allison *et al.* (1937) observent qu'en culture, une cyanobactérie est capable de pousser à l'obscurité en présence de sucres. Plus tard, Rippka (1972) a montré que certains membres du genre *Synechococcus*, un des genres cyanobactériens les plus abondants dans les océans (voir §1.3.3) avaient la capacité de

croître de manière photohétérotrophe bien qu'elles soient majoritairement des photoautotrophes. Par la suite de nombreuses études (Paerl 1991, Rippka *et al.* 2000, Zubkov *et al.* 2003, Church *et al.* 2004, Malmström *et al.* 2005, Zubkov et Tarran 2005, Church *et al.* 2006) ont mis en évidence que les cyanobactéries, principalement les *Synechococcus* et les *Prochlorococcus*, avaient également la capacité d'absorber une grande variété de molécules simples (ATP, urée, glucose, phosphore et azote organiques ^{et/ou} inorganiques, DMSP, methanethiol (MeSH)...).

Shiba *et al.* (1979), en cherchant des souches contenant de la bactériochlorophylle (BChl), ont mis en évidence la présence de ce pigment, impliqué dans la photosynthèse anoxygénique, chez des isolats provenant de zones marines aérobies diverses. Ces bactéries sont incapables de croissance en utilisant ce pigment en conditions anaérobies, elles sont donc aérobies obligatoires contrairement à leurs consœurs, les BPAnAn. Elles ne produisent pas d'oxygène et nécessitent de la matière organique et de l'oxygène pour croître et synthétiser leur appareil photosynthétique (Yurkov *et al.* 1998, Yurkov et Beatty 1998). Ces bactéries, principalement hétérotrophes, ont des capacités phototrophes et ont été nommées les bactéries phototrophes anoxygéniques aérobies (BPAnA ou BPAA).

Dans les années 1970, une nouvelle sous-famille de protéines membranaires ayant la capacité de capturer l'énergie lumineuse a été trouvée dans une *Archaea* halophile (pouvant vivre en présence de fortes concentrations de sel), *Halobacterium salinarum* (Oesterhelt et Stoeckenius 1971). Ces protéines appartiennent à la famille des rhodopsines, présentes chez des organismes dans tous les royaumes du vivant (*Archaea*, *Bacteria* et *Eukarya* uni et pluricellulaires) et fonctionnent comme des pompes à ions activées par la lumière ou des récepteurs photosensibles, y compris chez les mammifères où elles sont impliquées dans la vision des couleurs (Spudich *et al.* 2000). Par des études moléculaires, certains analogues de ces protéines ont été retrouvés chez les bactéries marines pélagiques au début des années 2000 (Béjà *et al.* 2000). Initialement trouvées chez des *Proteobacteria*, elles ont été nommées protéorhodopsines (PR) en opposition à la bactériorhodopsine (BR) trouvée précédemment chez les *Archaea*. La PR permettrait de générer de l'énergie additionnelle à partir de l'énergie lumineuse chez les bactéries hétérotrophes qui les arborent (B-PR).

2.1.2. *Un gradient de métabolismes phototrophes*

Ainsi, au cours de ces quarante dernières années, la vue dichotomique d'un monde « végétal » ou « animal » a éclaté et il a été mis en évidence une réelle pluralité des métabolismes, particulièrement chez les bactéries, probablement l'un des règnes avec la plus grande versatilité de modes de nutrition. En ne considérant que la source principale d'énergie et de carbone, la production d'énergie biologiquement utilisable peut être schématisée en trois grands types généraux (Figure 16) avec les photoautotrophes, diverses formes de photohétérotrophes et les organohétérotrophes (voir § 1.4.2). Chaque mode métabolique est dépendant de la quantité et de la qualité du carbone biodisponible (voir § 1.4.3), allant de l'indépendance vis-à-vis de la MOD avec la photosynthèse oxygénique (ou faible dépendance dans le cas des processus photohétérotrophes chez certaines cyanobactéries ou microalgues) à la forte dépendance avec la respiration stimulée par la lumière (la fixation de CO₂ chez les photohétérotrophes étant mineure et résultant de processus anaplérotiques) et la totale dépendance avec l'organohétérotrophie. Comme nous le verrons par la suite, bien que la lumière ne permette pas une autotrophie chez les organismes photohétérotrophes, elle permet la génération d'énergie en limitant les besoins en carbone. La balance entre autotrophie et hétérotrophie au sein même de chaque type métabolique est probablement fonction de la disponibilité et de la qualité de ces deux facteurs : lumière et MOD biodisponible. Ainsi, plus que des compartiments cloisonnés, un réel gradient de métabolismes serait présent au sein des bactéries et des écosystèmes.

Parmi les organismes pratiquant la photosynthèse oxygénique, les cyanobactéries coccoïdes (*Prochlorococcus* sp. et *Synechococcus* sp.) sont responsables, le plus souvent, d'une grande proportion de l'activité autotrophe de par leur fortes abondances, notamment dans les zones océaniques oligotrophes. Toutefois, l'importance du processus d'hétérotrophie facultative est difficilement quantifiable. En utilisant des acides aminés marqués avec des composés radioactifs tels que la leucine ou la thymidine tritiée, des études menées par Church *et al.* (2004, 2006) dans le Pacifique Nord ont montré une augmentation de l'incorporation de la leucine mais pas de la thymidine en conditions éclairées par rapport aux conditions d'obscurité. Ces auteurs attribuent cette activité spécifique aux cyanobactéries coccoïdes. Bèjà et Suzuki (2008) ont recherché les gènes traduisant une potentielle activité d'utilisation de ces acides aminés (codant pour des kinases) dans les génomes séquencés d'autres photohétérotrophes (BPAA et B-PR). Ils ont trouvé que ces cyanobactéries (dans les génomes

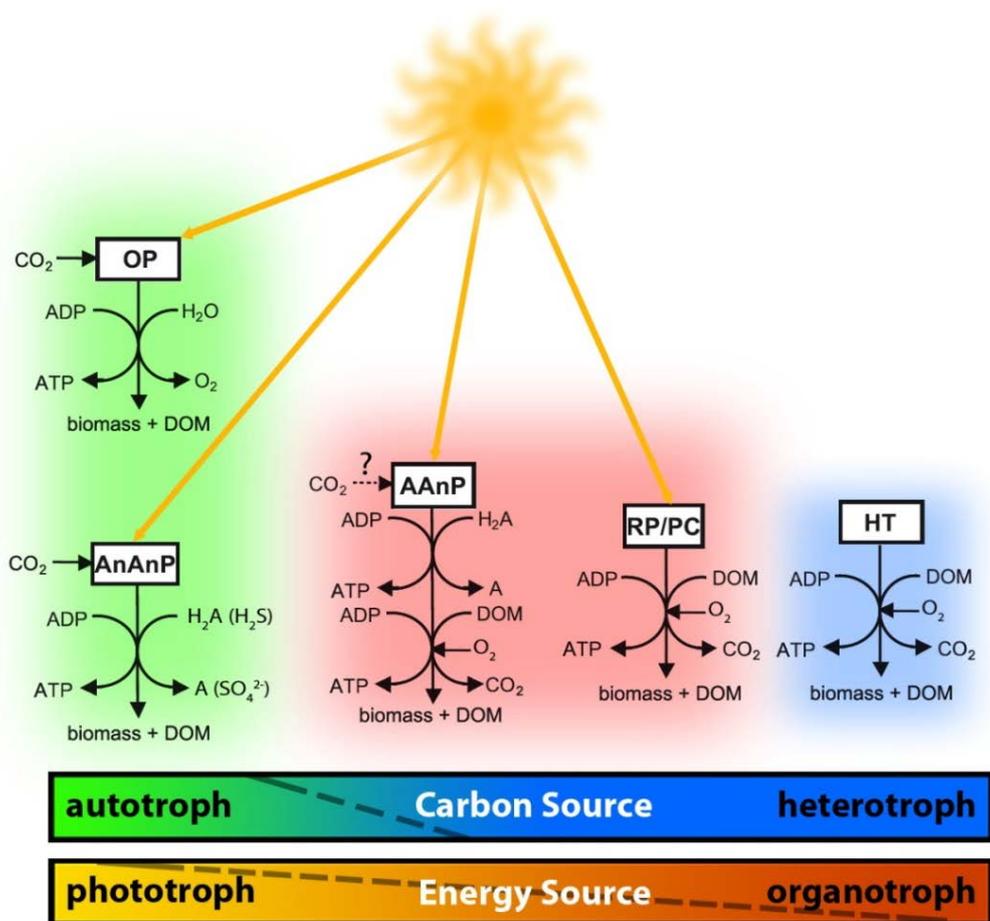


Figure 16. Vue des relations complexes entre énergie lumineuse, production d'énergie biologique et matière organique dissoute (DOM) en milieu marin. De la photoautotrophie (vert) avec la photosynthèse oxygénique (OP) présente notamment chez les *Cyanobacteria* et anoxygénique avec les bactéries phototrophes anoxygéniques anaérobies (AnAnP) en passant par les métabolismes hybrides (rouge), impliquant lumière et MOD, des bactéries phototrophes anoxygéniques aérobies (AAnP) ou les protéines dont le fonctionnement est régi par la lumière telles que les rhodopsines (RP) (ou les phytochromes (PC)), jusqu'à l'organohétérotrophie stricte (HT). H_2A : composé réduit ; A : composé oxydé. Modifié d'après Karl (2002) et Eiler (2006).

disponibles à l'époque) n'avaient potentiellement pas de kinase spécifique à la thymidine mais en avaient pour la leucine. Cependant il en était de même pour le génome de *Candidatus Pelagibacter ubique*, un clade très abondant dans ces eaux. En conséquence, Ces auteurs suggèrent que l'incorporation d'acides aminés stimulée par la lumière pourrait tout du moins partiellement, être le fait d'autres groupes bactériens n'appartenant pas aux cyanobactéries. Michelou *et al.*(2007) ont mis en évidence, le long d'un transect de la Floride à l'Islande, que *Synechococcus* et *Prochlorococcus* étaient responsables d'une grande partie de l'assimilation photo-stimulée d'acides aminés mais globalement 40% en était attribuable aux picoeucaryotes (chez qui la mixotrophie existe aussi) et aux autres bactéries photohétérotrophes.

Le métabolisme des BPAA a principalement été étudié grâce aux nombreuses souches isolées depuis leur découverte en 1979. Bien qu'elles présentent des métabolismes variés, elles possèdent des caractéristiques communes. De par leurs nombreux traits métaboliques et structuraux communs, plusieurs auteurs pensent que les BPAA sont issues de l'adaptation des bactéries pourpres non sulfureuses (BPAnAn) à un monde oxygéné (Nishimura *et al.* 1996, Beatty 2002). Il en résulterait 5 différences majeures entre les bactéries phototrophes anoxygéniques aérobies et leurs consœurs anaérobies (Yurkov et Beatty 1998, Yurkov et Csotonyi 2008) :

- L'utilisation obligatoire de dioxygène pour leur croissance se traduisant par une incapacité à croître en milieu anaérobie (alors que certaines BPAnAn peuvent croître en conditions microaérobies en présence de certains composés chimiques),
- La répression (ou plutôt la dépression) de la synthèse de la bactériochlorophylle par la lumière,
- L'absence du cycle de Calvin (manque de l'enzyme clé, la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) permettant la fixation effective du CO₂) résultant en une incapacité à survivre à partir de carbone inorganique,
- Faible abondance de bactériochlorophylle (~10 fois moins que pour les BPAnAn) et uniquement de la BChl *a* (il en existe plus de 6 variétés chez les BPAnAn).
- Forte abondance de caroténoïdes principalement non impliqués dans la capture de l'énergie solaire mais qui permettraient de surmonter la toxicité liée à l'oxygène, notamment les ROS (O₂⁻, O₂^{*}, O₃) par les photons surnuméraires ou la formation de dimères de BChl *a*.

Même si de faibles quantités de CO₂ sont fixées chez certaines BPAA, les différences précédemment citées font de ces dernières, des organismes incapables de croître uniquement à partir de CO₂ et de lumière, nécessitant de la matière organique comme source de carbone. Toutefois, leur système de capture d'énergie lumineuse leur permet de générer un flux d'électrons capable d'augmenter significativement la force protomotrice (voir paragraphe suivant) utilisable soit pour l'incorporation active de molécules soit pour la génération d'ATP alimentant les autres processus chimioorganotrophes de leur métabolisme (Yurkov et Beatty 1998, Koblížek *et al.* 2003, Yurkov 2006). L'incorporation photo-induite (Shiba 1984) et la fixation de CO₂, mesurées chez certaines BPAA, semblent quant à elles, être dues à l'activité de la phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase (Yurkov *et al.* 1994), enzyme impliquée dans la synthèse d'oxaloacétate permettant d'augmenter l'efficacité du cycle de l'acide citrique

(TCA ou cycle de Krebs) qui est le principal processus catabolique pourvoyeur d'énergie pour la cellule (respiration). Ces apports énergétiques semblent être suffisants pour permettre une stimulation de la croissance par la lumière chez de nombreuses BPAA (Harashima *et al.* 1982, 1987, Yurkov et van Gemerden 1993, Hauruseu et Koblížek 2012). La lumière permet une forte augmentation de biomasse de certaines souches PAA, (plus 25 à 110 % de biomasse en cycle jour/nuit qu'en obscurité permanente) ainsi qu'une diminution des besoins respiratoires (jusqu'à 25 %) qui sont suppléés par l'énergie issue de l'activité phototrophe (Hauruseu et Koblížek 2012).

La diversité métabolique au sein des BPAA est extrêmement vaste pour un groupe fonctionnel utilisant l'hétérotrophie pour répondre à ses besoins en carbone. La majorité des souches PAA peuvent croître sur une grande variété de composés organiques démontrant une grande plasticité métabolique (Koblížek *et al.* 2003, Yurkov et Csotonyi 2008) bien que certains membres semblent spécialisés sur l'utilisation d'un petit nombre de composés (Yurkov et Beatty 1998). Parmi ces sources carbonées, sont métabolisés des composés pouvant avoir des impacts climatiques tel que le DMSP, faisant potentiellement de certaines BPAA des modulateurs clés dans le cycle marin du soufre et des acteurs importants de la régulation des composés volatiles à effet de serre (Wagner-Döbler et Biebl 2006). De plus, il a été montré que ce groupe fonctionnel présente de forts taux de croissance (Koblížek *et al.* 2005, 2007, Ferrera *et al.* 2011) en comparaison des taux moyens du bactérioplancton, laissant à penser que les BPAA représentent un compartiment très dynamique des communautés bactériennes marines potentiellement responsables d'une grande part du recyclage du carbone dans l'océan de surface (Koblížek *et al.* 2007).

La super-famille des rhodopsines est composée d'une grande diversité de protéines dont les fonctions diverses sont toutes contrôlées par l'énergie lumineuse. Avant les années 2000, les rhodopsines microbiennes étaient connues uniquement chez les *Archaea* et étaient réparties en 4 grandes familles (Figure 17) : les bactériorhodopsines (BR), canal ionique photo-activé (Oesterhelt et Stoekenius 1971) tout comme les halorhodopsines (HR ; Matsuno-Yagi et Mukohata (1977)) et rhodopsines sensorielles impliquées dans la

phototaxie⁴⁷, de type I (SRI ; Bogomolni et Spudich (1982)) ou de type II (SRII ; Takahashi *et al.* (1985)). Les rhodopsines étaient considérées comme étant principalement des protéines photo-sensorielles, c.-à-d. permettant la perception de la luminosité et le déplacement des organismes en réponse à cette dernière. Cependant, il a été mis en évidence assez rapidement, chez *Halobacterium salinarum*, qu'une augmentation du potentiel de membrane, induite par le transport transmembranaire d'ions (BR^{et}/ou HR), pouvait générer de l'énergie transformable en ATP (Matsuno-Yagi et Mukohata 1980, Mukohata et Kaji 1981) qui pouvait être éventuellement utilisée dans le métabolisme comme supplément énergétique.

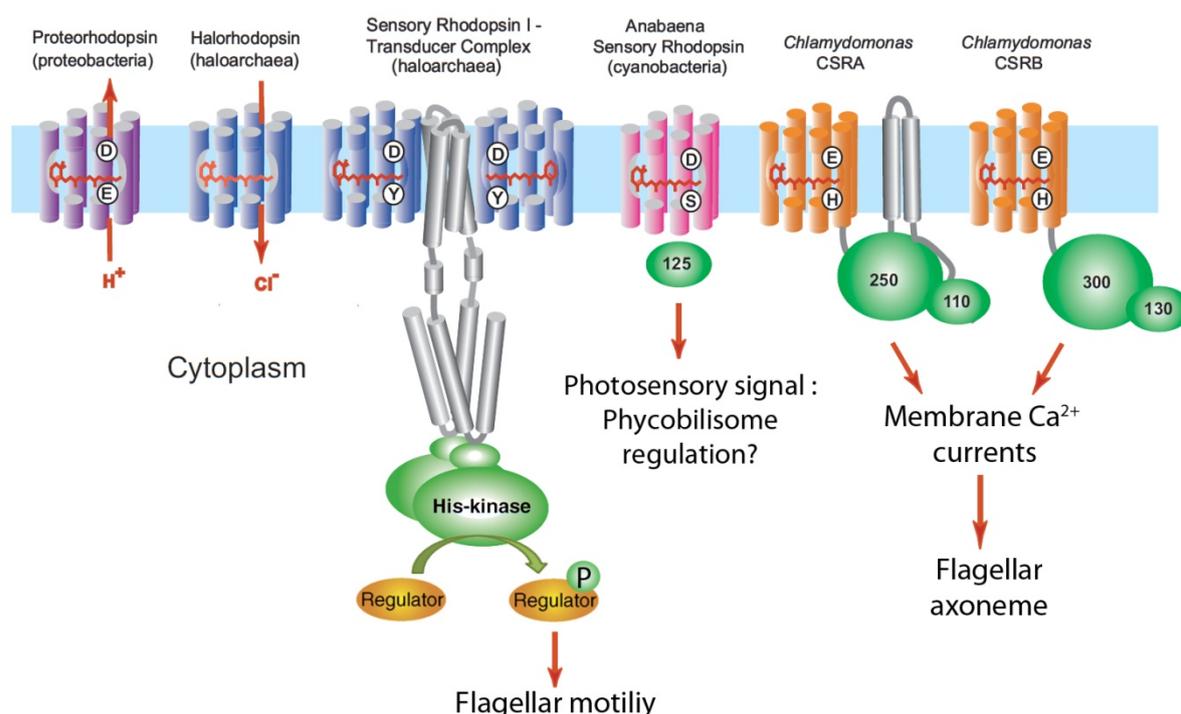


Figure 17. Exemples des structures et des fonctions des rhodopsines microbiennes connues au milieu des années 2000s. En mauve et rose, chez les *Bacteria* ; en bleu, chez les *Archaea* ; en orange, chez les *Eukarya* unicellulaires. Certains types de rhodopsine sont présents dans plusieurs taxons, comme la SRI présente chez les *Archaea* et *Bacteria*. En vert, les protéines ou les domaines permettant la transduction du signal, l'éventuel nombre indiqué correspond au nombre de résidus d'acides aminés de chaque module. Les deux premières rhodopsines fonctionnent comme des canaux à ions photo-induits ; la SRI permet, de manière analogue à la SRII, l'activation de la mobilité flagellaire par transduction du signal par phosphorylation des histidines de transducteurs grâce à des kinases ; chez la cyanobactérie *Anabaena* sp. PCC7120 (*Nostoc*), la rhodopsine est couplée à une protéine qui est suspectée de moduler l'adaptation chromatique permettant une photoadaptation. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, 2 complexes comprenant des rhodopsines permettraient la création d'un potentiel électrique à travers la membrane cellulaire grâce aux ions Ca^{2+} activant l'axonème du flagelle.

⁴⁷ **Phototaxie** : déplacement orienté des organismes en réponse à une stimulation lumineuse (attraction ou répulsion).

La découverte d'un homologue à la BR dans les bactéries pélagiques marines à métabolisme hétérotrophe (Béjà *et al.* 2001) et surtout sa forte abondance laissent à penser que de système sensoriel, le rôle des rhodopsines microbiennes peut potentiellement passer à celui de système phototrophe (c.-à-d. permettant d'apporter de l'énergie au métabolisme) à part entière. Cet apport énergétique, d'un point de vue conceptuel, pourrait apporter aux bactéries arborant ce type de rhodopsine une source d'énergie supplémentaire à celle obtenue par la dégradation de composés organiques et le cycle de l'acide citrique. Toutefois, les preuves expérimentales de l'importance de cet apport restent peu abondantes, en particulier pour la PR, le type de rhodopsine le plus abondant dans les océans dans l'état actuel de nos connaissances. Il a été montré qu'une souche bactérienne, appartenant aux *Flavobacteriaceae*, avait une meilleure croissance en cycle lumière / obscurité qu'en obscurité seule (Gómez-Consarnau *et al.* 2007) en présence de faibles concentrations de carbone. Cependant, ce résultat n'a pu être jusqu'à présent observé qu'avec cette souche et nombre d'autres cultures, y compris du même genre, ne montrent pas une telle réponse. Ainsi, la réelle implication de la PR dans le métabolisme des B-PR ainsi que le poids de la phototrophie basée sur la rhodopsine dans les océans restent encore mal compris. Les diverses hypothèses et leurs fondements expérimentaux seront discutés par la suite.

2.1.3. Structures impliquées dans la phototrophie bactérienne

Les appareils structurels permettant la capture de l'énergie lumineuse les plus étudiés sont ceux impliqués dans la photosynthèse oxygénique de par leur accessibilité (présent chez les « plantes supérieures »). De même, par leur découverte précoce (début du XX^{ème} siècle avec Winogradsky notamment), les structures photoréceptrices des bactéries anaérobies (BPAnAn) sont également bien connues et restent très étudiées encore de nos jours. Le sujet étant très vaste, nous nous concentrerons dans ce paragraphe sur les structures impliquées dans la phototrophie chez les bactéries marines pélagiques (aérobies) et uniquement chez les organismes où une activité photohétérotrophe a été rapportée.

En milieu marin, les *Cyanobacteria* présentent des structures photosynthétiques similaires à celles rencontrées chez les autres organismes pratiquant la photosynthèse oxygénique. Il est d'ailleurs à noter qu'il est actuellement admis que ce groupe est à l'origine de la photosynthèse oxygénique et, selon la théorie endosymbiotique (proposée par Lynn Margulis dans les années 1960 mais officiellement publiée en 1981 (Margulis 1981)), est à

l'origine de l'acquisition du chloroplaste (structure permettant la photosynthèse) par les eucaryotes. Les pigments permettant la capture de l'énergie lumineuse (photon) sont principalement la chlorophylle *a* pour *Synechococcus* (et la majorité des autres *Cyanobacteria*) et la chlorophylle *a* et *b* pour *Prochlorococcus* (Ting *et al.* 2002). Ces pigments sont complétés chez *Synechococcus* par des phycobilisomes, complexes d'antennes collectrices de lumière formées de divers pigments permettant de compléter le spectre d'absorption et de transférer plus d'énergie lumineuse au centre réactionnel. La variation en composition de ces pigments supplémentaires permettrait notamment, chez certaines *Cyanobacteria*, la photoadaptation (accordant une grande plasticité vis-à-vis de la qualité de lumière disponible). Leur machinerie photosynthétique est incluse dans la membrane d'une structure interne particulière : le thylacoïde et se compose de deux photosystèmes distincts (complexes multi-protéiques ; Figure 18). Ces deux photosystèmes ont des fonctions complémentaires mais divergentes. Le PSII permet, grâce à l'énergie transmise par la lumière et par un jeu de réactions d'oxydo-réduction, le transfert d'un électron provenant de l'oxydation de l'eau en oxygène (par un complexe manganèse lié au PSII) à une quinone (plastoquinone), une molécule transport, alors réduite (McEvoy et Brudvig 2006). Le flux d'électrons va ensuite être transféré au Cytochrome *B6/F* qui va ré-oxyder la quinone, gagnant ainsi un électron (e^-) et permettant la translocation d'un proton (H^+) à travers la membrane du thylacoïde. Ce transport de protons, en addition des protons issus de l'oxydation de l'eau, permet la mise en place d'une différence de pH entre l'intérieur du thylacoïde et le cytoplasme. Ce gradient protonique (potentiel électrochimique) permet le fonctionnement de l'ATP synthase, enzyme qui phosphoryle l'ADP en ATP créant ainsi de l'énergie directement utilisable par la cellule. Le cytochrome *B6/F* transfère l'électron au PSI par l'intermédiaire d'une plastocyanine (protéine contenant du cuivre qui chargera l'électron). Le PSI va permettre, une fois encore grâce à l'énergie apportée par la lumière, le transfert de l'électron de la plastocyanine à la ferrédoxine, une enzyme liée au PSI réduisant le NADP en NADPH, fournissant ainsi à la cellule un fort pouvoir réducteur. Ces processus se déroulent pendant une phase éclairée. A l'obscurité, les produits énergétiques issus de l'activité de photosynthèse (ATP et NADPH) vont être utilisés dans le cycle de Calvin, un cycle primordial chez les autotrophes, puisqu'il permet la transformation du CO_2 en sucres, molécules de stockage de l'énergie. Ce cycle, coûteux en énergie, demande l'intervention de nombreuses enzymes mais l'enzyme clé permettant l'intégration du CO_2 est la RuBisCO.

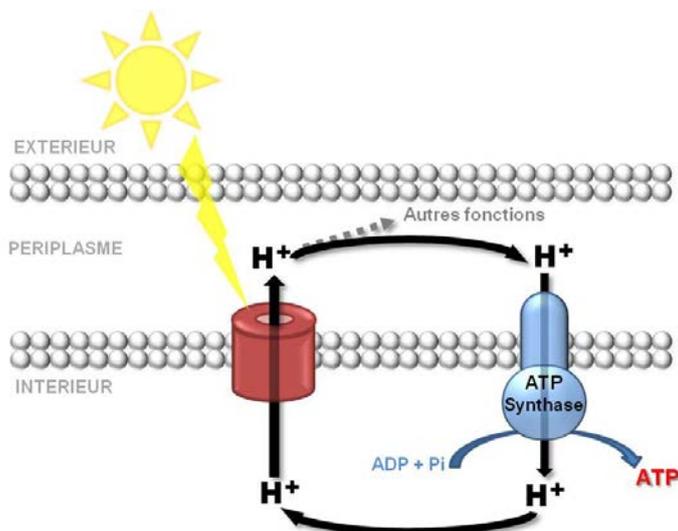
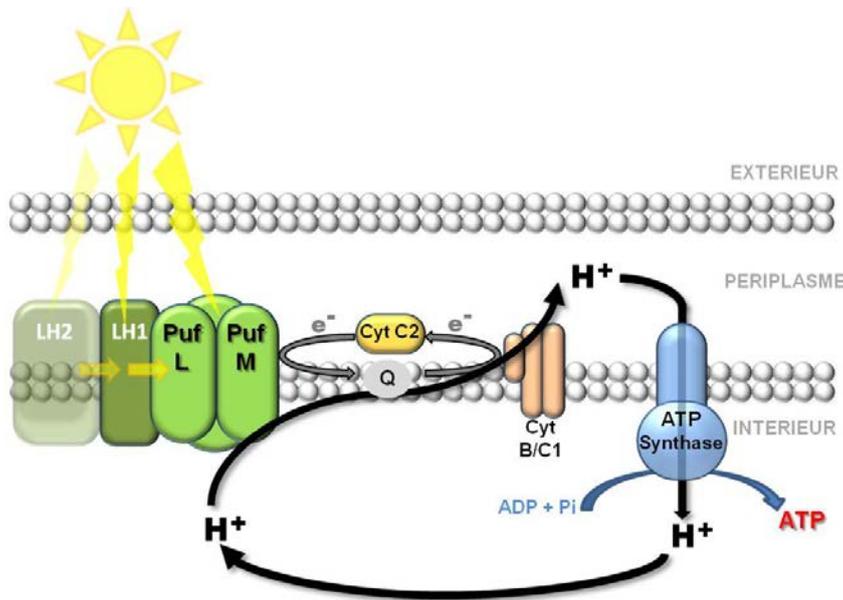
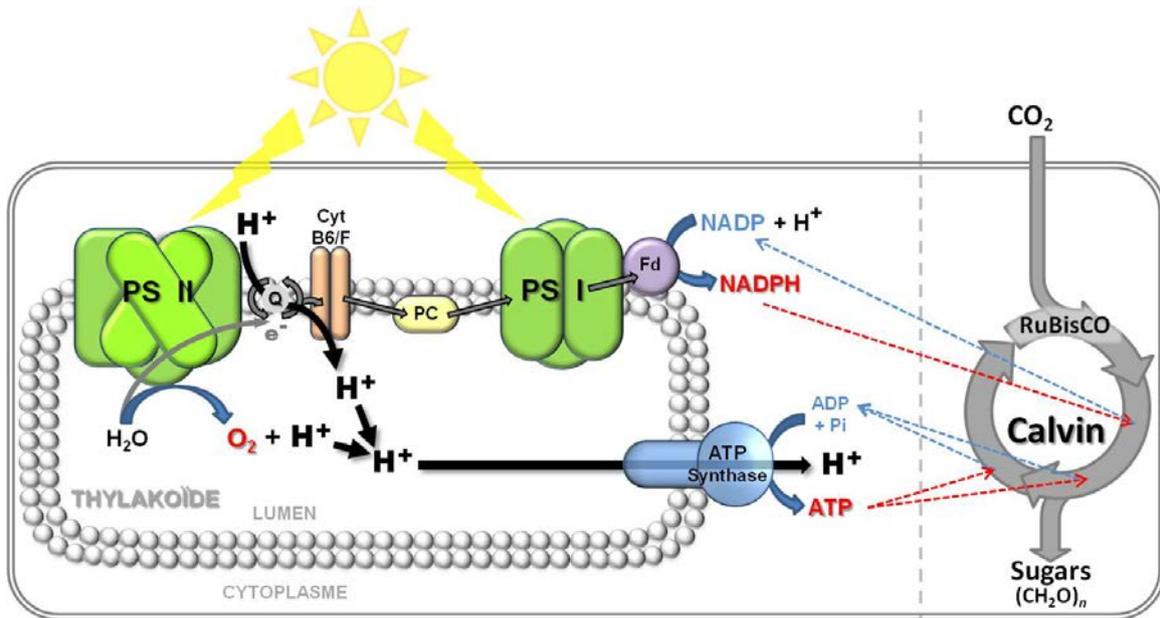


Figure 18. Schémas conceptuels des structures impliquées dans la phototrophie aérobie chez les bactéries pélagiques. En haut, la photosynthèse oxygénique chez les Cyanobactéries ; au milieu, un exemple de l'appareil phototrophe chez les BPA ; en bas, le principe de la phototrophie basée sur la protéorhodopsine. PSI ou PSII : Photosystème I ou II (centres réactionnels) ; LH : *Light harvesting* ou complexe antennaire périphérique ; Cyt : cytochrome ; Q : pool de quinones ; PC : Plastocyanine ; Fd : Ferrédoxine. La stœchiométrie des réactions n'est pas respectée.

Chez les *Cyanobacteria*, la RuBisCO est contenue dans le carboxisome, structure protéique permettant d'isoler cette dernière de l'oxygène qui l'empêche de fixer le CO₂. Cette enzyme et ce cycle sont présents chez les BPAAn leur assurant également une autotrophie ; cependant ils sont absents chez les BPAA (Yurkov et van Gemerden 1993, Yurkov *et al.* 1994, Shimada 1995, Swingley *et al.* 2007). Ceci est en adéquation avec leur incapacité à croître de manière photoautotrophe et les faibles taux de CO₂ fixés comparables à ceux de certains organohétérotrophes (Yurkov 2006).

Bien que quelques variations existent, la machinerie phototrophe chez les BPAA est très proche (tant structurellement que génétiquement pour les gènes codant pour les diverses structures) de celle rencontrée chez les bactéries pourpres non-sulfureuses. Le centre réactionnel, les polypeptides du LHI et les transporteurs d'électrons sont très similaires et le transfert photo-induit d'électrons est également effectif chez les BPAA bien que ce ne soit uniquement en milieu aérobie (Yurkov 2006 et références cités). Contrairement aux *Cyanobacteria*, l'appareil phototrophe des BPAA (Figure 18) consiste en un seul centre réactionnel de type II (c.-à-d. réduisant des quinones). Le flux d'électrons est cyclique contrairement à la photosynthèse oxygénique et ne nécessite pas un donneur d'électron à chaque cycle. Comme chez certaines bactéries pourpres non-sulfureuses, le centre réactionnel est entouré par un disque composé de nombreux complexes antennaires LH 1. Chez certaines BPAA, comme *Roseobacter denitrificans* ou les souches d'*Erythromicrobium*, les LH 1 sont également encerclés de complexes LH 2 (Yurkov et Beatty 1998). Les complexes antennaires sont composés principalement de BChl *a* et de divers caroténoïdes dont la composition varie selon le complexe et le genre considéré. Ces différences de composition permettent notamment des différences de longueurs d'ondes absorbées.

Au niveau structural (Figure 19), le centre réactionnel est composé de 3 unités protéiques PufL, M et H, ainsi que des co-facteurs suivants : 4 BChl (dont une paire spécialisée dans la capture du photon et une paire accessoire), 2 bactériophéophytines, 2 quinones, et un ion Fe²⁺ libre (non compris dans un hème ; Lancaster et Michel (1996), Yurkov et Beatty (1998)). Le photon est capturé par la paire spéciale de BChl qui est alors photooxydée et transfère l'énergie (sous forme d'électron) à l'une des BChl accessoires qui, à son tour, la transfère à une bactériophéophytine. Cette dernière le transmet enfin, *via* l'ion métallique, aux quinones qui sont alors réduites. Le transport intramembranaire des électrons et protons est assuré par les quinones qui sont oxydées par le cytochrome B. Lors de cette

réaction, ce dernier transfère 2 électrons au cytochrome *C1* en nécessitant la translocation dans le périplasma de 2 protons provenant de la quinone et 2 protons provenant du cytoplasme. Le Cytochrome *C1* transfère les 2 électrons au cytochrome *C2* permettant leur transport, dans le périplasma (espace entre les deux membranes cellulaires chez les bactéries Gram -) jusqu'à la paire spéciale de BChl *a* du centre réactionnel. Selon le genre de BPAA considéré, ce schéma fonctionnel, même s'il reste vrai dans ses grandes lignes, peut varier dans la composition, l'efficacité et la fonction de ses acteurs, notamment au niveau des cytochromes. Chez plusieurs souches d'*Erythrobacter* et d'*Erythromicrobium*, de nombreux cytochromes *C* de transport existent et seraient à la fois impliqués dans la phototrophie et dans la chaîne respiratoire (Yurkov et Beatty 1998).

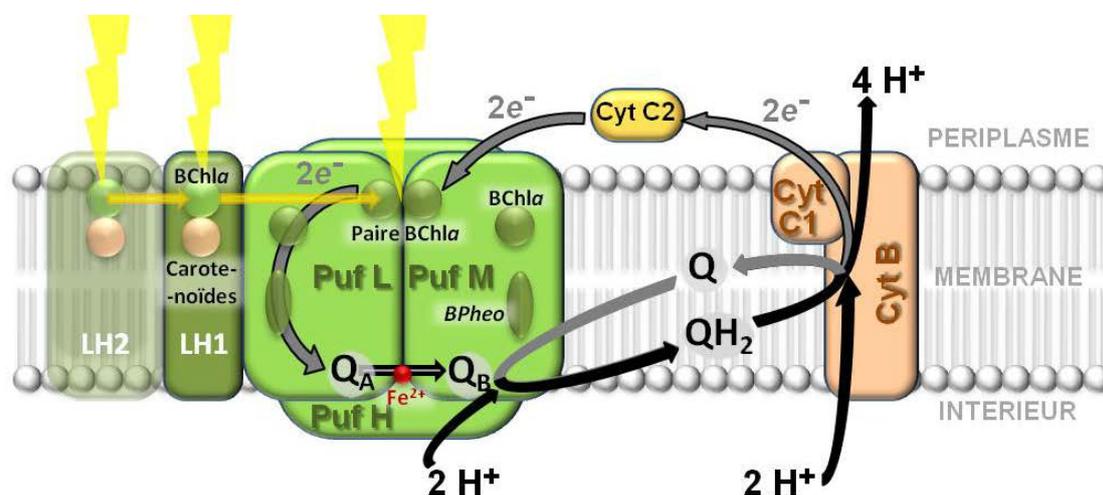


Figure 19. Schéma structurel simplifié du centre réactionnel, du cycle des électrons et de la translocation de protons chez les BPAA. BChl *a*, bactériochlorophylle *a* ; BPheo, bactériophéophytine ; Q, quinone ; Cyt, Cytochrome. Modifié d'après Lancaster et Michel (1996) et Yurkov et Beatty (1998).

Comme pour les BPAA, la présence de RuBisCO n'a pas été observée chez les B-PR (Kirchman 2008) bien que certains résultats montrent que chez *Polaribacter* MED152 la fixation de CO₂ est photo-stimulée. Cette fixation serait également due à des réactions anaplerotiques (PEP ou pyruvate carboxylase) activées, hypothétiquement, par un « déséquilibre » dans le cycle de l'acide carboxylique induit par le surplus d'énergie fourni par l'activité de la PR (González *et al.* 2008). Les B-PR tirent donc principalement leur énergie et leur source de carbone des processus respiratoires oxydant la matière organique. Elles possèdent cependant un mécanisme phototrophe se basant sur une stratégie différente de celle des autres organismes capables d'utiliser l'énergie lumineuse. En effet, ce système est basé sur la modification structurale d'une opsine, un canal transmembranaire, induite par l'énergie lumineuse permettant, chez les rhodopsines non-sensorielles (voir § 2.1.2 et Figure

17), la translocation contre-gradient d'un composé chimique simple. Dans le cas de la protéorhodopsine, le composé transporté contre-gradient étant un proton, ce système génère un potentiel électrochimique de membrane pouvant potentiellement produire de l'énergie supplémentaire sous forme d'ATP *via* une ATP synthase (Figure 18). L'implication effective et le rôle de la PR dans le métabolisme ne sont actuellement qu'au stade des suppositions même si certaines pistes commencent à être soutenues par des preuves expérimentales. Des indices sur l'importance de la place des rhodopsines microbiennes en tant que voie phototrophe émergent cependant ces dernières années. Par exemple, en 2005, chez la *Bacteria*, *Salinibacter ruber*, occupant la même niche que l'*Archaea*, *Halobacterium salinarum*, un autre type de rhodopsine a été découvert, capable de pomper des protons, la xanthorhodopsine (XR). Cette dernière possède la caractéristique de pouvoir lier une antenne caroténoïque capable de capter et de transférer efficacement l'énergie lumineuse, représentant ainsi le plus petit système antennaire photo-électrogène connu (Balashov *et al.* 2005, Lanyi et Balashov 2011). Ce système permettrait la diminution des besoins respiratoires par environ 50% chez cette bactérie (Boichenko *et al.* 2006). La grande ressemblance physiologique (bien qu'elle soit éloignée génétiquement (~30% d'homologie)) notamment au niveau des résidus fonctionnels clés entre la XR et la PR, laisse à penser que les rhodopsines fonctionnant comme des pompes à protons, peuvent jouer un rôle important et encore méconnu dans la phototrophie chez les bactéries.

Les rhodopsines sont toutes basées sur le même schéma structural global : l'opsine est une petite protéine (environ 250 résidus) composée de 7 hélices transmembranaires formant, dans le cœur hydrophobe de la membrane interne de la cellule, une poche intérieure liant un chromophore, le rétinol, un aldéhyde de vitamine A (Spudich et Jung 2005). Plus précisément chez les PR, le rétinol et l'opsine sont liés par une liaison covalente entre la lysine en position 131 de l'hélice G de l'opsine et le groupement imine secondaire (base de Schiff) en fin de chaîne du rétinol (Figure 20). En condition initiale, la base de Schiff du rétinol (N) est protonée et la succession de résidus impliqués dans le transfert du proton est étroitement liée avec des molécules d'eau (liaison hydrogène). L'énergie lumineuse est captée par le rétinol et induit sa photoisomérisation (changement de conformation) altérant la distance entre la base de Schiff et les résidus adjacents. Le proton peut alors être transféré à l'acide aspartique en position 97 de l'hélice C (1). Cette réaction initie une série de sauts des protons entre les molécules d'eau dans le canal de la protéine qui finissent par la libération par l'acide glutamique 108 de l'hélice C, d'un proton dans l'espace périplasmique (2). Le rétinol

recouvre alors un proton d'un acide aspartique proche, lui-même le récupérant du cytoplasme (3). Finalement l'Asp⁹⁷ reprotone le Glu¹⁰⁸ (4) et le système retourne à son état initial. L'acide aminé en position 105 sur l'hélice C joue un grand rôle dans la longueur d'onde permettant d'exciter le rétinol. En effet, ce résidu est physiquement proche de la base de Schiff et la nature de sa chaîne latérale joue sur la liaison hydrogène de ce dernier changeant les niveaux énergétiques de l'état basal et excité de la rétine (Man *et al.* 2003). Ainsi, il a été mis en évidence deux grands types de spectre d'absorption chez les PR : ceux dont le maximum d'absorption est dans le vert et ceux dont il est dans le bleu. Les variants absorbants dans le vert possèdent, en position 105, une leucine (L), une méthionine (M), une valine (V) ou une alanine (A) alors que les variants absorbant dans le bleu possèdent une Glutamine (Q).

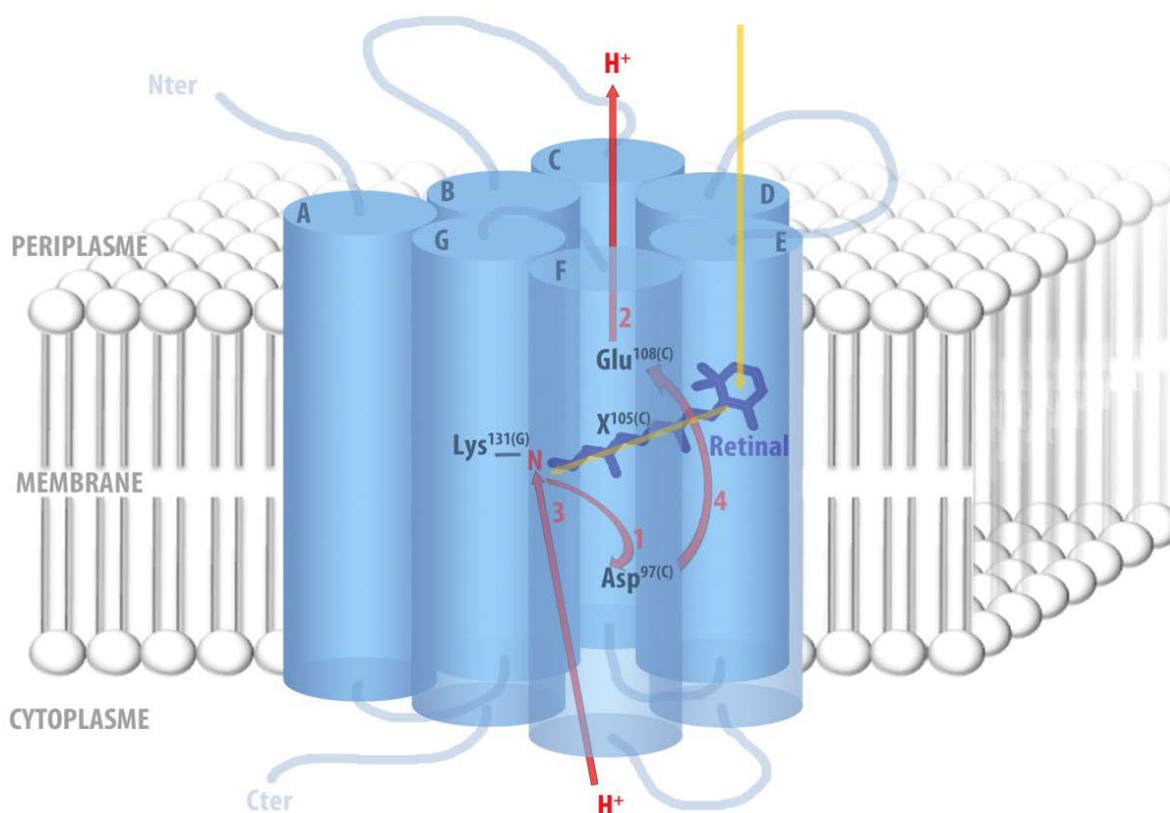


Figure 20. Schéma structurel simplifié de la protéorhodopsine et du transport de protons photo-induits. En bleu, l'opsine avec de A à G, les 7 hélices transmembranaires et les boucles hypervariables les reliant ; en mauve le rétinol ; en jaune, l'énergie lumineuse ; en rouge le trajet des protons lors de leur translocation contre-gradient. Les acides aminés essentiels sont représentés ainsi que leur position dans la protéine et l'hélice dans laquelle ils se trouvent. Lys : Lysine, Asp : Acide Aspartique, Glu : Acide Glutamique, X : acide aminé impliqué dans l'adaptation spectrale (Leucine, Méthionine, Valine, Adénine ou Glutamine). Modifié d'après Nelson et Cox (2008), Spudich et Jung (2005) et Riedel *et al.* (2010).

Ainsi la longueur d'onde capturée par les organismes marins va dépendre en partie de l'environnement chimique mais également de la nature des chromophores présents, c.-à-d. des

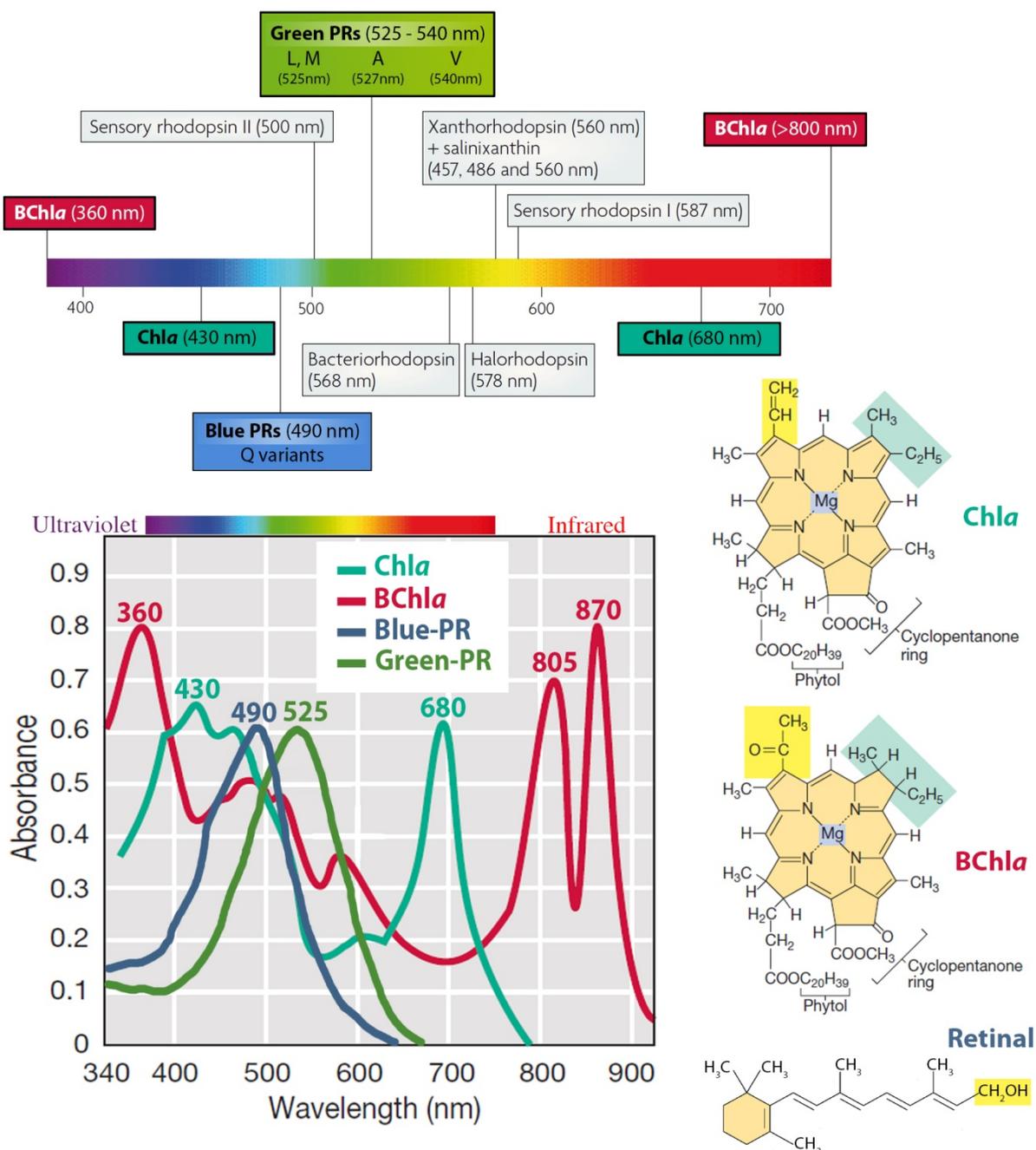


Figure 21. Principaux pigments bactériens et longueurs d'ondes captées dans les océans. En haut, les principaux pigments bactériens océaniques représentés sur le spectre des longueurs d'ondes visibles. En bas à gauche, les spectres d'absorbance *in vivo* des différents pigments traités dans cette étude, les pics non signalés par le chiffre de leur longueur d'onde sont dus à l'absorbance des pigments accessoires comme les caroténoïdes et varient selon le genre considéré, il est à noter que les pigments sur base chlorophyllienne possèdent des pics d'absorbances multiples et éloignés alors que les pics d'absorbance des pigments sur base rétinolique sont uniques. En bas à droite, les formules chimiques des molécules captant l'énergie lumineuse ; pour la Chl *a* et BChl *a* l'énergie lumineuse est captée par un hème tétrapyrrolique à magnésium (en orange), les groupements qui diffèrent entre Chl *a* et BChl *a* sont signalés en jaune et bleu. Pour le rétinol en revanche la structure est plus simple et l'énergie lumineuse est captée par un groupement terpène (2,6,6-triméthylcyclohexen-1-yl ; en orange). Le rétinol se lie à la lysine par le groupement alcool (en jaune) en formant en base de Schiff. Modifié d'après Fuhrman *et al.* (2008), Béjà *et al.* (2001) et Madigan *et al.* (2010b).

molécules capables d'emprisonner l'énergie lumineuse et de la redistribuer. Là aussi, 2 stratégies principales co-existent bien que les structures chimiques permettant la capture de l'énergie lumineuse sont toujours basées sur des cycles carbonés (Figure 21). La famille des chlorines, dont font partie les chlorophylles (comme les Chl *a* et BChl *a*), piège la charge apportée par le photon lumineux grâce à un hème à magnésium (une porphyrine) composé principalement par 4 pyrroles capturant les électrons et les transférant à l'ion magnésium (Scheer 1991). Par leur structure complexe et la diversité des groupements liés aux pyrroles, une seule chlorophylle est capable de capturer différentes longueurs d'ondes. Le rétinol, appartenant à la famille des caroténoïdes, est de structure plus simple et capte l'énergie lumineuse grâce à un groupement cyclohexenyl, la charge étant transférée jusqu'au bout de la chaîne carbonée par une suite de liaisons insaturées (Hubbard et Kropf 1958). La simplicité de ce système permet la capture d'une seule longueur d'onde par chromophore. Cependant, nous avons précédemment vu que l'environnement protéique peut changer la longueur d'onde excitant principalement le chromophore. Ces caractéristiques physiques vont en partie expliquer l'écologie des organismes phototrophes.

2.2. Importance écologique des bactéries photohétérotrophes

2.2.1. Outils d'étude

Les pigments, notamment chlorophylliens, ayant la caractéristique d'émettre une fluorescence lorsqu'ils sont excités à une longueur d'onde spécifique, il est possible, en théorie, de détecter les organismes qui les contiennent à l'aide de tout dispositif permettant de mesurer une telle autofluorescence⁴⁸. L'application de ces principes a permis la mise en évidence en 1979 par microscopie à épifluorescence⁴⁹ l'abondance des *Synechococcus* dont la phycoérythrine, un de leurs pigments accessoires, autofluoresce fortement dans l'orange quand elle est excitée dans le bleu (Johnson et Sieburth 1979, Waterbury *et al.* 1979). Une

⁴⁸ **Autofluorescence** : ou fluorescence naturelle, en opposition avec la fluorescence (dite secondaire) générée par une molécule, un fluorochrome, exogène et introduite dans un organisme pour rendre visible certaines structures (par ex. le DAPI faisant fluorescer l'ADN).

⁴⁹ **Microscopie à épifluorescence (IREM)** : contrairement à la microscopie optique classique utilisant une source de lumière blanche (spectre lumineux entier), cette technique utilise des filtres permettant de sélectionner les longueurs d'onde d'excitation (lumière venant frapper les cellules) ^{et/ou} d'émission (lumière émise en réponse à la lumière d'excitation) générée par fluorescence naturelle ou secondaire.

autre application utilisant le principe d'autofluorescence a permis la découverte des *Prochlorococcus* par cytométrie en flux⁵⁰ en 1988 (Chisholm *et al.*).

Toutefois, ces techniques sont limitées par la concentration en pigments des organismes considérés et si la détection des picocyanobactéries, possédant de fortes concentrations en pigments chlorophylliens ne pose pas de problèmes, il n'en va pas de même, surtout en cytométrie en flux, pour les BPAA qui possèdent de faibles concentrations en BChl *a*. Cependant le dénombrement des BPAA est possible en utilisant la microscopie à épifluorescence et a été utilisé pour la première fois en milieu pélagique par Kolber *et al.* (2001). Grâce à l'autofluorescence dans l'infrarouge (supérieur à 750 nm) de la BChl *a* quand elle est excitée dans le bleu (390 nm) et au marquage de l'ADN des bactéries par le DAPI, il est possible de visualiser spécifiquement les particules ayant de l'ADN et possédant de la BChl *a* (et non les particules inertes qui pourraient fluorescer dans l'infrarouge). Toutefois, les premières mesures obtenues dans les études pionnières utilisant cette technique surestimaient le nombre réel de BPAA. En effet, compte tenu du chevauchement du spectre d'absorption de la BChl *a* avec celui de la Chl *a* (Figure 21, bas gauche) d'une part, et avec celui de la phycoérythrine, un pigment accessoire présent dans les phycobilisomes chez *Synechococcus*, d'autre part, il est nécessaire de soustraire les particules positives à l'un de ces derniers signaux pour obtenir une estimation correcte des bactéries possédant de la BChl *a* (Schwalbach et Fuhrman 2005, Cottrell *et al.* 2006). Un exemple de comptage de BPAA en microscopie à épifluorescence est donné ci-dessous (Figure 22) et montre clairement la surestimation du nombre de BPAA comptées si seulement le signal de la BChl *a* était pris en compte. La microscopie à épifluorescence et la cytométrie en flux peuvent également être utilisées pour le dénombrement des bactéries hétérotrophes en utilisant des fluorochromes (artificiels) couplés à des sondes oligonucleotidiques ciblant un gène commun et abondant, le plus généralement le gène de l'ARNr 16S. Ce sont les techniques de FISH dont le signal peut être amplifié (CARD-FISH ; Pernthaler *et al.* (2002)) mais qui ne sont pas pour l'instant assez sensibles pour cibler les gènes peu abondants codant pour les structures impliquées dans la phototrophie des BPAA ou des B-PR. Bien que de récents protocoles de FISH spécifique de gène contenu en faible nombre de copie dans les organismes (geneFISH ; Moraru *et al.*

⁵⁰ **Cytométrie en flux** : technique permettant l'étude précise des particules (molécules ou cellules) isolées par un flux liquide ou gazeux à grande vitesse, en les comptant et en les caractérisant grâce à la diffusion intrinsèque de chaque particule lorsqu'elle passe devant le faisceau d'un laser.

(2010)) ont été mis au point, ils ne sont pas encore optimisés et utilisables, à notre connaissance, pour les BPAA ou les B-PR.

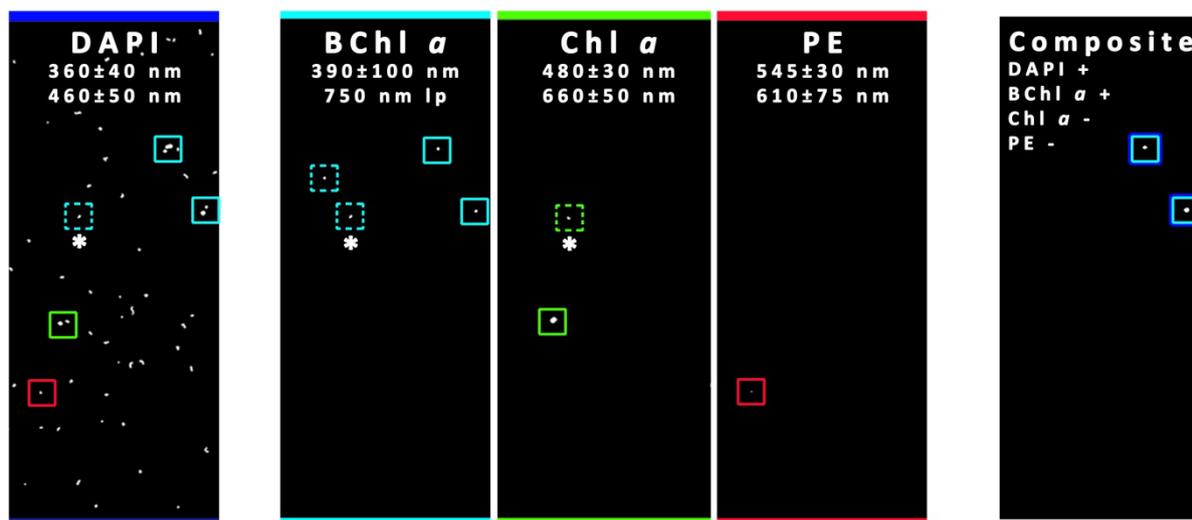


Figure 22. Exemple de comptage de BPAA en microscopie à épifluorescence. Le même champ microscopique (portion de filtre regardée sous microscope) est photographié avec 4 jeux de filtres d'excitation (valeur au dessus) et d'émission (valeur en dessous) différents : le premier (bleu foncé) pour visualiser toutes les particules contenant de l'ADN grâce au DAPI ; le second (bleu clair) pour visualiser les particules émettant un signal comparable à celui de la BChl *a* représentant potentiellement les BPAA ; le troisième (en vert) pour visualiser les particules émettant un signal comparable à celui de la Chl *a* représentant potentiellement les *Cyanobacteria* ; le quatrième (en rouge) pour visualiser les particules émettant un signal comparable à celui de la phycoérythrine représentant potentiellement les *Synechococcus*. La vue composite de ces quatre images présente les particules possédant de l'ADN avec un signal BChl *a* mais ne présentant pas de signaux Chl *a* ou phycoérythrine et donne ainsi le nombre de BPAA sur le champ microscopique. Les faux-positifs, c.-à-d. les particules présentant un signal d'autofluorescence sans correspondance en DAPI sont représentés par un carré en pointillé sur la prise de vue correspondante et, signalés avec un astérisque, un autre faux-positif montrant une particule avec de l'ADN mais avec superposition des signaux BChl *a* / Chl *a*, n'appartenant donc pas aux BPAA.

D'autres techniques permettant de quantifier les BPAA sont utilisées, en se basant toujours sur la présence de pigments spécifiques, en l'occurrence la BChl *a*, et leurs caractéristiques optiques. La fluorimétrie infrarouge à taux de répétition rapide (IRFRR) qui mesure la fluorescence spécifique à la BChl *a* d'un échantillon d'eau de mer, ou la chromatographie liquide à haute performance / pression (HPLC) qui permet de mesurer la concentration en pigment d'un échantillon, en font partie. La première a permis la mise en évidence pour la première fois de la grande distribution des BPAA dans les eaux océaniques (Kolber *et al.* 2000) mais souffre, tout comme l'HPLC, de son manque de sensibilité et de la nécessité de concentrer un grand volume d'eau de mer pour qu'un signal de BChl *a* soit détectable (Koblížek *et al.* 2005).

Toutes ces techniques, mise à part le FISH, se basent sur les caractéristiques optiques des pigments et ne permettent pas la discrimination des différents groupes phylogénétiques composant les BPAA. De manière plus critique, elles ne peuvent pas détecter les B-PR car le rétinale de ces dernières ne fluoresce pas lors de son excitation. Quantifier l'abondance d'un gène clé dans la synthèse de la structure de l'appareil phototrophe permet de résoudre ces problèmes même si les techniques permettant de le faire ne sont pas exemptes de biais et de contraintes. La plus utilisée de ces techniques est la PCR quantitative (qPCR) basée sur le suivi en temps réel de la formation de copies spécifiques d'un gène (amorces de PCR spécifiques du gène cible) par un fluorochrome spécifique de l'ADN double brin (mais pas spécifique du gène cible), le *SYBR Green* ou par la fluorescence de sondes spécifiques (*TaqMan*, *FRET*, *Molecular Beacons*, *Scorpion*). Cette technologie permet la détection et la quantification très fines de la présence (sur de l'ADN) ou de l'activité (sur de l'ADNc provenant de la rétrotranscription de l'ARN) d'un gène dans un échantillon naturel. Elle a été appliquée avec succès dans de nombreuses études environnementales sur les BPAA (Schwalbach et Fuhrman 2005, Du *et al.* 2006, Waidner et Kirchman 2007, 2008), en ciblant les gènes *pufM* ou *pufL* (codant pour les sous-unités PufM et PufL ; voir Figure 19) et les B-PR en ciblant le gène codant pour l'opsine (Campbell *et al.* 2008, Riedel *et al.* 2010). La spécificité des amorces utilisées limite la qPCR, au même titre que le FISH, qui est puissante pour un groupe phylogénétique précis (par exemple les *Roseobacter* BPAA) mais devient difficilement applicable pour quantifier la totalité d'un groupe fonctionnel (BPAA ou B-PR).

Ce fait souligne la dépendance de la qPCR (et en moindre mesure du FISH) vis-à-vis de la connaissance de la diversité du groupe fonctionnel visé. Le développement d'amorces dites « généralistes » (c.-à-d. permettant d'amplifier une grande diversité du même gène) ciblant le(s) gène(s) clé(s) dans la synthèse de la structure de l'appareil phototrophe chez les BPAA et les B-PR a permis les études de diversité de ces gènes. Dans la mesure des biais d'hybridation des amorces et d'amplification par PCR, cette technique permet de répertorier les groupes phylogénétiques réalisant une fonction, ici la phototrophie. Grâce notamment aux séquençages des souches cultivées (génomiques ou recherche spécifique de gène) ou à des cellules individualisées (SAG) appartenant au groupe fonctionnel ciblé, il est possible de lier gène spécifique et identité taxinomique (par l'ADNr 16S) et d'émettre des hypothèses sur les groupes écologiques présents dans l'environnement étudié. De plus, la comparaison des relations de parenté entre ces gènes et entre les organismes (basé sur l'ADNr 16S) permet de retracer l'historique de l'évolution et des mouvements génétiques de ces gènes par rapport à

l'évolution des bactéries qui les contiennent. De telles études ont été rendues possibles par les travaux pionniers dans le dessin d'amorces par Achenbach *et al.* (2001), Béjà *et al.* (2002) et Yutin *et al.* (2005) ciblant les gènes *pufM*^{et/ou} *pufL* dans le cas des BPAA et par Béjà *et al.* (2000), Sabehi *et al.* (2005) et Campbell *et al.* (2008) ciblant le gène codant pour l'opsine dans le cas des B-PR.

2.2.2. Diversité des photohétérotrophes

La diversité des *Cyanobacteria* capables d'activité hétérotrophe n'a pas encore été répertoriée en profondeur, et cela tient peut-être à la pluralité (et la spécialisation) des mécanismes d'incorporation ainsi que des molécules incorporées (voir § 2.1.1 et 2.1.2). L'essentiel des études reportant une activité hétérotrophe chez les *Cyanobacteria* porte sur les deux genres photosynthétiques les plus abondants dans l'océan, *Synechococcus* et *Prochlorococcus* (comme les études de Rippka *et al.* (2000), Zubkov *et al.* (2003, 2005), Church *et al.* (2004, 2006) et Malmström *et al.* (2005)) et reste peu connu chez les autres *Cyanobacteria*, bien qu'une telle activité ait été reportée chez les genres *Anabaena*, *Pseudoanabaena*, *Nostoc*, et *Planktothrix* (Montesinos *et al.* 1997, Zotina *et al.* 2003).

En revanche, la diversité des BPAA est de nos jours largement documentée principalement grâce aux techniques de biologie moléculaire ciblant les gènes *pufM*^{et/ou} *pufL* ou encore les données du GOS. Jusqu'au début des années 2000, la diversité des BPAA était principalement étudiée en utilisant les méthodes de culture classiques, leur facilité d'isolement n'y étant probablement pas étrangère. Les souches isolées appartiennent principalement aux *Alphaproteobacteria* et se répartissent en 4 groupes (Figure 23) : les familles dominantes en milieu marin sont les *Rhodobacterales* (α -3) et les *Sphingomonadales* (α -4), avec les genres dominants *Roseobacter* et *Erythrobacter*, respectivement. Parmi la cinquantaine d'espèces de BPAA isolée et répartie en une trentaine de genres (Yurkov et Csotonyi 2008), très peu appartiennent aux *Betaproteobacteria* (*Roseateles depolymerans* (Suyama *et al.* 1999) et *R. terrae* (Gomila *et al.* 2008)) et aux *Gammaproteobacteria* (*Congregibacter litoralis* (Fuchs *et al.* 2007), *Chromocurvus halotolerans* (Csotonyi *et al.* 2011)).

L'utilisation de techniques moléculaires pour répertorier la diversité environnementale du gène *pufM* (ou *pufL*) a mis en évidence, en l'espace d'une douzaine d'années, un nombre insoupçonné de variants du gène *pufM* dans des groupes phylogénétiques nombreux et

éloignés génétiquement. Ainsi le gène *pufM* est retrouvé non seulement chez les *Alphaproteobacteria* (Béjà *et al.* 2002, Oz *et al.* 2005) mais également chez les *Gammaproteobacteria* et les *Betaproteobacteria* dont l'abondance et la diversité étaient inattendues (Cho *et al.* 2007b, Lehours *et al.* 2010, Salka *et al.* 2011). Les études métagénomiques ont montré que des groupes de BPAA non cultivés et encore indéfinis représenteraient les groupes les plus importants dans les eaux pélagiques (Figure 24 ; Yutin *et al.* (2007)). Cette méconnaissance présageant de nouvelles découvertes dans l'écologie des BPAA pourrait s'expliquer par la difficulté, connue à l'heure actuelle, de cultiver des souches vivant en milieu pélagique oligotrophe. L'inconsistance entre les phylogénies basées sur l'ADNr 16S des BPAA (Figure 23) et sur le gène *pufM* (Figure 24) montre que ce dernier est polyphylétique⁵¹ suggérant un transfert latéral de gène à de multiples reprises (Igarashi *et al.* 2001, Cho *et al.* 2007b). Certaines données génétiques présenteraient des preuves de ces transferts comme la présence des gènes *pufM* et *pufL* dans un superopéron localisé dans un plasmide, élément génétique facilement transmissible (et non dans le chromosome) chez certaines souches de *Roseobacter littoralis* et *Sulfitobacter guttiformis* (Pradella *et al.* 2004, Petersen *et al.* 2012). Ces données sont encore controversées (Yurkov et Csotonyi 2008) et le manque de souche permettant d'obtenir la relation entre les gènes 16S et *pufM* ne permet pas encore de renforcer leur assise.

⁵¹ **Polyphylie** : retrouvé dans divers organismes n'ayant pas de relations de parenté directe.

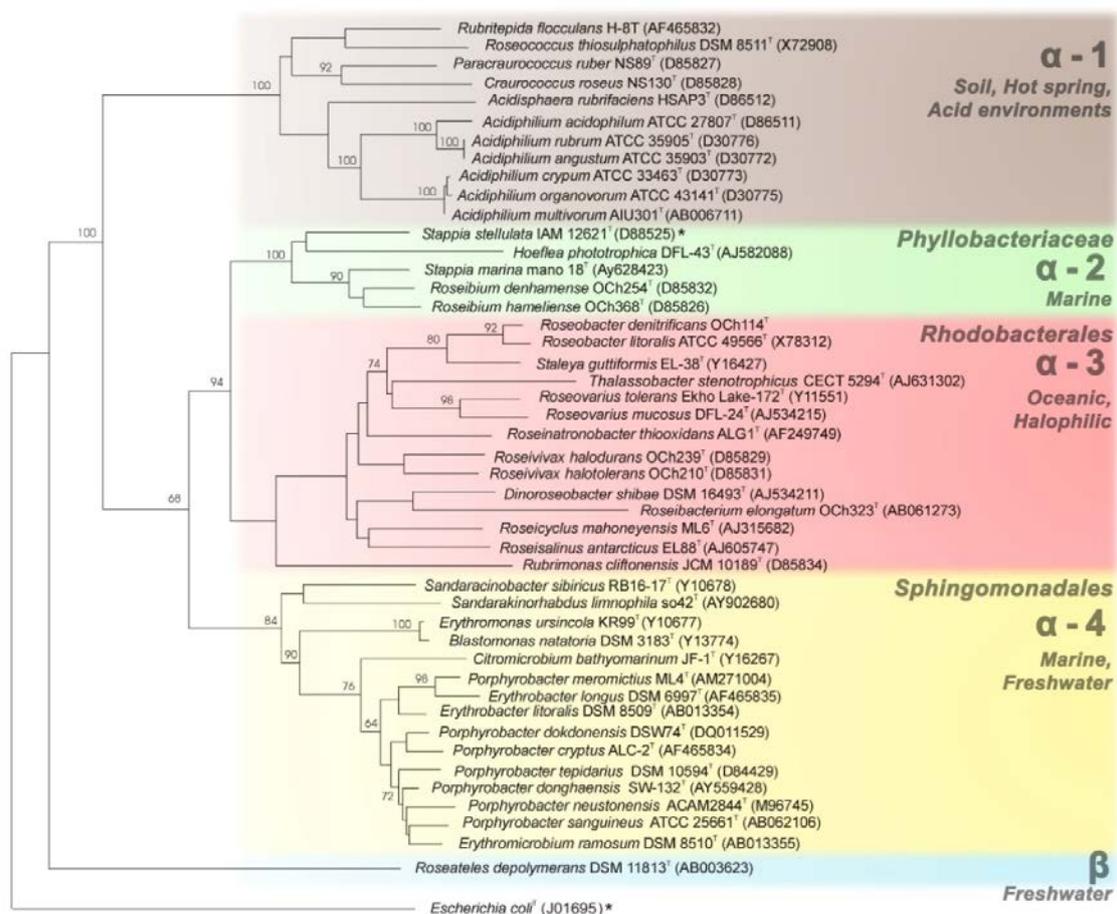


Figure 23. Arbre phylogénétique basé sur l'ADNr 16S des souches BPAAs connues en 2006. Sont indiqués à droite, la classe ainsi que l'ordre ou la famille mais également l'habitat des souches présentées. Modifié d'après Yurkov et CsoTonyi (2008).

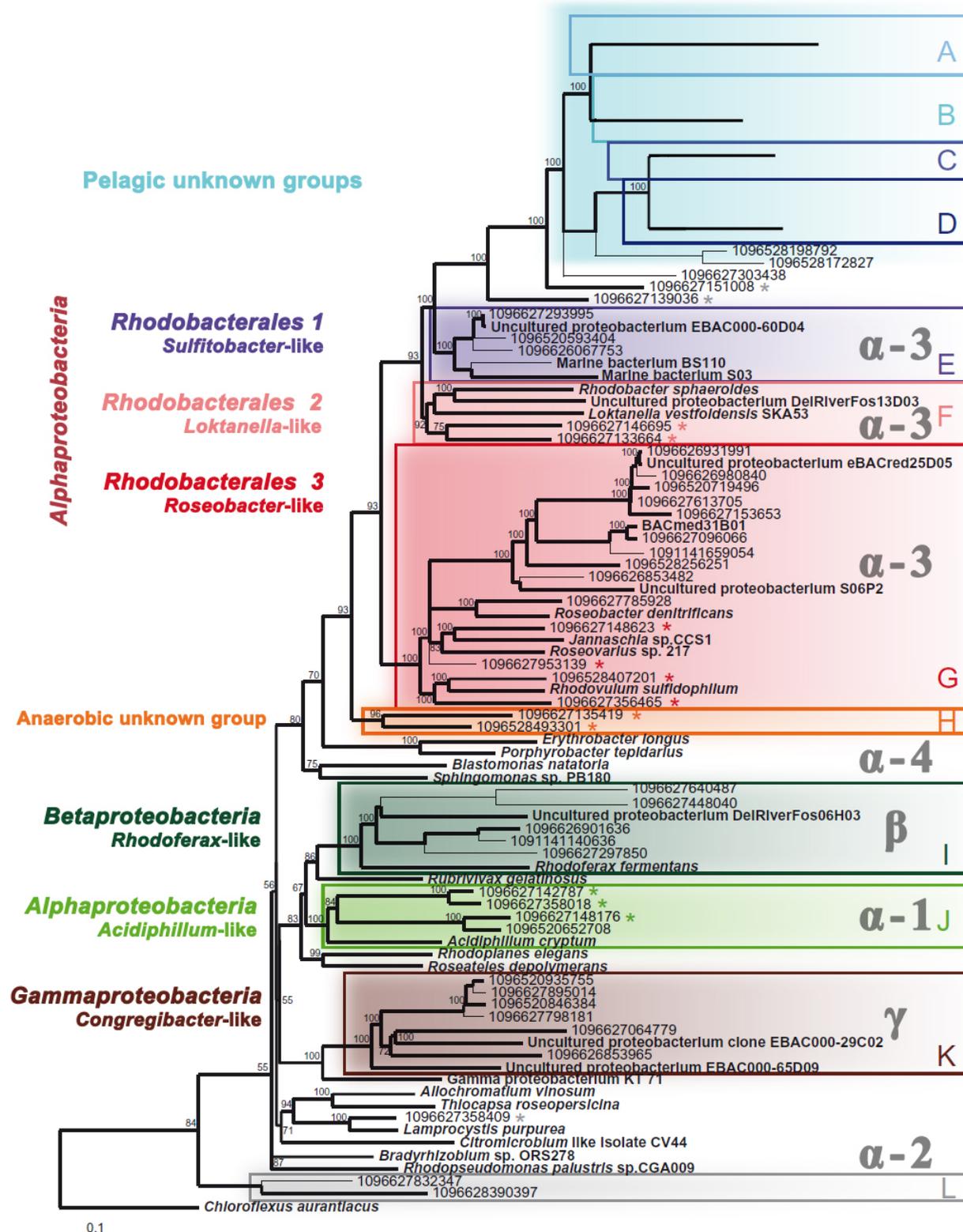


Figure 24. Arbre phylogénétique basé sur le gène *pufM* présentant les 12 phylotypes (de A à L) définis à partir des données du GOS. Les astérisques représentent les fragments d'ADN prélevés en milieu anoxique. Les phylogroupes A à D, représentant un grand nombre de séquences sans organisme cultivé de référence, ont été réduits. L'affiliation des groupes basée sur l'ADNr 16S (Figure 23) est présentée en gris à droite. Modifié d'après Yutin *et al.* (2007).

L'étude des B-PR a une histoire beaucoup plus récente et l'étude des isolats contenant de la PR est postérieure à celle de la diversité. En effet, la découverte de la PR s'est produite lors du criblage de banque de fosmidés⁵² (Béjà *et al.* 2000) et les études de diversité de la PR qui ont suivi sont basées sur des techniques moléculaires (Béjà *et al.* 2001, de la Torre *et al.* 2003, Venter *et al.* 2004, Rusch *et al.* 2007, Sabehi *et al.* 2007, Campbell *et al.* 2008, Cottrell et Kirchman 2009). Cela tient à la nécessité de passer par une identification *a posteriori* de la présence de la PR car cette dernière n'est pas identifiable par des techniques autres que moléculaires. Le criblage des collections de cultures de bactéries et de fosmidés ou cosmides (pouvant présenter à la fois les gènes 16S et codant pour l'opsine) a permis de mettre en évidence que le gène codant pour l'opsine était présent dans de nombreux groupes bactériens cultivés et incultivés. En effet, découverte initialement dans le large fragment génomique EBAC31A08 provenant du groupe SAR86 (groupe II) de *Gammaproteobacteria* incultivées (Béjà *et al.* 2000), la PR a été ensuite découverte chez de nombreux groupes d'*Alphaproteobacteria* (Béjà *et al.* 2001, de la Torre *et al.* 2003, Man *et al.* 2003) et dans d'autres groupes de *Gammaproteobacteria* comme les SAR92 (Stingl *et al.* 2007a), les SAR86 group I (Sabehi *et al.* 2004) ou le groupe OM60/NOR5 (Jang *et al.* 2011, Huggett et Rappé 2012) par criblage des bibliothèques de fosmidés ou séquençage de génomes. La très grande diversité au sein de la famille protéique des protéorhodopsines fut une des grandes découvertes des premières études de métagénomiques (Venter *et al.* 2004, Rusch *et al.* 2007) même si leur identification complète n'a pas été possible compte tenu du peu de références disponibles (culture ou fragment génomique). Le criblage des cultures a également permis de retrouver la PR chez le groupe cosmopolitain des SAR11 (*Alphaproteobacteria* ; voir § 1.3.3) avec sa présence chez *Candidatus Pelagibacter ubique* (Giovannoni *et al.* 2005a, Giovannoni et Stingl 2005) et autres membres de ce groupe (Oh *et al.* 2011a) et le groupe SAR116 (Oh *et al.* 2010), chez les *Gammaproteobacteria* avec les genres *Vibrio*, *Photobacterium* et *Glaciecola* (fondation Gordon et Betty Moore) ainsi que chez de nombreuses souches et SAG de *Bacteroidetes* / *Flavobacteria* (Gómez-Consarnau *et al.* 2007, González *et al.* 2008, Woyke *et al.* 2009, Riedel *et al.* 2010, Yoshizawa *et al.* 2012). Récemment, le séquençage de SAG a montré que le gène codant pour l'opsine est également présent chez les *Betaproteobacteria* et les *Deltaproteobacteria* (Martinez-Garcia *et al.* 2012). Des homologues

⁵² **Fosmide** : technique de biologie moléculaire permettant le clonage aléatoire de grands fragments d'ADN issus de l'environnement.

proches de la protéorhodopsine ont également été retrouvés chez les *Actinobacteria* d'eau douce (Sharma *et al.* 2008, 2009), chez des *Euryarchaeota* (Frigaard *et al.* 2006) ainsi que chez des dinoflagellés (Slamovits *et al.* 2011). En se basant sur la diversité du gène codant pour l'opsine, de nombreux autres groupes de PR ont été détectés, notamment dans les milieux d'eau douce (Atamna-Ismaeel *et al.* 2008), mais le manque de références ne permet pas de les identifier avec certitude.

Ici encore, l'incohérence entre les phylogénies basées sur les gènes 16S et codant pour l'opsine (Figure 25) ainsi que la diversité très large d'organismes possédant de très proches homologues laissent à penser que le gène codant pour cette structure a été acquis par de nombreux transferts latéraux. La très grande ressemblance entre la protéorhodopsine présente chez les bactéries marines et celle retrouvée chez les *Archaea* marines, proches des *Thermoplasmatales*, présentes dans la zone photique (Frigaard *et al.* 2006) a été l'un des premiers indices forts appuyant cette hypothèse. La découverte récente d'une rhodopsine proche de la PR dans le génome d'un virus géant infectant les protistes (Yutin et Koonin 2012) supporterait également que ce type d'acquisition de structure serait un processus important dans le cas de la PR comme cela semble être le cas pour l'acquisition des photosystèmes chez d'autres espèces. En effet, une des découvertes majeures ces dernières années est la présence dans des virus de cassettes géniques permettant la synthèse des photosystèmes I ^{et/ou} II des *Cyanobacteria* (Sullivan *et al.* 2006, Sharon *et al.* 2009, Alperovitch-Lavy *et al.* 2011). La grande diversité ainsi que le grand spectre infectieux des virus font que ceux-ci, dans leur course à l'efficacité pour se reproduire, pourraient représenter une force évolutive non négligeable voire essentielle dans l'évolution des espèces hôtes et leur écologie. Tous virus n'étant pas mortels à court terme (lytique), l'avantage écologique que peut apporter un gène à sa bactérie hôte (comme l'extension ou le changement de niche) peut amener à une persistance (fixation) de ce gène dans les populations et les génomes bactériens. Il est facilement imaginable que ces processus écologiques puissent s'appliquer à une structure si simple que la protéorhodopsine, facilement transposable (1 seul gène de courte taille < 800 pb, le rétinol (dérivé de carotène) pouvant être récupéré du milieu) et présentant potentiellement un avantageux rapport énergie apportée/coût de synthèse (Kirchman et Hanson 2012). Ces processus, venant compléter les processus bien connus de conjugaison et de compétence bactérienne, pourraient expliquer la très forte dissémination de cette structure au sein de groupes bactériens génétiquement distants.

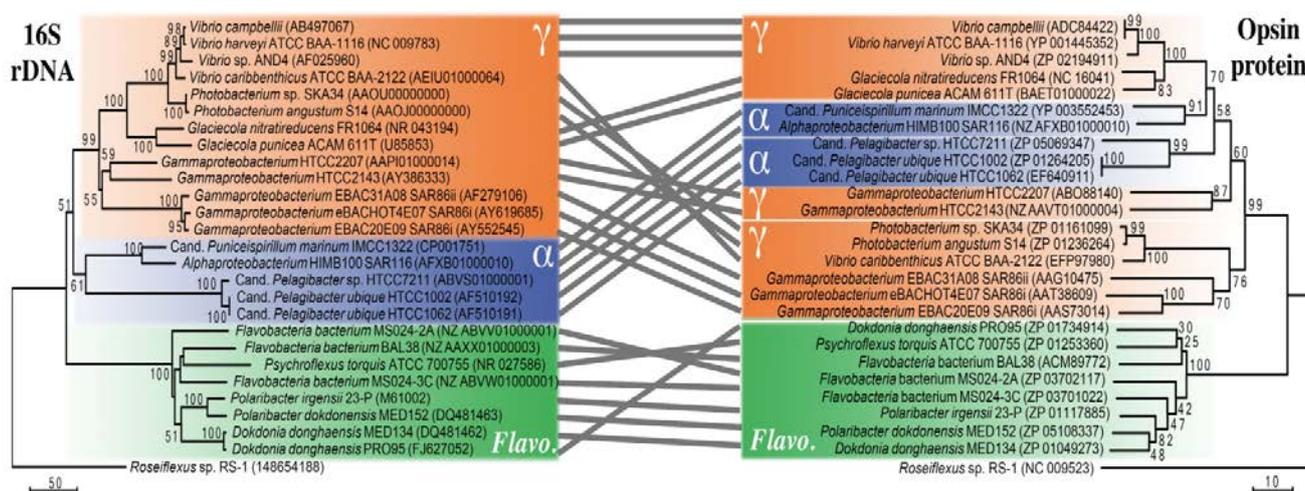


Figure 25. Comparaison entre les phylogénies basées sur le gène 16S (à gauche) et les protéines de l'opsine (à droite). Les phylogénies ont été construites à partir d'un choix de souches, SAGs ou fosmides contenant à la fois les gènes entiers codant pour la sous-unité 16S du ribosome et pour l'opsine, disponibles sur GenBank en décembre 2012. Les séquences d'ADNr du 16S ont été alignées en respectant la structure secondaire de l'ARN en utilisant MAFFT Q-INS-i et les séquences protéiques de l'opsine ont été alignées en tenant compte de la structure secondaire de la protéine en utilisant MAFFT E-INS-i (Kato et Toh 2008). Les reconstructions phylogénétiques ont été inférées par Neighbor Joining et testées avec un bootstrap de 1000 répliquas en utilisant MEGA5 (Tamura *et al.* 2011). L'échelle représente le nombre de positions différentes sur les 1216 positions communes pour le 16S et 154 positions communes pour l'opsine. Les correspondances entre les deux phylogénies sont matérialisées par les traits gris.

2.2.3. Importance numérique et distribution

Grâce au développement des techniques de cytométrie en flux et de la microscopie à épifluorescence (voir § 2.2.1), les picocyanobactéries ont été rapidement reconnues comme des groupes très abondants dans le bactérioplancton océanique (Waterbury *et al.* 1986, Chisholm *et al.* 1988). Le genre *Prochlorococcus* représente l'organisme photosynthétique le plus abondant de l'océan mais n'est présent significativement qu'en zones tropicales à subtropicales c.-à-d. entre 40°S et 48°N (Partensky *et al.* 1999b, Johnson *et al.* 2006). Cette répartition s'explique par la sensibilité de ce groupe à la température (Marchant *et al.* 1987). En revanche, le genre *Synechococcus*, moins abondant, est virtuellement présent dans tous les environnements marins (Partensky *et al.* 1999a) mais son abondance diffère grandement selon la région océanique considérée et semble plus importante dans les régions riches en nutriments (Moore *et al.* 1995). Les picocyanobactéries étant fortement liées à l'énergie lumineuse pour leur métabolisme, il existe une grande microdiversité, présentant des clades adaptés à différentes conditions lumineuses (écotypes), c.-à-d. une adaptation soit à de forte ou faible intensités lumineuses pour les *Prochlorococcus* (Rocap *et al.* 2002, Zwirgmaier *et al.* 2008, Huang *et al.* 2012). Toutefois, comme dit précédemment, les processus d'hétérotrophie facultative chez les *Cyanobacteria* sont encore peu étudiés mais il est

probable que ces derniers revêtent une fonction et une importance différentes selon le clade et les conditions environnementales rencontrées.

À leur découverte et pendant près de 30 ans, sur la base des environnements dans lesquelles les premières souches ont été isolées, les BPAA ont été considérées comme restreintes à des niches benthiques ou épiphytiques (sur le fond ou les algues) tout comme leurs consœurs anaérobies (BPAnAn). Dans le début des années 2000, Kolber *et al.* ont montré que les BPAA étaient en fait abondantes et largement distribuées dans l'océan côtier et pélagique (Kolber *et al.* 2000, 2001). Même si la technique utilisée dans cette étude pionnière (IRFRR) surestimait cette abondance, des études suivantes ont confirmé leur contribution non négligeable dans de nombreux écosystèmes marins (Schwalbach et Fuhrman 2005, Waidner et Kirchman 2007, Yutin *et al.* 2007). Les BPAA ont été également retrouvées dans de nombreux et divers écosystèmes marins et dulçaquicoles mais aussi fréquemment dans des environnements extrêmes en salinité ou acidité (Yurkov et Csotonyi 2003) laissant penser que leurs caractéristiques particulières apporteraient un avantage écologique voire compétitif. En milieu marin, se basant sur le potentiel gain d'énergie apporté par leurs capacités phototrophes, les premières études ont émis l'hypothèse que les BPAA seraient plus abondantes dans les eaux oligotrophes (Kolber *et al.* 2001). Cependant, très peu d'études quantitatives appuient cette hypothèse (Lami *et al.* 2007) alors qu'en revanche de nombreuses études montrent des tendances inverses avec de fortes abondances dans les environnements mésotrophes voire eutrophes (Schwalbach et Fuhrman 2005, Jiao *et al.* 2007, Koblížek *et al.* 2007, Yutin *et al.* 2007, Waidner et Kirchman 2008). Jiao *et al.* (2007) ont exploré l'abondance mondiale (entre 50°N et 50°S) des BPAA par IREM mettant en évidence qu'elles ont les plus fortes contributions dans l'océan Indien avec $3,8 \pm 1,8$ % du bactérioplancton suivi par l'océan Atlantique ($1,6 \pm 0,7$ %) puis par l'océan Pacifique ($1,1 \pm 0,7$ %). Bien que la contribution des BPAA dans la communauté bactérienne semble globalement faible, elle varie en fonction de la zone marine considérée. En effet, dépassant rarement les 2 % dans les eaux océaniques, les BPAA représentent entre 5 et 10 % dans l'océan côtier et peuvent dépasser les 10 - 15 % (jusqu'à près de 20 %) dans les estuaires (Schwalbach et Fuhrman 2005, Sieracki *et al.* 2006, Waidner et Kirchman 2007, Cottrell *et al.* 2010). Waidner et Kirchman (2007) ont confirmé, par l'analyse de la présence de gènes spécifiques à la vie microbienne anaérobie et aérobie, que les hauts pourcentages de BChl *a* enregistrés (par IREM et qPCR) dans l'estuaire du fleuve Delaware étaient bien imputables aux BPAA et non aux BPAnAn. Schwalbach et Fuhrman (2005) ont également validé les mesures d'IREM par

qPCR et ont trouvé que les plus basses valeurs de BPAA ont été mesurées par qPCR dans l'océan Antarctique avec 0,01 – 0,07 % de la communauté bactérienne.

En se basant sur les fréquences d'isolement des BPAA, Kolber *et al.* (2001) avaient également suggéré que le genre *Erythrobacter* (*Alphaproteobacteria*) représentait le genre de BPAA dominant dans l'océan de surface. Les données de FISH obtenues par la suite en Atlantique Nord par Cottrell *et al.* (2006), et des études basées sur le gène *pufM* (Béjà *et al.* 2002, Yutin *et al.* 2005) remirent en cause cette dominance au profit de celle de la famille des *Rhodobacterales* (*Alphaproteobacteria*). La dominance de ces familles de BPAA appartenant aux *Alphaproteobacteria* a par la suite été controversée dans de nombreux environnements, dans lesquels dominent certaines familles de BPAA appartenant aux *Gammaproteobacteria* (Hu *et al.* 2006, Yutin *et al.* 2007, Lehours *et al.* 2010) dans les milieux marins moins riches en nutriments, ou aux *Betaproteobacteria* (Salka *et al.* 2011) dans certains milieux dulçaquicoles. Il semble ainsi que les communautés de BPAA diffèrent selon la zone océanique et leur statut trophique, il est également imaginable que la photohétérotrophie joue un rôle différent selon le groupe bactérien considéré ^{et/}ou les conditions environnementales rencontrées.

Compte tenu de la difficulté à détecter leur structure phototrophe, la distribution et l'abondance des B-PR restent encore aujourd'hui mal connues. Principalement explorée par qPCR et approche métagénomique, notre vue de l'importance numérique des B-PR reste parcellaire et ponctuelle. Elles ont été estimées comme comptant au minimum dans la communauté bactérienne totale pour 50 % dans la mer des Sargasses (valeur maximale de 65 %), 23 % dans l'océan Atlantique nord (entre 7 et 57 %), 13 % en mer Méditerranée et 35 % en mer du Nord (Venter *et al.* 2004, Sabehi *et al.* 2005, Rusch *et al.* 2007, Campbell *et al.* 2008, Riedel *et al.* 2010). Ces quelques études en font un groupe fonctionnel numériquement plus abondant que les BPAA, du moins en milieu marin. Le choix des groupes quantifiés par qPCR ciblant le gène codant pour l'opsine, étant basé sur les groupes dominants dans les banques de clones (et la possibilité de dessiner des amorces spécifiques pour ces groupes), la grande majorité des quantifications porte sur des groupes appartenant aux *Alphaproteobacteria* tels que les SAR11, le groupe contenant les fosmides HOT2C01 ou RED17H08 (Campbell *et al.* 2008, Riedel *et al.* 2010). L'abondance des autres groupes bactériens contenant de la PR comme les *Gammaproteobacteria* est peu connue alors que ces

organismes sont pourtant très représentés dans les banques de clones de gènes codant pour l'opsine.

Comme vu au paragraphe 2.1.3, il a été mis en évidence 2 grands types de variants de la PR, l'un absorbant préférentiellement dans le vert et l'autre dans le bleu (Béjà *et al.* 2001, Man *et al.* 2003). Le fonctionnement des chromophores, et par là l'énergie que les cellules vont pouvoir en tirer, est également dépendant de la quantité mais surtout de la qualité de la lumière disponible dans l'environnement immédiat des organismes. Ceci représente un facteur très structurant des communautés microbiennes phototrophes en milieu marin (et dulçaquicole). En effet, la qualité de l'énergie lumineuse disponible (c.-à-d. les longueurs d'ondes disponibles) varie en fonction de la profondeur (atténuation physique dû à l'absorption des molécules d'eau et à la diffusion de la lumière) mais surtout en fonction de la concentration en particules (vivantes ou non) et molécules qui absorbent préférentiellement les longueurs d'onde dans le bleu et le rouge. L'eau dans les régions côtières ou fluviales riches en particules aura tendance à être de couleur verte contrairement aux régions éloignées des côtes et peu productives qui auront une couleur bleue (Figure 26). Comme il a pu être montré chez *Prochlorococcus* et *Synechococcus* avec des clades adaptés à la quantité ou à la qualité de la lumière (Johnson *et al.* 2006, Zwirgmaier *et al.* 2008, Huang *et al.* 2012), l'analyse de la répartition des variants bleus et verts de la PR soutiendrait que la variabilité du spectre d'absorption de la PR serait une réponse adaptative aux longueurs d'onde disponibles. Les variants bleus sont effectivement le plus souvent retrouvés dans les zones oligotrophes et en profondeur contrairement aux variants verts retrouvés préférentiellement en milieux côtiers ou en surface (Béjà *et al.* 2001, Sabehi *et al.* 2007, Fuhrman *et al.* 2008). Toutefois, ce modèle n'est pas complètement supporté, par exemple, en surface des mers des Sargasses et des Caraïbes, aucun variant vert de la PR n'a été détecté en banque de clones ou par approche métagénomique en dépit de la grande quantité de lumière disponible dans les longueurs d'onde vertes (Rusch *et al.* 2007, Sabehi *et al.* 2007).

De manière générale, la distribution des BPAA comme des B-PR correspond rarement à celle que les seuls processus phototrophes laisseraient imaginer. Ceci est en accord avec la vue d'une fonction facultative permettant l'apport d'une énergie supplémentaire à celle apportée par le métabolisme principal. Ainsi, la distribution des BPAA comme des B-PR est sans doute plus structurée par les facteurs régissant la distribution des organohétérotrophes purs telles que l'abondance de matières organiques et les limitations par des éléments

secondaires comme l'azote, le phosphore, le fer ou les processus biotiques structurants comme la prédation (voir § 1.3.4). Une étude récente calculant la balance entre coûts et bénéfices des structures phototrophes chez les BPAA et les B-PR par Kirchman et Hanson (2012) estime que la quantité d'énergie retirée de la phototrophie n'est probablement pas suffisante pour affecter la distribution et l'abondance de ces bactéries. Le bénéfice de la phototrophie chez les BPAA ne serait probablement pas suffisant pour permettre à cette forme plus complexe de photohétérotrophie (c.-à-d. impliquant la synthèse d'un grand nombre de partenaires protéiques) d'être plus abondante, particulièrement en milieu pauvre en matières nutritives. En revanche, bien qu'une PR apporte moins d'énergie qu'un photosystème, elle ne nécessite que la synthèse de l'opsine, le rétinol pouvant être récupéré dans le milieu ou résulté d'une césure d'un bêta-carotène. Le faible coût et le petit bénéfice énergétique de la phototrophie basée sur la PR peuvent se révéler suffisant pour assurer la persistance de la PR dans les génomes bactériens et expliquer sa grande occurrence même s'ils seraient insuffisants pour structurer la distribution des B-PR.

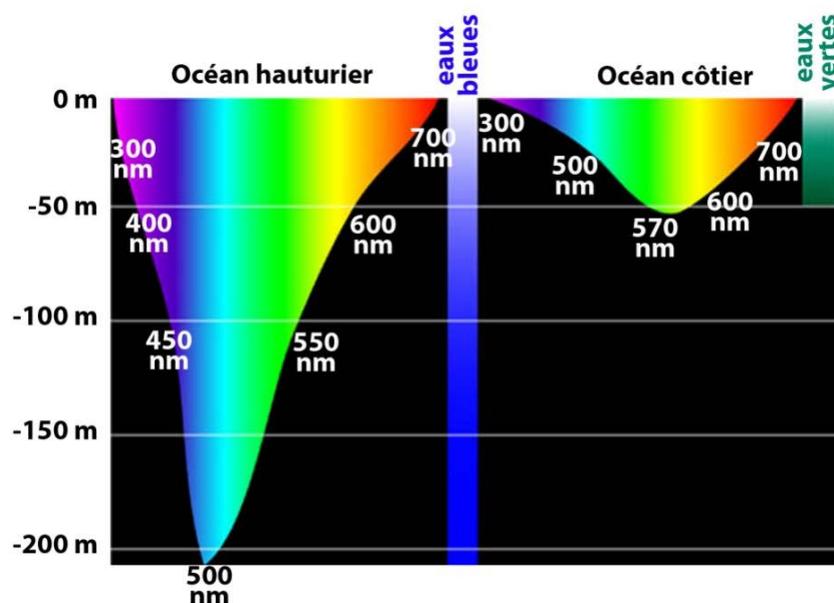


Figure 26. Pénétrations moyennes des longueurs d'ondes en fonction du type de zones océaniques. Les profondeurs sont moyennes et changent fortement en fonction de la concentration des particules. Modifié d'après <http://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/04deepscope/background/deeplight/media/diagram3.html> consulté en Décembre 2012.

2.3. Hypothèse sur le rôle et la fonction

2.3.1. *Plasticité écologique*

Les recherches menées sur la photohétérotrophie ces dernières décennies montrent que ce processus est loin d'être anecdotique et représente au contraire un mode métabolique très courant et répandu. Comme vu précédemment, la photohétérotrophie est supportée par différentes structures et voies métaboliques et ne revêt pas la même fonction selon les organismes considérés. Elle est, toutefois, très probablement impliquée dans les mécanismes de nutrition, c.-à-d. de génération d'énergie / composés cellulaires à partir de molécules de l'environnement. C'est également toujours une fonction facultative, c.-à-d. non essentielle à la croissance des micro-organismes placés en conditions optimales. En revanche, les conditions optimales de croissance sont rarement rencontrées par les microorganismes en milieu naturel et ils sont le plus souvent placés en conditions sous-optimales voire de survie et c'est dans ces derniers cas que les voies facultatives de nutrition / métabolisme ont la plus forte influence et contribuent à la plasticité écologique d'une espèce (c.-à-d. le panel de conditions environnementales dans lesquelles une bactérie peut persister^{et}/ou se reproduire). Ceci semble vrai autant pour l'hétérotrophie facultative apportant des composés coûteux à synthétiser ou riches en éléments nécessaires (limitant la nécessité de multiples imports) à des autotrophes comme les *Cyanobacteria*, que pour la phototrophie apportant potentiellement de l'énergie supplémentaire (sous forme soit de gradient de protons soit d'ATP) pour les hétérotrophes comme les BPAA ou les B-PR. Cependant, le rôle et la fonction exacts des différentes formes de photohétérotrophie bactérienne et l'avantage potentiel apporté *in vivo* sont actuellement peu connus mais de nombreuses hypothèses sont explorées actuellement.

2.3.2. *Croissance, nutrition et génération d'énergie*

Parmi les hypothèses les plus facilement imaginables, l'apport potentiel d'énergie supplémentaire par la photohétérotrophie pourrait augmenter la croissance des organismes la pratiquant. Testable en culture, il a été très tôt montré que certains membres des cyanobactéries étaient capables de pousser à l'obscurité en présence de sucres (Allison *et al.* 1937) et parmi elles certains membres des *Synechococcus* (Rippka 1972). Leur hétérotrophie facultative leur permettrait ainsi de croître dans des conditions dans lesquelles d'autres organismes photoautotrophes ne peuvent pas se développer, représentant un avantage écologique certain. Chez les BPAA, une croissance augmentée en culture illuminée par cycle

a, pour la première fois, été mise en lumière par Harashima *et al.* (1987) chez *R. denitrificans* puis a été confirmée chez d'autres souches d'*Alphaproteobacteria* appartenant aux genres *Erythromicrobium* (Yurkov et van Gemerden 1993) et *Erythrobacter* (Kolber *et al.* 2001) ainsi que plusieurs souches de *Rhodobacterales* (Biebl et Wagner-Döbler 2006). La réponse, tant au niveau croissance que quantité de protéines produites, est maximale quand l'illumination est cyclique et non continue et indique un apport important de la phototrophie à ces organismes organohétérotrophes. Toutefois, les réponses diffèrent dans leurs amplitudes selon les souches considérées mais également selon la richesse des milieux de culture utilisés pour les expérimentations. En effet, il semble que la réponse soit augmentée dans des conditions de privation (ou de très faibles concentrations) de matières organiques bien que l'intensité de cette réponse diffère selon le milieu d'origine des souches considérées, les souches ayant été isolées en milieu côtier (riche) réagissant plus fortement que celles provenant de zones oligotrophes (Biebl et Wagner-Döbler 2006). L'amplitude du phénomène observé est plus importante (et donc plus visible) chez des organismes adaptés à des conditions riches placés en conditions pauvres que chez des organismes habitués à la privation de nutriments. Des expériences similaires de croissance menées sur les B-PR sous divers régimes lumineux et d'abondance en matière carbonée ont montré un phénomène comparable appuyant cette hypothèse. En effet, Gómez-Consarnau *et al.* (2007) ont montré une croissance augmentée, en cycle lumineux et peu de matières nutritives disponibles, avec une souche de *Dokdonia* (MED134), un genre appartenant aux *Flavobacteriaceae*. Cependant, ce résultat n'a pas été reproduit avec d'autres souches testées que ce soit des B-PR appartenant aux SAR11, SAR86 (Figure 27), ni même des souches appartenant au même genre (*Dokdonia* sp. PRO95 ; Riedel *et al.* (2010)). La grande majorité des *Flavobacteriaceae* est abondante dans les zones riches en particules / nutriments et répond fortement et rapidement aux augmentations sporadiques de nutriments suivant les efflorescences algales (Bernardet et Nakagawa 2006) alors que les SAR11 et SAR92 sont des groupes oligotrophes. Ces deux illustrations, chez les BPAA et plus encore chez les B-PR, renforcent l'idée que la photohétérotrophie n'a probablement pas la même valeur, voire pas la même fonction, selon l'organisme considéré mais surtout selon son écologie. Il est donc important de considérer son implication écologique dans l'optique des préférences nutritionnelles, et des caractéristiques génomiques (dans le sens, voies de régulation et de nutrition présentes) des groupes bactériens présentant ce mode métabolique.

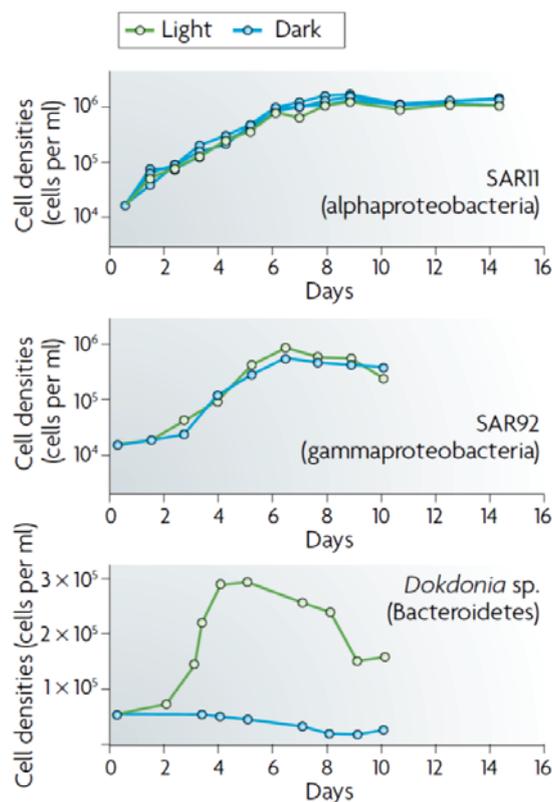


Figure 27. Comparaison de la croissance bactérienne de 4 B-PR cultivées en condition de cycles lumineux par rapport à l'obscurité permanente. Les isolats ont tous été cultivés en faible quantité de carbone disponible (<100 μ M). Modifié d'après Fuhrman *et al.* (2008), en haut : données issues de Giovannoni *et al.* (2005a) sur *Candidatus Pelagibacter ubique*, au milieu de Stingl *et al.* (2007a) sur des isolats de SAR92 et en bas de Gómez-Consarnau *et al.* (2007) sur *Dokdonia sp.* MED134.

L'importance de ce mode métabolique peut effectivement avoir d'autres impacts qu'un meilleur succès reproductif qui pourrait se révéler une réponse inadaptée vis-à-vis de certains contrôles écologiques comme la prédation ou le contrôle par la ressource (voir § 1.3.4). Koblížek *et al.* (2005, 2007) ont montré un recyclage rapide, jusqu'à 10 fois plus élevé que pour le reste du bactérioplancton, chez les populations naturelles de BPAA dans l'Atlantique. Compte tenu de faibles abondances, il est probable qu'elles sont alors soumises à de fortes pressions de prédation dans ces régions. Les fortes abondances enregistrées par ailleurs, peuvent en revanche traduire d'autres utilisations de l'énergie dérivée de la phototrophie. Salka *et al.* (2011), étudiant les BPAA dans des lacs riches en matières organiques, ont émis l'idée que l'énergie issue de la phototrophie serait utilisée pour dégrader de la matière organique réfractaire (comme les acides humiques) habituellement peu utilisée car coûteuse pour la cellule à dégrader. Cette niche spécifique pourrait expliquer alors leur succès écologique dans les milieux dulçaquicoles et les estuaires. Plus largement, la photohétérotrophie pourrait effectivement être impliquée dans la nutrition d'un point de vue

conceptuel. En effet, l'ATP généré par cette dernière pourrait permettre le fonctionnement de protéines impliquées dans le transport actif de molécules nutritives (Figure 28, droite). En outre, il pourrait également participer à des processus anaboliques autres que la croissance, telle que la synthèse d'un plus grand nombre ^{et/ou} diversité d'enzymes permettant la dégradation de la matière organique, en accord avec les potentialités génomiques de la cellule. Ces enzymes pouvant fonctionner à l'intérieur (endoenzymes) et augmenter le volume de molécules dégradées ou être sécrétées à l'extérieur de la cellule (ectoenzymes) et par leur action, rendre la matière organique plus facilement assimilable (transport moins coûteux ou tout simplement possible). De plus, même si de l'ATP n'est pas généré *via* une ATP synthase, le gradient de proton créé par l'action du système phototrophe peut également permettre le transport (*via* antiport ou symport) de molécules simples pouvant être impliquées dans la nutrition (Figure 28, gauche). En effet, l'étude de métaprotéomique comparative de Morris *et al.* (2010) a mis en évidence la place cruciale des transporteurs TonB-dépendant dans l'acquisition de nutriments des communautés de micro-organismes marins. Or ces transporteurs fonctionnent en utilisant un gradient de protons et la concomitante forte abondance de la PR dans ces protéomes a menée ces auteurs à supposer que le potentiel généré par la phototrophie pourrait servir à alimenter les activités de transports de nutriments.

2.3.3. *Processus de survie et succès écologique*

On peut alors aisément imaginer que le potentiel de protons généré par l'activité des systèmes phototrophes puisse servir également à d'autres fonctions sans lien direct avec la nutrition mais pourtant primordiales pour la cellule et sa survie. L'augmentation de la quantité de protons dans le périplasme va créer un gradient électrochimique nécessaire au maintien de l'intégrité membranaire et pouvant permettre de réguler l'équilibre osmotique de la cellule par l'activité des transporteurs ioniques échangeant des ions H⁺ (symport / antiport). En particulier, il est à noter que l'antiport Na⁺ / H⁺, présent chez de nombreuses bactéries dont la BPAA *Congregibacter litoralis* KT71 (Fuchs *et al.* 2007), pourrait jouer un rôle important dans la résistance au stress halin. De manière comparable, un homologue proche de la PR suspecté de pomper du sodium à la place de protons a été découvert très récemment chez une flavobactérie marine (Kwon *et al.* 2013) où elle coexiste avec une PR. Si leur fonctionnement est couplé, l'apport en protons (ou en sodium) de la phototrophie pourrait ainsi élargir les gammes de salinité ^{et/ou} de pH supportées par les bactéries concernées. Gómez-Consarnau *et al.* (2010) ont également montré que l'activité de la PR chez *Vibrio* sp. AND4 lui permettrait

de survivre plus longtemps en période de carence. L'étude de Steindler *et al.* (2011) a montré qu'il en serait de même chez un des membres du groupe SAR11. Ceci serait également cohérent avec l'atténuation des effets de la carence en conditions lumineuses et l'augmentation pigmentaire associée, observable chez de nombreuses BPAA comme *Dinoroseobacter shibae* (Biebl et Wagner-Döbler 2006). Comme discuté notamment par Fuhrman *et al.* (2008) et auparavant par Giovannoni *et al.* (2005a), la phototrophie chez les B-PR en milieux très limités en substances nutritives, pourrait permettre la survie dans des conditions drastiques en aidant au maintien d'un minimum d'ATP pour suppléer aux fonctions cruciales comme la réparation de l'ADN en phase dormante jusqu'à l'arrivée de meilleures conditions, leur permettant d'augmenter leur succès écologique à long terme.

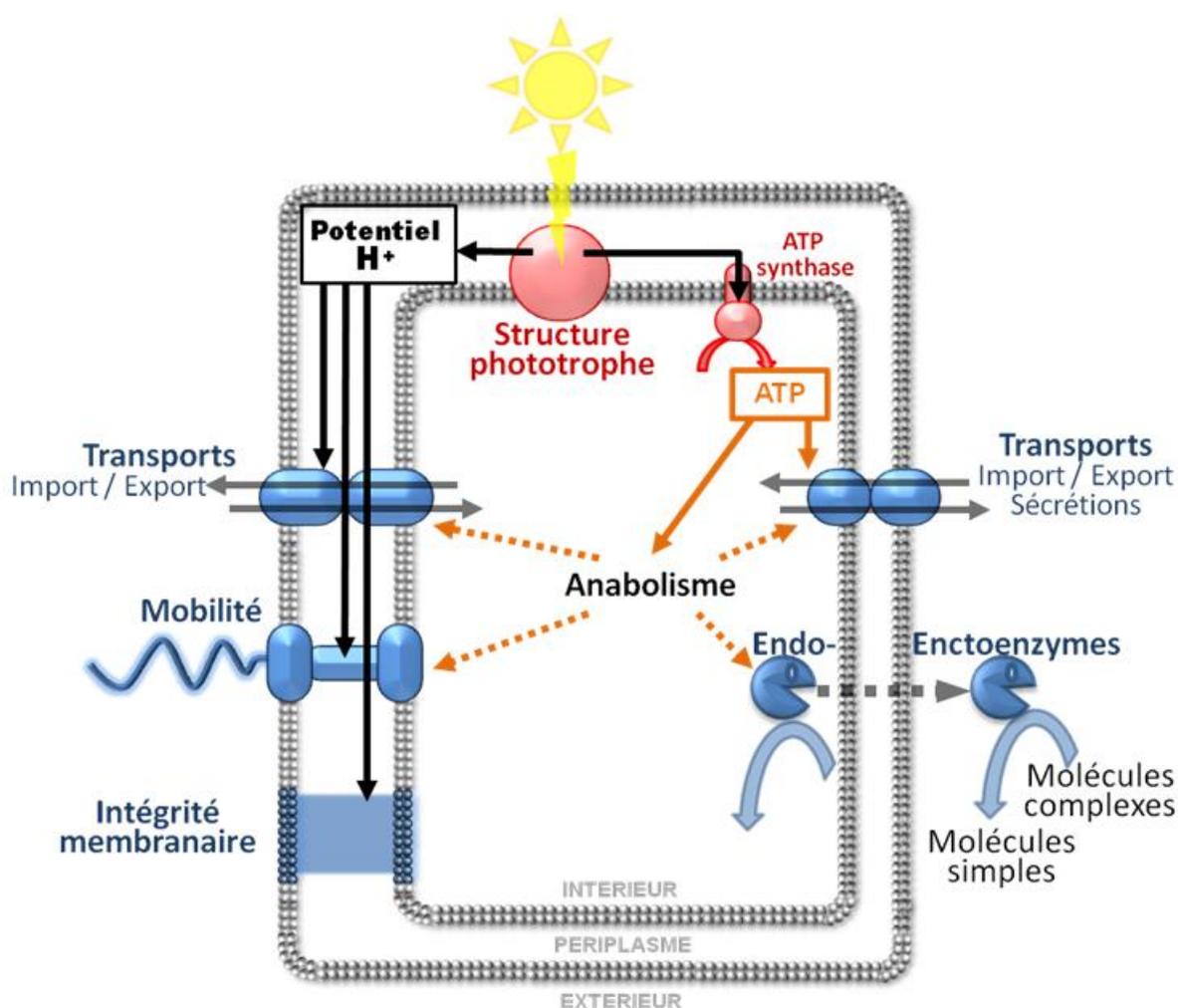


Figure 28. Fonctions bactériennes pouvant potentiellement bénéficier de l'apport énergétique, sous forme d'ATP ou de potentiel électrochimique de protons, fourni par les systèmes phototrophes (photosystème des BPAA ou protéorhodopsine des B-PR).

D'autres processus permettant d'augmenter le succès écologique des bactéries photohétérotrophes sont envisageables. La force proton-motrice (PMF) générée par la phototrophie pourrait également alimenter le moteur flagellaire (Figure 28, gauche) soit, selon le genre considéré, directement (Manson *et al.* 1977) soit après conversion en force sodium-motrice (SMF ; Chernyak *et al.* (1983)), possible notamment grâce aux antiports Na^+ / H^+ (Fuchs *et al.* 2007). Tipping *et al.* (2012), en transposant la PR chez *E. coli*, ont montré que la PMF générée uniquement par la PR en condition éclairée permettait le fonctionnement du flagelle. La PR, comme le photosystème des BPAA, pourrait ainsi participer au tropisme des bactéries mobiles (ce n'est pas le cas pour toutes, les SAR11 par exemple sont non-mobiles) et leur permettre d'accéder à des conditions plus favorables à moindre coût (la création d'une PMF par un autre processus nécessite un pompage actif consommant de l'ATP). Ce gain potentiel peut se révéler important, dans un contexte de compétition pour la ressource, pour les bactéries se nourrissant préférentiellement sur des particules qui ont des phases fixes, adhérentes aux particules, et des phases libres de recherche de ces dernières. Dans un contexte de compétition biotique, particulièrement important dans les communautés agrégées, l'énergie supplémentaire apportée par la phototrophie pourrait intervenir dans les mécanismes de défense/attaque (antibiotique, antifongique) ou de communication intercellulaire (*quorum sensing*) par la réduction du coût de synthèse et de sécrétion (nécessitant de l'ATP) de ces composés. Elle pourrait également intervenir dans d'autres processus consommant de l'énergie comme la virulence / pathogénécité et la conjugaison ^{et/ou} compétence (échange ou récupération d'informations génétiques).

Il est envisageable que l'importance relative de ces divers gains potentiels varie en fonction des conditions environnementales rencontrées et de l'énergie que les organismes peuvent en retirer. Ainsi, d'un point de vue écologique, la photohétérotrophie pourrait permettre la persistance de groupes bactériens dans des environnements ne correspondant pas à leur niche écologique de prédilection. D'un autre point de vue, la photohétérotrophie ne revêt pas la même fonction selon les caractéristiques physico-chimiques des écosystèmes considérés. Comprendre la réelle implication écologique ainsi que la prépondérance des facettes fonctionnelles possibles de la photohétérotrophie nécessite son étude dans des environnements divers mais surtout présentant de forts contrastes, conditions dans lesquels la photohétérotrophie pourrait présenter des aspects ^{et/ou} des réponses différentes mais surtout révéler son importance écologique.

CHAPITRE 3. L'Océan Arctique, extrême en changements

3.1. L'environnement arctique⁵³

3.1.1. Généralités

Connue depuis la Grèce Antique comme « *la Terre des Ours* » d'où elle tire son nom, l'Arctique (venant du grec ἄρκτος [árktos] signifiant « ours ») est bien moins une « *Terre* » qu'un océan contrairement à son opposé du pôle Sud, l'Antarctique, où du reste il n'y a pas d'ours polaire. Outre les explorations par les chasseurs, pêcheurs et commerçants, les premières expéditions purement scientifiques d'exploration de l'océan arctique commencèrent en 1773 avec l'expédition menée par le commandant anglais Constantine John Phipps (1744–1792) qui tenta de rejoindre le pôle Nord. Même s'ils n'atteignirent pas le pôle, ils explorèrent la mer du Groënland en mesurant les premiers relevés topographiques, les courants de Suède et du Groënland, ainsi que les premiers profils de températures et salinité. Les premières explorations systématiques des glaces commencèrent au XIX^{ème} siècle avec également la première expédition Russo-Suédoise *Vega* menée par Nils Adolf Erik Nordenskiöld (1832–1901) en 1878-79 qui rejoint, depuis la Russie, le détroit de Béring (passage du Nord-Est). En 1882 pris place la première année polaire internationale (IPY), coopération scientifique internationale regroupant 12 pays et 15 expéditions (dont 13 en Arctique) tendant à comprendre, d'un point de vue global, les phénomènes géophysiques en place en Arctique. L'expédition des Norvégiens Fridtjof Wedel-Jarlsberg Nansen (1861–1930) et Otto Neumann Sverdrup (1854–1930) fut la première à ouvrir les portes de l'exploration du centre Arctique avec la goélette *Fram* spécialement conçue pour la dérive dans les glaces des îles de Nouvelle Sibérie en mer de Laptev au Spitzberg pendant 3 ans de 1893–1896. Cette expédition fut notamment la première à confirmer que l'Arctique, contrairement à ce qui était imaginé pendant longtemps (Figure 29), est un océan profond et connecté (entre le Pacifique et l'Atlantique) encerclé de terres (Figure 30), à l'opposé de l'Antarctique qui est une terre

⁵³ Section faisant une synthèse des rapports de comités internationaux
 AMAP (1998). *AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Issues*. . Arctic Monitoring and Assessment Programme: Oslo, Norway.
 , CAFF (2001). *Arctic Flora and Fauna: Status and Conservation*. Edita: Helsinki.
 , ACIA (2005). *Arctic climate impact assessment*. Cambridge University Press.
 , IPCC (2007). *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, vol. 446. IPCC: Geneva, Switzerland.

entourée d'océan. En revanche, le pôle ne fut atteint qu'au début du XX^{ème} siècle, le premier à avoir revendiqué l'exploration fut Frédéric Cook en 1908 mais il aurait maquillé son réel trajet, puis Robert Peary en 1909 qui se serait trompé dans l'estimation de sa position, finalement, la première exploration confirmée reviendrait à Roald Amundsen et Umberto Nobile le 12 mai 1926.



Figure 29. « *Septentrionalium Terrarum descriptio* ». Description des Terres Septentrionales par Gérard Mercator en 1595, une des premières cartes représentant l'Arctique dans sa globalité. Il est à noter la représentation d'un continent central recouvert en permanence de glace avec des fleuves le perçant jusqu'au pôle Nord, qui selon une croyance du XII^{ème} siècle était un énorme minéral (aimant) noir (*Rupes nigra et altissima*). Toutefois, un pôle magnétique réel est représenté (un autre est mentionné plus bas) par un autre mont plus au nord (*Polus magnetis veridis*) résultant probablement des mesures effectuées par des marins.

Les terres entourant l'océan arctique peuvent être classées en 3 grands types : des hautes terres accidentées façonnées par les glaciers continentaux qui ont creusé de larges fjords ; de

vastes plaines et plateaux plats constitués de dépôts glaciaires, alluviaux et marins ; de hautes montagnes, découpées comme les Rocheuses canadiennes (continent Américain) ou érodées comme l'Oural (continent Eurasien). Du fait de son absence de terres centrales, plusieurs définitions peuvent définir la région arctique. Généralement, elle est délimitée par le cercle arctique correspondant à la latitude 66° 33' Nord à partir de laquelle le jour ou la nuit dure 24 heures lors des solstices d'été ou d'hiver, respectivement. D'un point de vue climatique, cette région est également définie par l'isotherme⁵⁴ des 10°C enregistrables en été (Juillet). Ecologiquement, une des délimitations des régions arctiques terrestres correspond à la zone à partir de laquelle les arbres ne peuvent plus pousser (Figure 30). Ces définitions reposent sur des paramètres cruciaux régissant les écosystèmes arctiques. La définition qui pourrait paraître la plus triviale, c.-à-d. la délimitation par une unique latitude, cache en fait l'un des paramètres les plus importants régissant partiellement le climat arctique mais influant également sur tous les écosystèmes de cette région du monde : la quantité de lumière incidente. En effet, compte tenu de l'inclinaison de l'axe de la Terre, de la forme de la Terre et de son ellipse autour du soleil, cette région reçoit d'une part peu d'énergie solaire (car l'angle d'incidence des rayons solaires est faible) et possède d'autre part un cycle lumineux fluctuant selon la saison allant de l'illumination permanente en été à la nuit permanente en hiver. L'énergie apportée sera donc plus forte en été qu'en hiver ce qui, en régissant en partie la chaleur disponible, permet la formation de glace de mer (calotte glaciaire) et d'eau douce (inlandsis, glaciers) ainsi que la persistance d'une couche de sol en permanence gelée, le pergélisol⁵⁵ (ou permafrost). Si ce paramètre est un acteur majeur de la régulation du climat, il est encore plus déterminant pour les écosystèmes. En effet, que ce soit par son action directe ou indirecte sur la température, ce paramètre va être critique pour de nombreux organismes vivants notamment les organismes photoautotrophes. La limite au-delà de laquelle les arbres ne poussent plus en est un exemple frappant. Toutefois, ce paramètre seul ne permet pas d'expliquer la grande variabilité du climat en Arctique qui connaît des différences extrêmes notamment en températures (d'une moyenne annuelle allant de 0°C à Mourmansk en Russie à -28°C à 3 000m dans le Groënland en passant par -16°C à Point Barrow en Alaska ou -18°C dans l'océan arctique central). Le climat arctique est hétérogène spatialement mais également temporellement et varie grandement d'années en années.

⁵⁴ **Isotherme** : frontière fictive matérialisant une température constante.

⁵⁵ **Pergélisol** : sous-sol gelé en permanence, au moins pendant deux ans.

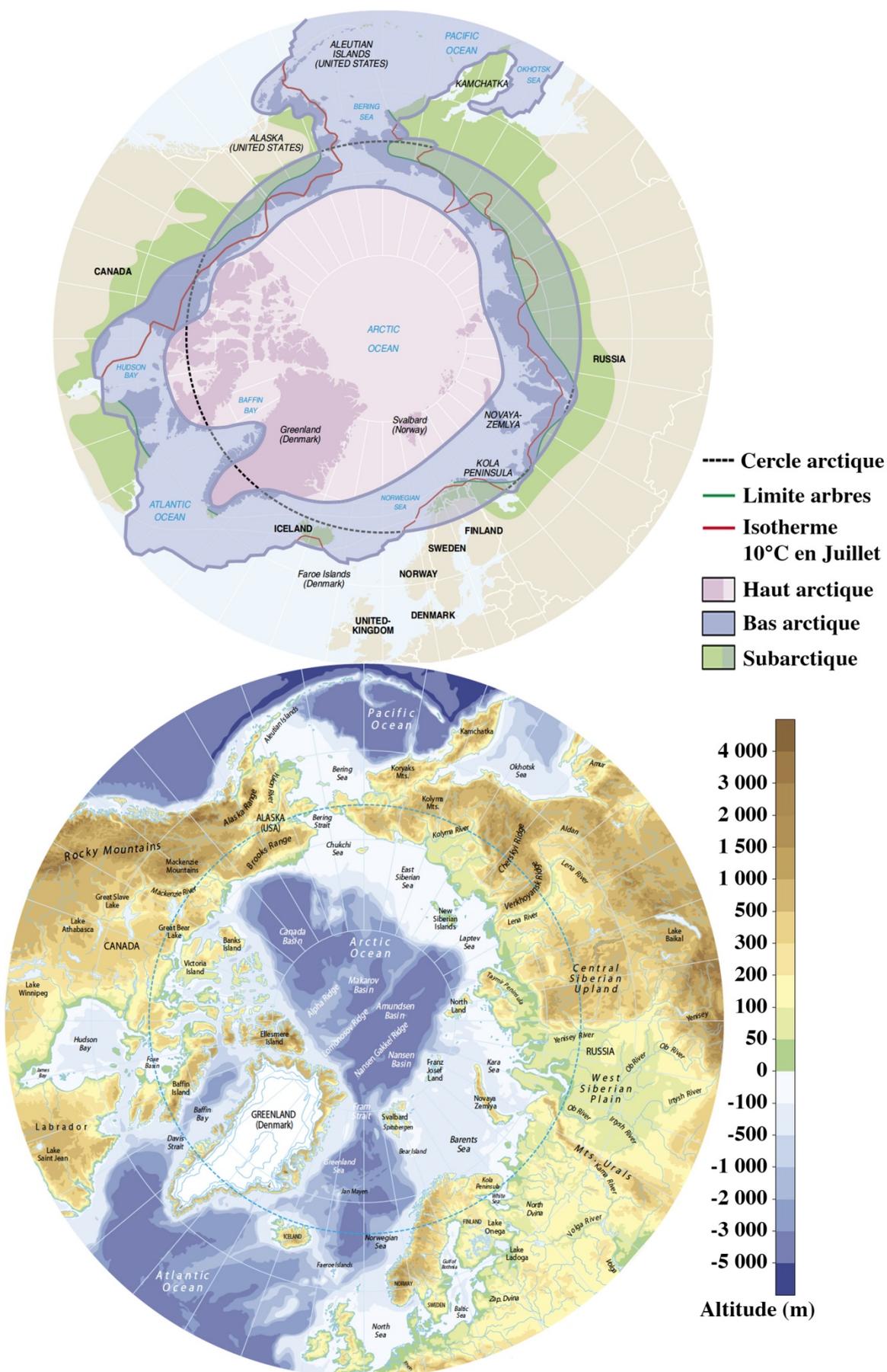


Figure 30. Délimitations (haut) et topographie (bas) de la région arctique. (Ahlenius *et al.* 2005)

3.1.2. L'océan arctique et sa courantologie

L'océan arctique est par plusieurs aspects le plus singulier des océans du globe. Il est le plus petit des 5 océans majeurs avec moins de 3% (soit environ 14 millions de km²) de la surface de la Terre (Pidwirny 2006). Son encerclement par les continents américain et eurasien, avec les seules ouvertures des détroits de Béring et de Fram ainsi que la mer de Barents, fait de lui un océan semi-clos, ce qui lui vaut le surnom de « Méditerranée Arctique » (Coachman et Aagaard 1974). Plus de la moitié de l'océan arctique est profond de moins de 200m car il contient plus de 30% des surfaces de plateaux continentaux, des plateaux escarpés en mer de Beaufort au très vaste plateau russe (Figure 30, bas). Le centre de l'océan arctique est un système profond qui se divise en 4 bassins dont 2 principaux, le bassin canadien et

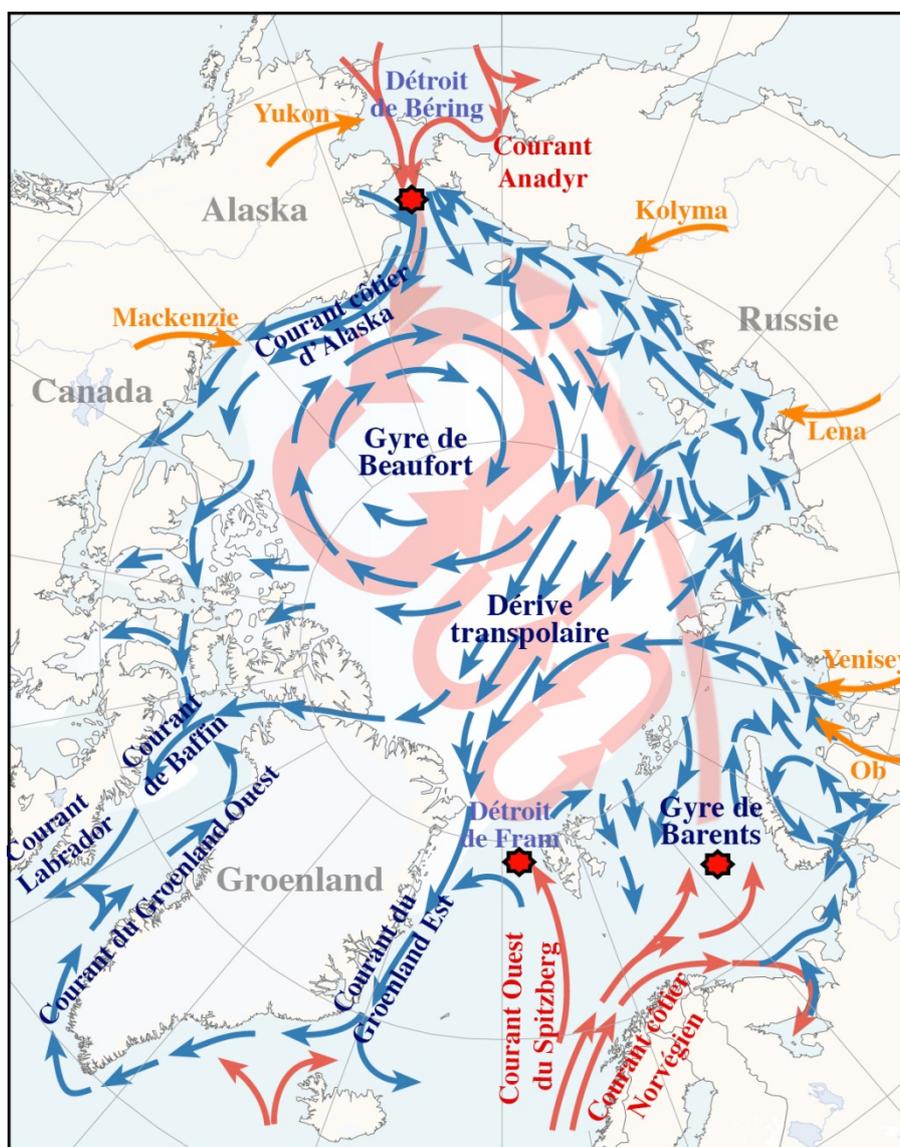


Figure 31. Principaux courants en Arctique. En bleu, les courants froids, en rouge les courants chauds des océans et en orange des principaux fleuves. Les étoiles rouges représentent le passage des eaux Atlantique et Pacifique sous la couche d'eau de surface. D'après l'AMAP (1998) et la CAFF (2001).

eurasien, séparés par la chaîne Lomonosov ; chacun de ces bassins pouvant être eux-mêmes séparés en 2 : le bassin du Canada (côté Pacifique) est séparé par les monts Alpha du bassin Makarov (central) et le bassin eurasien séparé en 2 par les monts Nansen-Gakkel formant le bassin de l'Amundsen (central) et celui du Nansen (coté Atlantique). La seule connexion d'eaux profondes entre l'océan arctique et les autres océans s'effectue par le détroit de Fram. En revanche, la circulation océanique de surface entre principalement par le détroit de Béring et coule à environ 800 000 m³/s (0,8 Sv) vers le détroit de Fram par la dérive transpolaire et au-travers l'archipel canadien *via* le courant côtier d'Alaska (Figure 31).

D'autres convoyeurs de chaleur importants pour l'océan arctique de surface sont les fleuves qui rejettent eaux douces et chaudes dans un milieu froid et salé. En effet, l'océan arctique ne contient que 1,3% du volume global des océans (Aagaard *et al.* 1985) mais reçoit près de 11% (soit environ 3 311 km³ par an) de l'eau douce déversée mondialement par les rivières (Shiklomanov 1998) ce qui fait des fleuves, en comparaison des autres océans, des acteurs disproportionnellement importants en Arctique (McGuire *et al.* 2009). Cinq principaux fleuves rejettent directement leurs eaux dans l'océan arctique (Figure 31), Yeniseï (620 km³/a), Léna (530 km³/a), Ob (404 km³/a), Mackenzie (307 km³/a) et Kolyma (132 km³/a), et un fleuve, le Yukon (205 km³/a), rejette ses eaux, dans le détroit de Béring, transportées par la suite dans l'océan arctique (Holmes *et al.* 2002). Toutefois, les débits des fleuves ne sont pas réguliers au long d'une année et sont soumis à une saisonnalité plus marquée qu'à plus basses latitudes. En hiver, compte tenu de la formation de glace et de neige, les débits sont réduits et la rencontre des glaces de mer et des glaces de terre forme des barrières physiques de glace plongeant jusqu'à une trentaine de mètres, nommées *stamukhi*, limitant fortement le mélange des eaux (notamment dû à des barrières de salinité). A la fin du printemps, quand la neige et la glace fondent, d'énormes quantités d'eaux douces sont bloquées par ces *stamukhi* et sont libérées brutalement lorsque ces dernières rompent (en général dans l'été). Les quantités massives d'eaux douces déversées font considérer, par certains auteurs, la surface de l'océan arctique comme un système estuarien de l'océan Atlantique (McClelland *et al.* 2012). Les eaux fluviales, moins denses, forment une lentille en surface et se mélangent avec les eaux issues de la fonte de la glace de mer ainsi que les précipitations (même si elles sont considérées comme faibles). Avec des apports en eaux de surface piégées dans le gyre anticyclonique de Beaufort, elles forment une masse d'eau dessalée d'une cinquantaine de mètres à la surface de l'océan arctique appelée la couche mélangée polaire (*polar mixed layer* ; PML ; Figure 32) de faible densité (Rudels *et al.* 1996).

Cette couche dessalée favorise la formation de glace et génère une forte halocline entre 50 et 200 m de profondeur. Par la favorisation du processus de formation de la glace, elle favorise également la formation d'eau dense et participe à la circulation thermohaline (« *global conveyor belt* »). Sous cette couche de faible densité plongent les eaux plus salées du Pacifique entrantes par le détroit de Béring et celles plus fortement salées provenant de l'Atlantique par le courant de Norvège et du Spitzberg (courants importants de 1 et 2 Sv dérivés du *Gulf Stream*). Ces eaux océaniques intermédiaires circulent en suivant les bordures des plateaux continentaux et les monts océaniques en formant des gyres cycloniques (Figure 31). Les eaux de surface du plateau continental, fortement dessalées, facilitent la formation de glace, comme le sel est rejeté de l'eau lors de la formation de la glace, la salinité des eaux sous-jacentes augmente. Quand la densité de l'eau devient critique (froid et salinité), elles chutent vers le fond et rejoignent les eaux profondes arctiques (*Arctic Bottom [Deep] Water*). Un autre processus de convection se produit au centre des gyres permettant le renouvellement ponctuel des eaux de fond. Ces eaux profondes, salées (S~35) et froides (inf. -1°C) stagnent dans les bassins et peuvent s'écouler ponctuellement (et uniquement) par la cataracte du détroit de Fram et du Danemark (Aagaard *et al.* 1985).

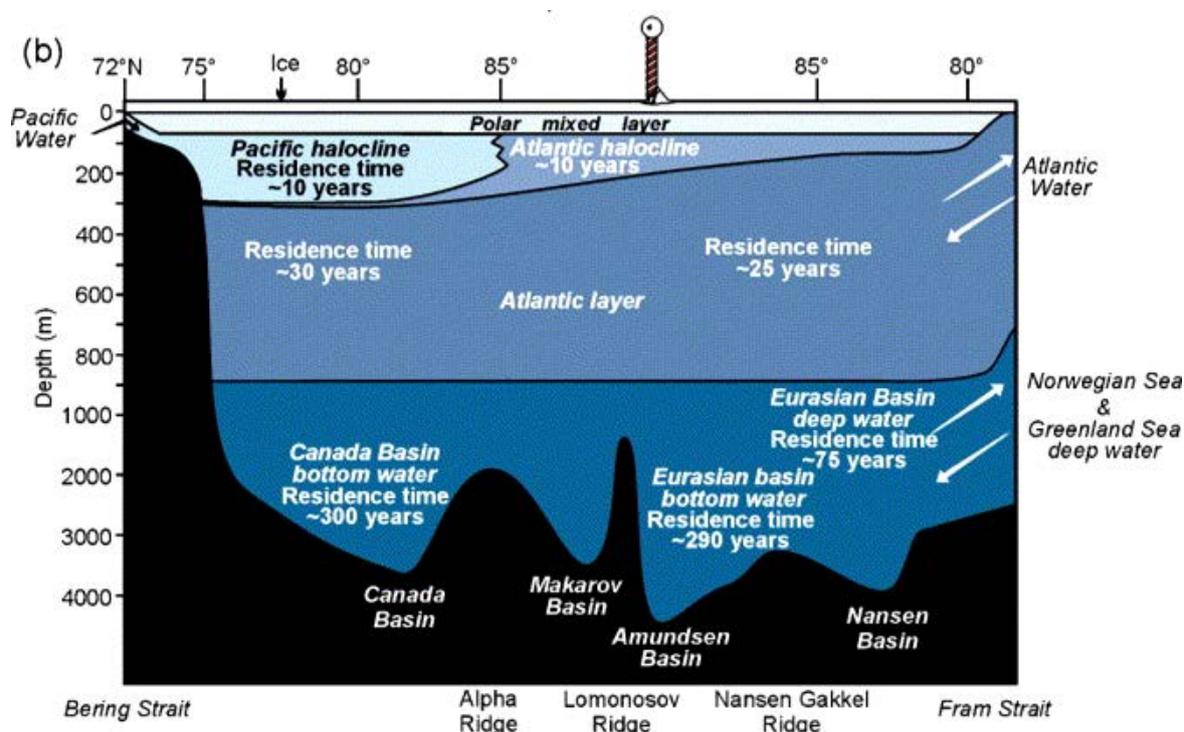


Figure 32. Profil en profondeur des masses d'eau arctiques et de leur temps moyen de résidence le long d'un transect du détroit de Béring au détroit de Fram. D'après Macdonald *et al.* (2005) et Stein (2008)

3.1.3. *Cryosphère et apports terrigènes*

La cryosphère⁵⁶ est une composante importante de l'Arctique qui se présente sous forme de neige, glace de terre, inlandsis⁵⁷ et glacier, glace de mer et calotte glaciaire ainsi que de pergélisol permanent ou temporaire. Les propriétés physiques de la neige et de la glace, comme une haute réflectance et une faible conductivité thermique (impliquant une chaleur latente haute pour fondre) contribuent significativement au caractère hétérogène, régional, du climat arctique. Elles ont effectivement une implication non négligeable dans le climat mondial. La glace de mer en particulier en représente un élément critique puisqu'elle réduit très significativement les flux d'échange de chaleur entre l'océan et l'atmosphère et par sa forte réflectance influe fortement sur le budget radiatif de toute la région arctique. En effet, l'albédo⁵⁸ de l'eau est faible (0,1) alors que celui de la glace est fort (0,6 à 0,8), autrement dit, une grande majorité (de 60% à 80%) des radiations arrivantes sont réfléchies, ce qui se traduit par de plus faibles chaleurs transmises au milieu et de basses températures. L'albédo est également un paramètre non négligeable dans de nombreuses rétroactions climatiques comme l'effet de Serre. L'océan sous-jacent perçoit également moins de lumière donc moins d'énergie (phénomène s'accroissant avec l'accroissement de l'épaisseur de la glace), ce qui affecte la production primaire océanique et ainsi les écosystèmes marins.

La glace de mer est présente sous deux formes principales, la glace saisonnière (vieille de moins d'un an), de quelques dizaines de centimètres à deux mètres, et la glace pérenne (vieille de plusieurs années), de plusieurs mètres d'épaisseur (jusqu'à 8 m). La glace de mer connaît une saisonnalité très marquée, notamment dans les zones côtières (où elle est principalement saisonnière) et répond très sensiblement aux changements dans les circulations atmosphériques, la quantité d'énergie lumineuse perçue, ainsi qu'aux flux de chaleur atmosphériques et océaniques. Elle recouvre la totalité de l'océan arctique en hiver, couvrant environ 14 millions de km², en été en revanche, seules les glaces pérennes persistent (calotte glaciaire) et ne représentent qu'environ la moitié de l'aire d'hiver (Cavalieri *et al.* 1997). La calotte glaciaire dérive avec les courants de surface, le gyre de Beaufort accumulant la glace en Centre Arctique et le courant transpolaire la transportant vers la mer du Groënland et de

⁵⁶ **Cryosphère** : portion de la Terre où l'eau est présente à l'état solide.

⁵⁷ **Inlandsis** : nappe de glace très étendue recouvrant la terre ferme et pouvant atteindre plusieurs centaines de mètres d'épaisseur.

⁵⁸ **Albédo** : rapport de l'énergie solaire réfléchi par une surface à l'énergie solaire incidente. C'est une grandeur sans dimension (de 0 à 1), comparable à la réflectivité.

Norvège (en moyenne à environ 2 cm/s mais pouvant aller jusqu'à 10 cm/s). En moyenne, 10% de la glace de mer sort de l'Arctique chaque année par le détroit de Fram. On différencie la glace de mer se formant lentement de la glace de terre se formant très rapidement et pouvant également se répandre sur les eaux côtières.



Figure 33. Répartition du pergélisol en Arctique.

Les faibles températures moyennes présentes dans l'Arctique, permettent également le maintien de terres en permanence gelées, quelque soit la saison. Dans les zones de pergélisol, on appelle « couche active » la couche supérieure du sol qui, au gré des saisons, gèle et dégèle et sur laquelle peut se développer la toundra. Sous cette dernière s'étend le pergélisol qui est dit continu lorsqu'il forme plus de 80% de la masse terrestre, et discontinu lorsque cette proportion se situe entre 30 et 80%, le reste étant du talik (zones non gelées à l'intérieur du

pergélisol), et sporadique lorsqu'il occupe moins de 30% de la masse. De quelques centimètres à plusieurs centaines de mètres (jusqu'à 1 500 m), le pergélisol est également très étendu et dépasse le seul territoire de l'Arctique (il représente à lui seul près de 24% de l'hémisphère Nord, Figure 33). Il représente un important compartiment dans la régulation du climat terrestre. En effet, il séquestre d'énormes quantités de gaz à effet de serre, générées en partie par l'activité bactérienne anaérobie, comme le méthane (CH₄) et le dioxyde de carbone (CO₂), stockés principalement sous forme solide d'hydrate de gaz très sensible à l'augmentation de la chaleur. Il représente également un puits important de séquestration de carbone, très ancien et en majorité réfractaire (plusieurs milliers d'années).

Les rivières arctiques drainent en grande partie ces régions, et les 5 grands fleuves qui se jettent en Arctique ont des bassins de drainage très étendus (Tableau II) et souvent complexes (grands lacs, nombreux affluents et grands deltas). Elles transportent une très grande quantité de particules et ont une importance capitale en Arctique. En effet, les concentrations en nutriments montrent de forts gradients régionaux entre des milieux oligotrophes dans le gyre de Beaufort à des systèmes très riches comme le plateau de la mer des Tchouktches (mer de Chukchi) (Gradinger 2009). Les rivières, outre leurs apports en eaux douces cruciaux dans l'hydrologie et la climatologie arctique (voir § 3.1.2), ont également des panaches qui s'étendent jusqu'à plusieurs centaines de kilomètres en mer apportant avec eux de grandes quantités de nutriments et minéraux, soutenant la productivité des eaux de surface. Les rivières apportent un contenu en particules qui n'est pas fonction de l'importance de leur

Tableau II. Flux moyens en eaux douces, particules et carbone organique déchargés dans l'océan arctique par les grands fleuves. Les dégradés de couleurs symbolisent le rang de chaque fleuve en fonction de ce paramètre. D'après Gordeev *et al.* (1996), Holmes *et al.* (2002) et Stein (2008).

Fleuves majeurs	Continent	Bassin versant (10 ⁶ km ²)	Débit (km ³ /a)	Particules en suspension (10 ⁶ t/a)	Flux de carbone terrigène		
					COD (10 ⁶ t/a)	COP (10 ⁶ t/a)	COT (10 ⁶ t/a)
Yenisei	Eurasie	2,62	620	14,4	4,9	0,5	4,6
Léna	Eurasie	2,49	523	20,7	3,6	1,2	4,8
Ob'	Eurasie	2,98	404	15,5	3,7	0,4	2,9
Kolyma	Eurasie	0,68	122	10,1	0,5	0,3	1,0
Mackenzie	Amérique	1,81	330	124,0	1,3	2,1	4,1
Yukon*	Amérique	0,85	205	54	-	-	-
Total	Eurasie		2 944	112	19,4	4,1	25,7
Total	Amérique		367	125	1,9	2,2	4,3
Total	Arctique	15,5	3 311	237	21,3	6,3	30

* Le Yukon ne se jette pas dans l'océan arctique *sensu stricto*, il ne rentre pas en compte dans les totaux.

débit mais plus de la nature de leurs bassins versants, ce qui explique cette grande différence de contenu en carbone organique entre les fleuves eurasiens et américains (Tableau II). De surcroît, les estimations de flux présentées ici se reposent sur des mesures en aval des embouchures des fleuves, la totalité du matériel particulaire ne se déverse pas dans l'océan arctique notamment à cause d'un processus de précipitation rapide se produisant à l'interface eaux douces/ eaux salées appelé filtre marginal (Figure 34). Ce processus dépend en grande partie de la topologie de l'estuaire et de la vitesse des eaux de la rivière. Il est estimé par exemple que seule la moitié des sédiments transportés par le Mackenzie et que seulement entre 10 et 30% des sédiments transportés par le Yenisei, l'Ob' et le Léna passent leurs vastes deltas (Stein 2008).

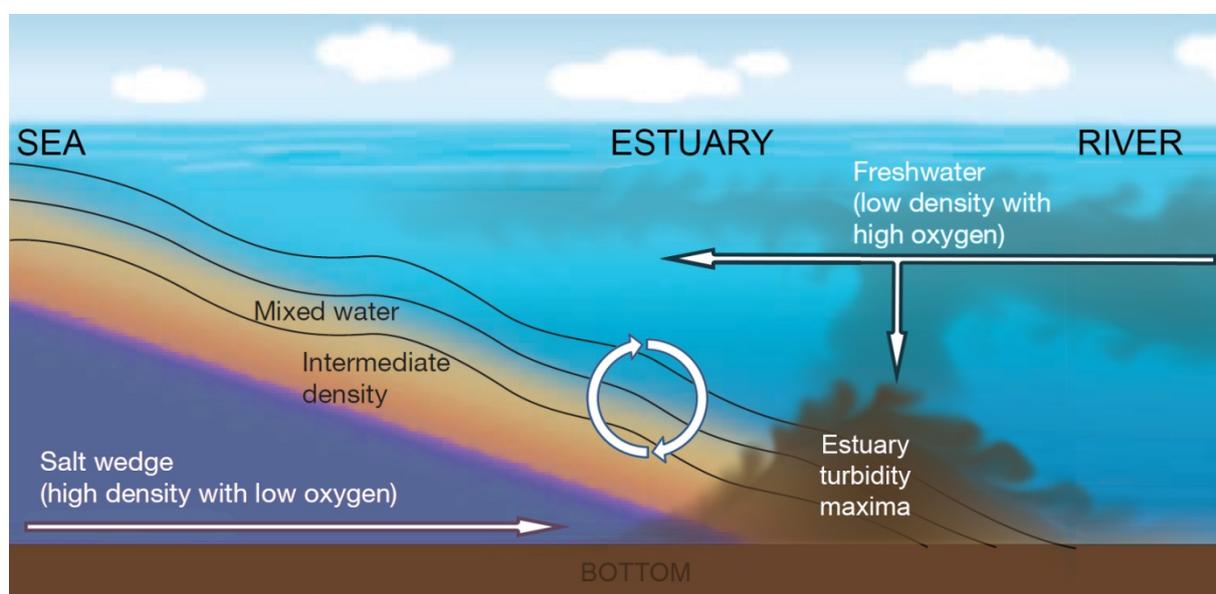


Figure 34. Processus de précipitation accélérée des particules et accumulation en maximum de turbidité (ETM) à la frontière entre eaux douces et intrusions marines. Les eaux douces moins denses ne se mélangent pas aux eaux marines plus denses qui s'infiltrent en suivant le fond. Ce front de salinité provoque l'agglomération et la précipitation d'une partie des particules transportées par la rivière, une autre partie (particules plus fines) poursuit dans les eaux de surface.

L'érosion côtière est également un processus important dans les flux de carbone et de particules versant dans l'océan arctique. Bien que ce soit un processus plus hétérogène car il dépend principalement de la qualité du sol, l'érosion côtière peut surpasser largement le transport fluvial dans certaines zones composées principalement de dépôts fluviaux ou glaciaires, comme la mer de Laptev, où le double de la quantité de sédiments est apporté par l'érosion. De même, dans la mer de Beaufort en Alaska, l'apport sédimentaire provenant de l'érosion est 7 fois supérieur à celui des rivières (Rachold *et al.* 2000). En revanche, dans la mer de Beaufort canadienne, le Mackenzie est la source principale de sédiments et

l'importance relative de l'érosion côtière est nettement moins importante (Macdonald *et al.* 1998). La teneur en carbone organique toutefois, diverge selon le sédiment considéré, par exemple, en mer de Laptev $58,6 \cdot 10^6$ t/a sont déversées mais le COT n'en représente que $1,8 \cdot 10^6$ t/a (3%) alors qu'en mer des Tchouktches $70 \cdot 10^6$ t/a de sédiments ne contiennent que 1,1% de COT ($0,8 \cdot 10^6$ t/a) ; il en est de même en mer de Beaufort où le COT représente 1,1% des $7,9 \cdot 10^6$ t/a de sédiments déversés (Stein 2008).

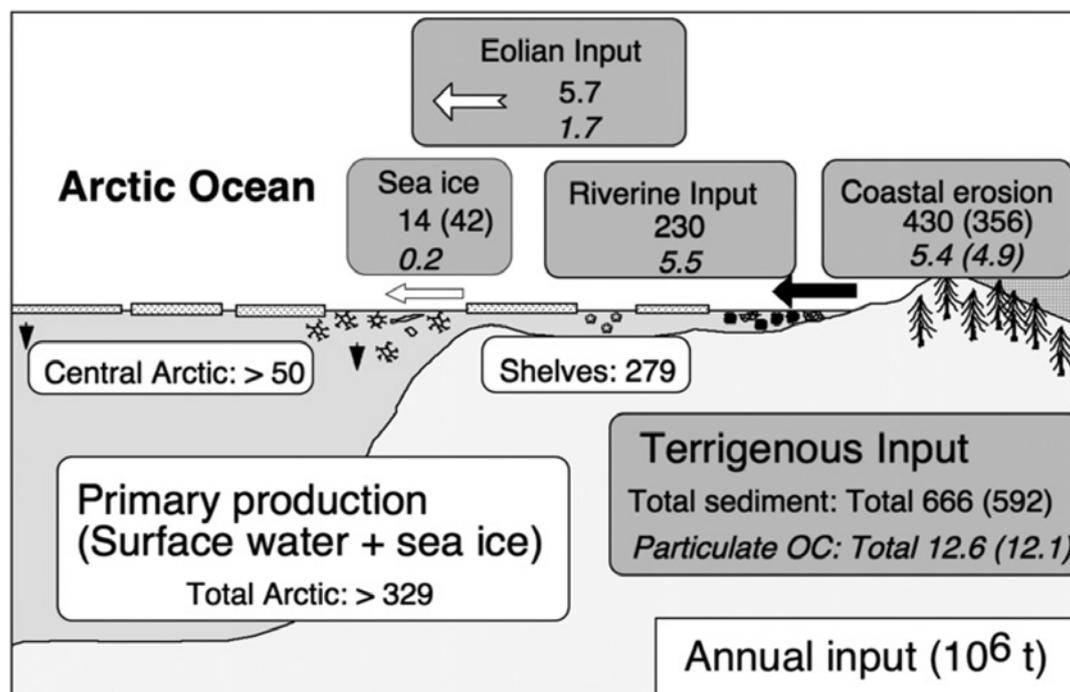


Figure 35. Estimations actuelles des flux entrants de sédiments et carbone organique en Arctique (en gris) et de carbone produit en milieu marin (en blanc, voir § 3.3.1). En parenthèses, les estimations divergentes de l'érosion côtière par Vasiliev *et al.* (2005).

L'ensemble de ces processus (Figure 35) mènent à une estimation actuelle globale d'environ $666 \cdot 10^6$ tonnes de sédiments terrigènes rentrant dans l'océan arctique par an ce qui représente environ $12,6 \cdot 10^6$ t/a de carbone organique.

3.2. Variations et changement climatiques

3.2.1. L'Arctique, sentinelle du réchauffement global

Selon les estimations, le XX^{ème} siècle a été le siècle le plus chaud depuis plus de 400 ans (Overpeck *et al.* 1997) et depuis 1850, date à laquelle commencèrent les relevés instrumentaux de la température à la surface du globe, les 17 dernières années (depuis 1995) sont les plus chaudes. Bien que les températures aient augmenté presque partout dans le

monde (Figure 36), les températures moyennes dans l'Arctique ont quant à elle augmenté pratiquement deux fois plus vite que les températures mondiales au cours des 100 dernières années. Selon les observations effectuées depuis 1961, la température moyenne des océans s'est accrue jusqu'à des profondeurs d'au moins 3 000 mètres, et les océans ont absorbé plus de 80 % de la chaleur ajoutée au système climatique. Sur l'ensemble de la planète, le niveau moyen de la mer s'est élevé de $1,8 \pm 0,5$ mm/an en moyenne entre 1961 et 2003, et d'environ $3,1 \pm 0,7$ mm/an en moyenne entre 1993 et 2003. L'IPCC (2007) estime que, depuis 1993, l'élévation du niveau de la mer est imputable pour 57 % environ à la dilatation thermique des océans, pour 28 % environ à la fonte des glaciers et des calottes glaciaires et, pour le reste, à la rétraction des nappes glaciaires polaires. En effet, les données satellites depuis 1978 montrent que l'étendue annuelle moyenne des glaces a diminué de $2,7 \pm 0,6$ % par décennie dans l'océan Arctique, avec un recul plus marqué en été de $7,4 \pm 2,4$ % par décennie. Deux épisodes particulièrement alarmant se sont produits en été 2007 avec une réduction de la calotte glaciaire de plus de 40 % par rapport à 1980 et très récemment, en 2012, cette diminution fut encore plus drastique (Figure 36, droite). Concernant la glace de mer pérenne (âgée de plus d'un an), un majeur déclin de leur surface a également été observé au cours des trois dernières décennies. Entre mars 2005 et mars 2007, la glace de mer pérenne a été diminuée de plus d'un million de kilomètres carrés (soit 23 % de son aire ; Nghiem *et al.* (2007)). Selon des mesures obtenues par des sonars de sous-marins et des modèles mathématiques, l'épaisseur de la calotte glaciaire est suspectée d'avoir diminuée de près de 40 % en moins de 40 ans (Rothrock *et al.* 1999, 2003), mais ces données sont encore soumises à controverse. Le déclin de la glace de mer arctique actuel semble sans précédent dans sa durée comme dans son intensité d'après les reconstructions climatiques à grande échelle depuis près de 1 500 ans (Kinnard *et al.* 2011). L'Antarctique ne semble pas subir de diminution significative de la couverture glaciaire contrastant avec l'Arctique, où au contraire, les effets du réchauffement semblent amplifiés, faisant de l'Arctique une sentinelle particulièrement sensible pour le changement climatique. Dans la globalité des deux hémisphères, les glaciers et la couverture neigeuse occupent également une moins grande superficie. Depuis 1900, l'étendue maximale du pergélisol saisonnier a diminué de 7 % dans l'hémisphère Nord, ce recul pouvant atteindre 15 % au printemps et depuis les années 1980, les températures à la surface du pergélisol se sont globalement accrues (jusqu'à 3 %) dans l'Arctique. Les précipitations ont également fortement augmentées entre 1900 et 2005 dans l'Est de l'Amérique du Nord et du Sud, dans le Nord de l'Europe et dans le Nord et le centre de

l'Asie, tandis qu'elles diminuaient au Sahel, en Méditerranée, en Afrique australe et dans une partie de l'Asie du Sud. (pour plus de détails sur la place de l'Homme dans le le réchauffement global observé en Arctique, voir Annexes)

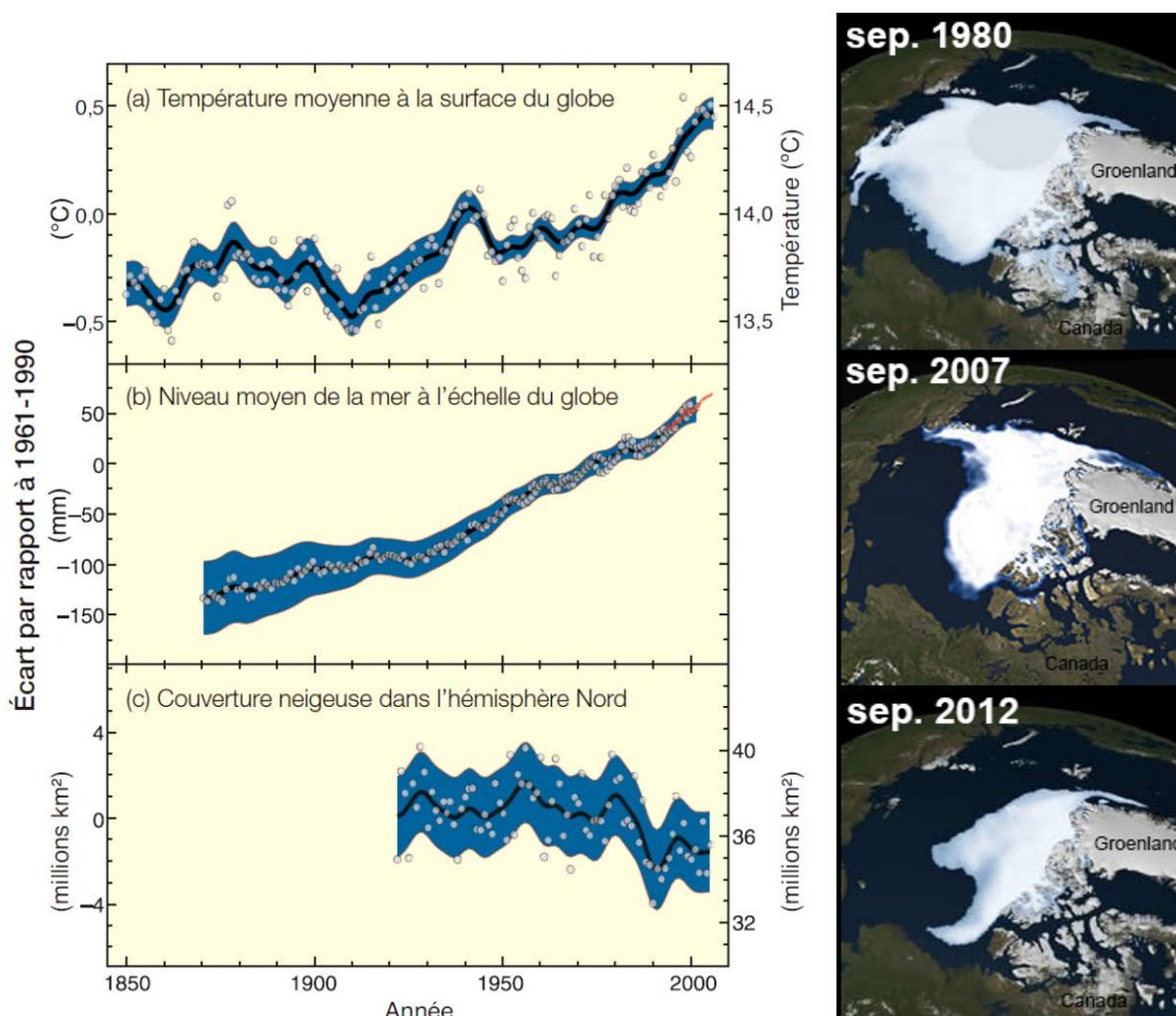


Figure 36. Variations observées de la température moyenne à la surface du globe (a), du niveau moyen de la mer à l'échelle du globe (b), et de la couverture neigeuse dans l'hémisphère Nord en mars-avril (c) (IPCC 2007) ; ainsi que de l'étendue de la calotte glaciaire de fin d'été en 1980 et pendant les événements exceptionnels des minimums glaciaires de 2007 et 2012 (NOAA). Données recueillies par les marégraphes (en bleu) et les satellites (en rouge) ; tous les écarts sont calculés par rapport aux moyennes pour la période 1961-1990 ; les courbes lissées représentent les moyennes décennales, les cercles, les valeurs annuelles.

3.2.2. Oscillations climatiques en Arctique

La large variabilité du climat arctique peut être en partie expliquée par l'influence de nombreux processus atmosphériques oscillants à l'échelle de l'hémisphère Nord et d'un fort couplage océan-atmosphère. Le climat arctique est fortement lié à la force et à la localisation des centres de hautes et basses pressions. Ces gradients de pression conditionnent vents et

courants marins dominants (s'écoulant d'une haute vers une basse pression), précipitations et températures déterminant en grande partie la saisonnalité du climat. La variabilité interannuelle est également liée aux centres de hautes et basses pressions bien que ce soit des phénomènes distincts. L'Arctique est sous l'influence principale d'un phénomène climatique oscillatoire à l'échelle de l'hémisphère Nord, l'oscillation arctique (AO), se traduisant dans le bassin Atlantique par l'oscillation nord atlantique (NAO). La quantité d'eaux relativement chaudes parvenant en Arctique *via* le *Gulf Stream* et son relais la dérive nord atlantique, va être en grande partie dépendante de la force des vents et de la différence de pression. En phase chaude de AO/NAO, les courants atlantiques, enrichis en chaleur et salinité par l'augmentation de l'influence des eaux subtropicales, s'accroissent et s'infiltrent plus dans les eaux intermédiaires arctiques (Häkkinen et Rhines 2009, Häkkinen *et al.* 2011). Deux phénomènes climatiques à l'échelle de plusieurs décennies peuvent également influencer sur la température des eaux arctiques (et donc aussi sur son climat), l'oscillation décennale pacifique (PDO, cycle de 20 à 30 ans) et l'oscillation atlantique multi-décennale (AMO, cycle de 40 à 80 ans) toutes deux liées au déplacement de masses d'eaux chaudes de surface du Pacifique Nord et de l'Atlantique Nord. Elles seraient toutes deux liées, en mode chaud, à l'intrusion de masses d'eaux plus chaudes dans l'océan arctique *via* les détroits de Fram et Béring (pour plus de détails sur les oscillations climatiques jouant un rôle dans le climat arctique, voir Annexes)

3.2.3. *Impacts des variabilités et du réchauffement climatiques en Arctique*

Les oscillations Arctique et Nord Atlantique ont un fort impact sur la cryosphère notamment sur la vitesse de dérive ainsi que l'épaisseur et le volume de glace de mer. En phase négative de AO/NAO (phase froide), le gyre de Beaufort est renforcé concentrant la glace de mer en Arctique (Figure 37, gauche) alors qu'en condition de AO/NAO positive (Figure 37, droite), le gyre de Beaufort se réduit renforçant la dérive transpolaire (TPD) exportant la glace de mer par le détroit de Fram. Dans l'archipel canadien et le Groënland Nord-Ouest (régions concentrant le plus de glaces pérennes), une partie de la glace convoyée par la TPD s'accumule mais surtout moins de glace âgée est arrachée par le gyre de Beaufort. La glace piégée dans le gyre de Beaufort est généralement bloquée en Arctique pour 5 à 10 ans ce qui implique que les glaces présentes en mers de Beaufort et des Tchouktches sont généralement âgées. Ainsi selon la mer considérée mais surtout selon les pressions atmosphériques (phase de AO/NAO), la glace ne présentera pas les mêmes caractéristiques,

ce qui conditionnera en partie la longueur de la période libre de glace (y compris son étendue) et de production phytoplanctonique ainsi que la quantité d'eau douce relâchée dans le milieu. La chaleur latente tant atmosphérique qu'apportée par les courants entrants en Arctique va également influencer sur ces paramètres faisant de la cryosphère, une composante très sensible au réchauffement (voir § 3.2.1).

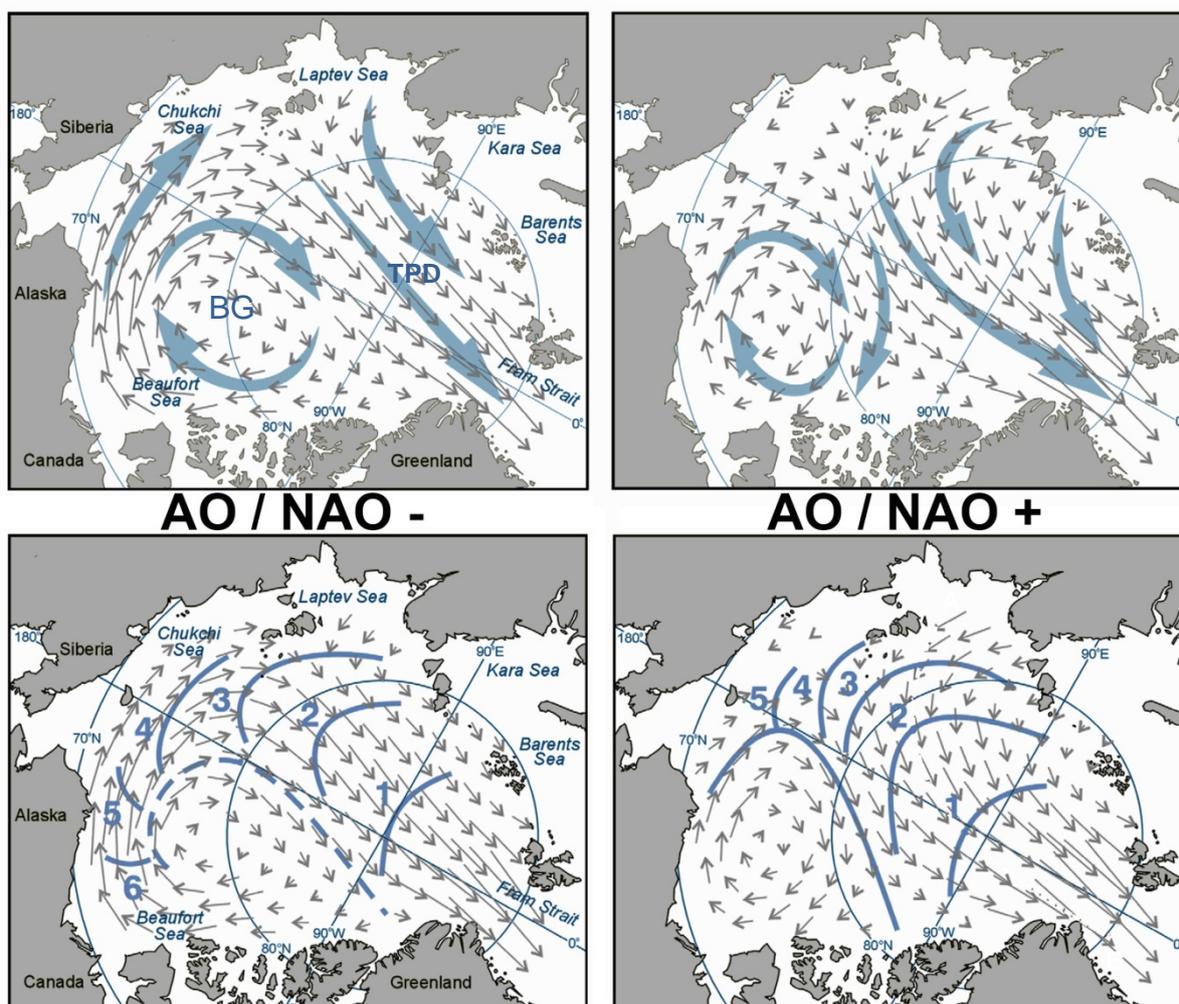


Figure 37. Directions générales de dérive de la glace de mer (haut) et nombre d'années pour rejoindre le détroit de Fram (bas) en conditions de AO/NAO fortement négative (gauche) et fortement positive (droite). Abréviations : BG : gyre de Beaufort, TPD : dérive transpolaire. D'après Macdonald *et al.* (2005).

La diminution de l'étendue, de l'épaisseur et de la période de recouvrement de la glace de mer due au réchauffement va également entraîner une augmentation de la surface d'échange entre océan et atmosphère. Cela va probablement entraîner de nombreuses modifications des caractéristiques physiques de l'océan arctique par l'augmentation de l'influence des forçages physiques externes (vents, orage, exposition au rayonnement solaire)

pouvant par exemple augmenter la profondeur de la PML, modifier les courants (notamment courants géostrophiques, *upwelling*/pompage et *downwelling*/ventilation *via* l'augmentation du transport d'Eckman), ou accentuer les phénomènes de remise en suspension de sédiment en milieu côtier. L'augmentation de la surface marine éclairée est également un paramètre à ne pas négliger dans les modifications entraînées par le réchauffement, car non seulement cela va réduire nettement l'albédo de cette région et donc avoir une influence majeure sur le climat (*via* l'effet de Serre), mais également car c'est un paramètre primordial pour les écosystèmes. Dans ce dernier cadre, la quantité et qualité de la lumière qui pénètre dans l'océan sont également des paramètres importants pour les écosystèmes marins (ainsi que pour les photoréactions) et ici encore les rejets anthropiques ont une influence non négligeable. En effet, principalement sous l'effet du rejet massif de chlorofluorocarbone (CFC) par l'activité humaine, la couche d'ozone stratosphérique s'affine (entre 10 et 15 % depuis 1979) et de sévères et nombreuses zones de déplétion se forment notamment en Arctique où un évènement de ce type avec une déplétion de plus de 45 % a été enregistré au milieu des années 1990s (Fioletov et Evans 1997). Cet affaiblissement se traduit par une augmentation des UV (ACIA 2005) qui par leur forte énergie accroissent la quantité d'énergie perçue par le système mais surtout ont des effets néfastes sur les organismes vivants particulièrement épipélagiques.

Les oscillations climatiques jouent également un rôle important dans les précipitations et les débits des fleuves arctiques. Les changements dans les vents et les températures induits par l'AO/NAO modifient le ratio précipitation/évaporation tant dans la quantité que dans la saisonnalité (Serreze *et al.* 2000) influençant le débit des fleuves (Figure 38). Peterson *et al.* (2002) ont montré que les anomalies⁵⁹ de déversement des fleuves arctiques étaient fortement corrélées avec les oscillations climatiques et les températures atmosphériques de surface à courtes échelle de temps. A plus longue échelle de temps, Wagner *et al.* (2011) ont montré que depuis l'ère industrielle, le déversement (résultat de la précipitation à laquelle est retranchée l'évaporation) de tous les fleuves arctiques majeurs a été augmenté avec une rapidité sans précédent depuis 700 ans (Figure 38). Cet apport supplémentaire en eaux douces, généralement chaudes en comparaison de l'océan dans lequel elles arrivent, augmentera probablement le caractère saumâtre de l'océan arctique et pourrait avoir, outre le

⁵⁹ Anomalie : variation dont la moyenne se maintient sur le long terme.

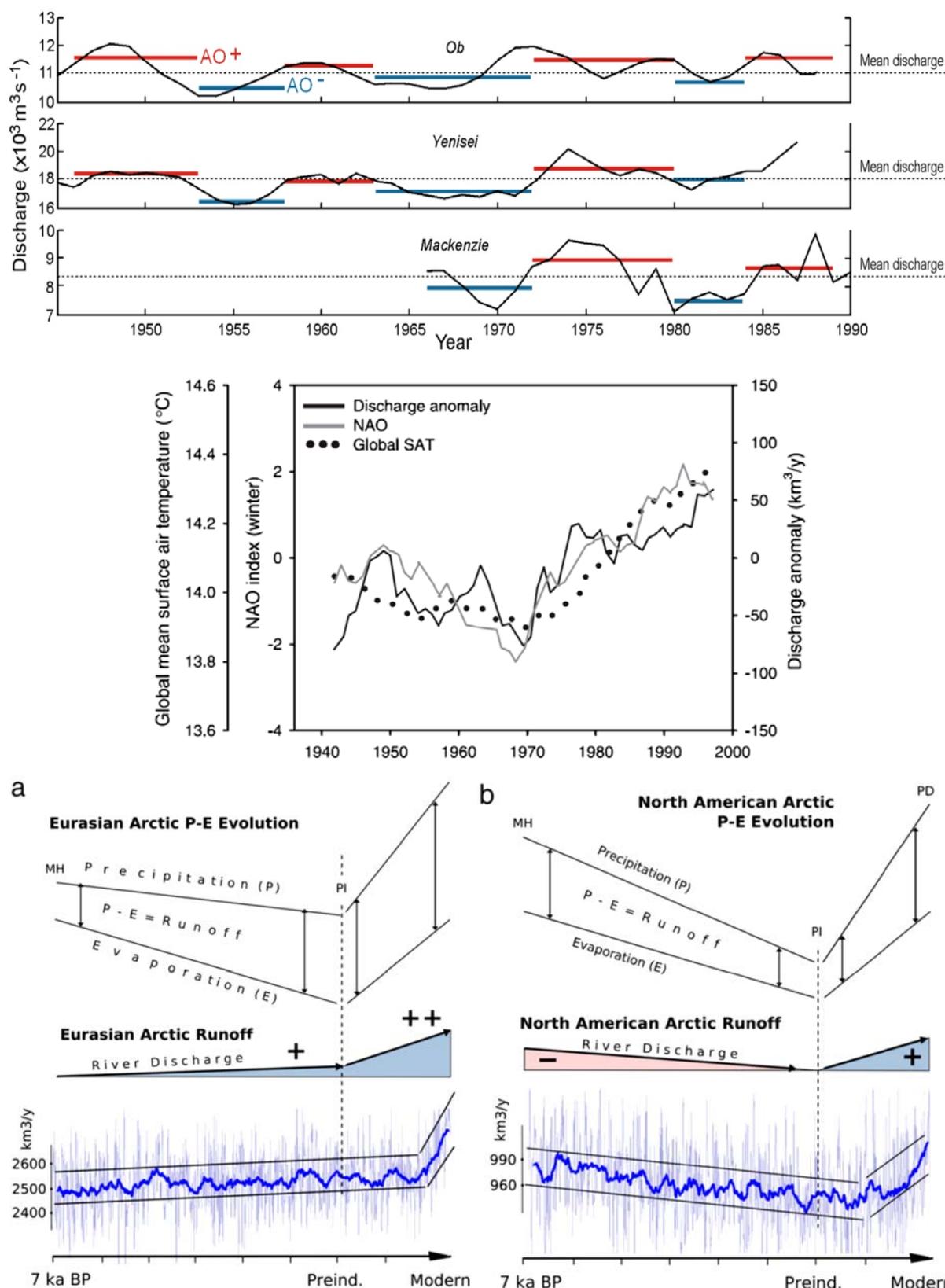


Figure 38. Décharge en eaux douces (moyennée sur 3 ans) du Yenisei, Ob' et Mackenzie en fonction de l'indice moyen de l'Oscillation Arctique (haut) ; moyenne sur 10 ans des anomalies de déversement des fleuves arctiques eurasiens, indice NAO d'hiver et moyenne globale de la température de l'air de surface (milieu) ; reconstruction des tendances de déversement des fleuves arctiques eurasiens (a) et américains (b) depuis 700 ans (bas). D'après Macdonald *et al.* (2005) pour le haut ; Stein (2008) pour le milieu et Wagner *et al.* (2011) pour le bas.

fort impact sur les écosystèmes marins, des incidences non seulement sur l'hydrographie de ce dernier par la formation d'une plus forte et plus profonde halocline limitant les échanges avec la surface mais aussi sur l'hydrographie mondiale par la limitation de la formation d'eaux profondes. L'augmentation de la pluviométrie n'aura probablement pas qu'une incidence sur la quantité d'eaux douces transportées par les fleuves jusqu'en Arctique. En addition d'une température ambiante augmentée et de la fonte plus profonde de la couche superficielle du pergélisol qui en résulte, un plus grand lessivage des sols et une plus grande érosion des côtes augmenteraient en conséquence la quantité de carbone (organique et minéral) et de particules déversées dans l'océan arctique. Les eaux douces pourraient passer d'un système dominé par les eaux de surface, pauvres en minéraux, à un système dominé par les eaux souterraines, riches en ions tels que le phosphate, l'azote minéral (ammonium, nitrate) ou le silicate (Frey et McClelland 2009). De plus, un réchauffement du pergélisol pourrait provoquer la libération brutale de grandes quantités de gaz à effet de serre qu'il séquestre sous forme notamment de carbohydrates (voir § 3.1.3). Cette émanation massive principalement de CO₂ et de CH₄ pourrait, en rétroaction positive, amplifier le réchauffement local et global (Stein 2008). Les changements dans les régimes de glace, de matière carbonée et nutriments, de température, de salinité et d'illumination induites par le réchauffement sont suspectés d'avoir de forts impacts sur les écosystèmes marins et principalement sur les compartiments de base comme le bactérioplancton.

3.3. Les bactéries pélagiques de l'océan arctique

3.3.1. Productivité dans l'océan arctique

Longtemps considéré comme le moins productif des océans notamment à cause de la température et de la permanence de la calotte glaciaire, sa production était estimée à moins d'un gramme de carbone par mètre carré et par an (Pomeroy *et al.* 1990). Toutefois à la fin des années 1990, Gosselin *et al.* (1997) estiment qu'en Centre Arctique, plus de 11 gC/m²/a sont produits sous la glace pérenne pendant les 4 mois d'été, notamment grâce aux organismes se développant sur le fond de la glace (comme les microalgues). Ces microalgues seraient responsables d'environ 60 % de la production primaire et fourniraient plus de 50.10⁶ t/a de carbone « frais » (facilement utilisable par les hétérotrophes). Il est de nos jours accepté que l'océan arctique peut localement et ponctuellement être très productif quand les conditions suivantes sont réunies : une faible épaisseur ou une absence de glace permettant un

éclairage suffisant, une luminosité minimale et un apport suffisant en éléments nutritifs. Les zones les plus productives se retrouvent donc dans les parties de l'océan arctique souvent libre de glace où les courants marins se rencontrent, entraînant de grands mouvements de masses d'eau et la remontée en surface d'éléments minéraux séquestrés en profondeur (Figure 39, haut). C'est le cas dans le Sud-Ouest de la mer de Barents entre Islande et Norvège ou Groënland où les plus fortes valeurs de productivité arctique sont enregistrées (~200 gC/m²/a) en réponse à la rencontre des eaux arctiques et atlantiques (Figure 31), la quasi permanence de conditions libres de glace en été et un *upwelling* quasi-permanent faisant remonter les eaux riches en nutriments dans la PML qui en est pauvre. La mer des Tchouktches est également très productive avec jusqu'à 400 gC/m² produit par an (la valeur la plus forte en Arctique). Cette production est cependant plus ponctuelle que celle de la mer de Barents, car elle dépend beaucoup de l'influx de nutriments venant du détroit de Béring. Sakshaug (2004) estime la production des mers de Kara, Laptev et Sibérienne Est à moins de 50 gC/m²/a, valeur moyenne de la mer de Beaufort. Ceci est principalement dû aux actions combinées de la forte stratification, de la profondeur de la PML (dépendant de la quantité d'eaux douces déversée) et de la présence plus longue de la glace de mer qui limite la formation d'*upwelling*⁶⁰ au bord du plateau continental et l'apport de nutriments dans les eaux de surface plus pauvres (la production, souvent forte, dans les estuaires n'étant ici pas comptabilisée).

La production primaire peut également être localement forte dans les polynies⁶¹ (Figure 39 d) dont les plus importantes sont rencontrées principalement dans l'archipel canadien, au Nord de la mer du Groënland et dans la mer de Béring. La production peut représenter environ 50 gC/m²/a à 150 gC/m²/a (Figure 39, haut). Au total, il est estimé que la production primaire moyenne de l'océan arctique serait d'environ 26 gC/m²/a, ce qui représente un flux de carbone frais d'environ 330.10⁶ t/a. De plus, il était estimé pendant longtemps que la production primaire ne se faisait pas en-dessous de la glace de mer, ou alors uniquement en bordure de la calotte glaciaire. Récemment, Arrigo *et al.* (2012) ont montré en juillet 2011

⁶⁰ **Upwelling** : phénomène, généré par les vents ou les courants, de remontée des eaux. Le processus inverse, conduisant à une plongée des eaux est appelé **Downwelling**.

⁶¹ **Polynie** : zone semi-permanente d'eau libre entourée de glace, souvent soit proche de la zone de rencontre glace de terre/glace de mer et causée probablement par les vents soit en océan hauturier (souvent plus importante en dimension) et probablement causée par des *upwellings* d'eaux profondes plus chaudes.

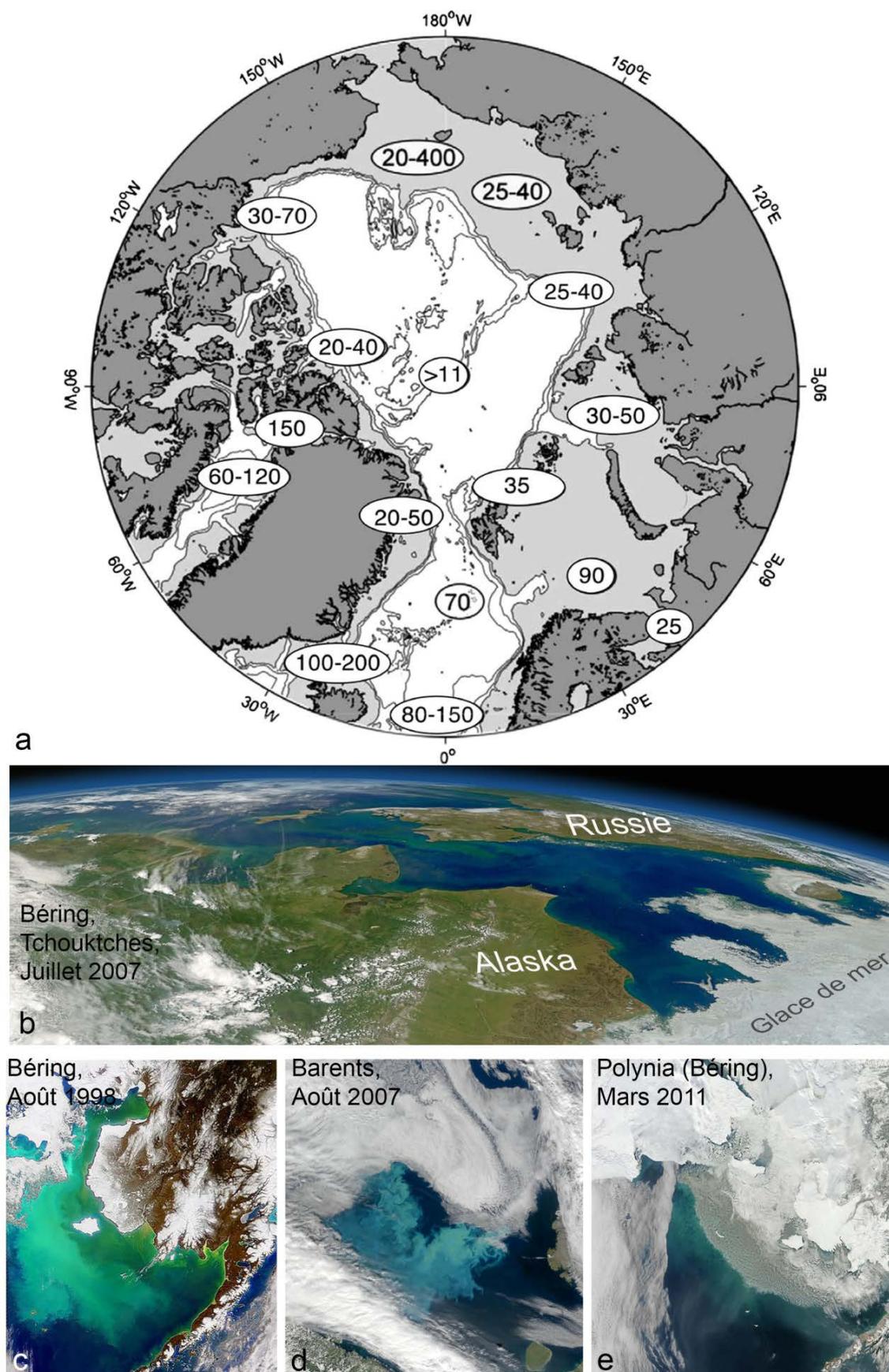


Figure 39. Production primaire totale dans l'océan arctique (a ; $gC/m^2/a$) et vues d'efflorescence du phytoplancton par les satellites SeaWiFS et MODIS. Efflorescences d'été en mer des Tchouktsches (b) ; de Béring (c), de Barents (d) et d'hiver dans une polynie e). D'après Stein (2008) et <http://oceancolor.gsfc.nasa.gov>.

des efflorescences massives de phytoplancton (de 28,7 à 32,5 gC/m²) jusqu'à plus de 100 km sous la calotte glaciaire en mer des Tchouktsches. Cette glace avait toutefois quelques particularités, elle était d'une épaisseur de 0,5 à 1,8 m (glace saisonnière) et présentait énormément de flaques de fonte à sa surface (*melt ponds*) augmentant de 4 fois la transmission de la lumière au travers de la couche de glace.

3.3.2. *Diversité du bactérioplancton arctique*

Si les grandes efflorescences arctiques sont principalement le fait de nanoeucaryotes photosynthétiques comme les diatomées (*Phaeocystis*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, et *Fragilariopsis*) qui dominent en particulier dans l'océan arctique côtier, la communauté phytoplanctonique dans l'océan hauturier a tendance à être dominée par les picoeucaryotes flagellés photosynthétiques, notamment un clade de *Micromonas* endémique de l'Arctique (Not *et al.* 2005, Lovejoy *et al.* 2007, Balzano *et al.* 2012a, 2012b). Toutefois, les picocyanobactéries coccoïdes (*Synechococcus* et *Prochlorococcus*), responsables d'une grande partie de la production primaire dans la majorité des autres océans (voir § 1.3.3), sont quasi-absentes de l'océan arctique (Li 2009) suggérant que la quasi-totalité de la production primaire est attribuable aux eucaryotes. Fait singulier, les picocyanobactéries d'eaux douces de la famille des *Synechococcaceae* sont présentes, et très abondantes, dans les systèmes dulçaquicoles arctiques mais les *Synechococcus* marines disparaissent une fois franchi le cercle polaire (Vincent 2002). Les *Synechococcus* dulçaquicoles sont retrouvées à l'embouchure des fleuves mais décroissent très rapidement et n'excèdent que rarement l'ordre de la centaine d'individus par millilitre d'eau de mer (Waleron *et al.* 2007). Ortega-Retuerta *et al.* (2012c) montrent par pyroséquençage une présence des *Synechococcophycidae* principalement agrégée aux particules dans l'estuaire du Mackenzie (~ 10 % de la communauté) avec une forte diminution en région côtière et une absence au large. Ces résultats suggèrent un possible transport de *Synechococcus* allochtones, d'eaux douces ou de zones humides, où ces dernières forment des tapis bactériens très denses (Vincent 2002) dans l'océan, sans ou avec peu de persistance (effet dilution). L'origine des très faibles abondances de *Synechococcophycidae*, présentes tout de même dans les eaux de surface, est encore discutée entre apports allochtones, des fleuves ou des océans adjacents par les courants entrants Pacifique ou Atlantique (Gradinger et Lenz 1989, Vincent *et al.* 2000, Waleron *et al.* 2007) ou des populations autochtones de faibles densités. En effet, Huang *et al.* (2012) ont mis en évidence des sous-clades de *Synechococcus* (clade CB1 du sous-groupe 5.1 et CB2 du

5.2) dominantes dans les hautes latitudes à partir du Nord de la mer de Béring et dans la mer des Tchouktches. Les sous-clades I et IV ont été détectés dans les zones subarctiques dans les océans Pacifique (Huang *et al.* 2012) et Atlantique (Zwirgmaier *et al.* 2008). Huang *et al.* (2012) avancent que ces clades seraient adaptés aux zones froides, cependant, le caractère estuarien de l'océan arctique peut représenter un facteur tout autant, voire plus, structurant pour ces populations étant donné que les groupes CB1 et 5 ont été isolés à l'origine dans les eaux saumâtres de l'estuaire de la baie de Chesapeake située dans les moyennes latitudes (Chen *et al.* 2006). Les bactéries photoautotrophes étant tout de même de très faibles abondances, la grande majorité des groupes bactériens présents en Arctique fait donc partie du bactérioplancton traditionnellement vu comme hétérotrophe.

Bien qu'en 1914 Issatchenko isola un grand nombre de bactéries, physiologiquement diverses, provenant des diverses côtes russes de l'océan arctique (Zobell 1946), les premières études exhaustives de diversité et de répartition des bactéries marines arctiques n'ont débuté que vers la fin des années 1990. Ces études pionnières, utilisant des banques de clones de l'ARNr 16S et des techniques d'empreinte moléculaire, établissent que les groupes bactériens majeurs dans l'océan arctique de surface sont les mêmes que dans les autres océans (Bano et Hollibaugh 2002, Malmström *et al.* 2007). Ces résultats ont été confirmés depuis grâce à d'autres techniques, notamment par pyroséquençage de la région hypervariable V6 de l'ARNr 16S (Kirchman *et al.* 2010, Comeau *et al.* 2011, Bowman *et al.* 2012). Les 3 grands taxons présents en Arctique sont les *Alphaproteobacteria*, les *Gammaproteobacteria* et les *Bacteroidetes* (Figure 40), caractéristique semblant être partagée entre Arctique et Antarctique (Brinkmeyer *et al.* 2003). Une méta-analyse récente conduite dans le cadre de l'ICoMM (Ghiglione *et al.* 2012) révèle que la similarité des communautés présentes aux 2 pôles est plus grande que celle entre communautés présentes aux pôles et à plus basses latitudes. Toutefois, à fine échelle taxinomique, la communauté arctique diffère de la communauté antarctique avec 78 % des OTUs uniques à l'océan Sud et 70 % des OTUs uniques à l'océan arctique. Cette étude, tout comme les banques de clones révèlent, dans diverses régions de l'océan arctique, une plus grande proportion de *Gamma-* que d'*Alphaproteobacteria*, contrastant avec les régions tempérées (Malmström *et al.* 2007, Pommier *et al.* 2007). Même si les pyroséquençages ne révèlent pas de dominance marquée des *Gammaproteobacteria* dans les zones libres de glace (Figure 40, a, b, d), une très nette suprématie de ce groupe est enregistrée dans les glaces pérennes du centre Arctique (c) dénotant une possible influence de la glace sur la répartition de ce groupe. Les proportions de *Bacteroidetes*, sont quant à elles

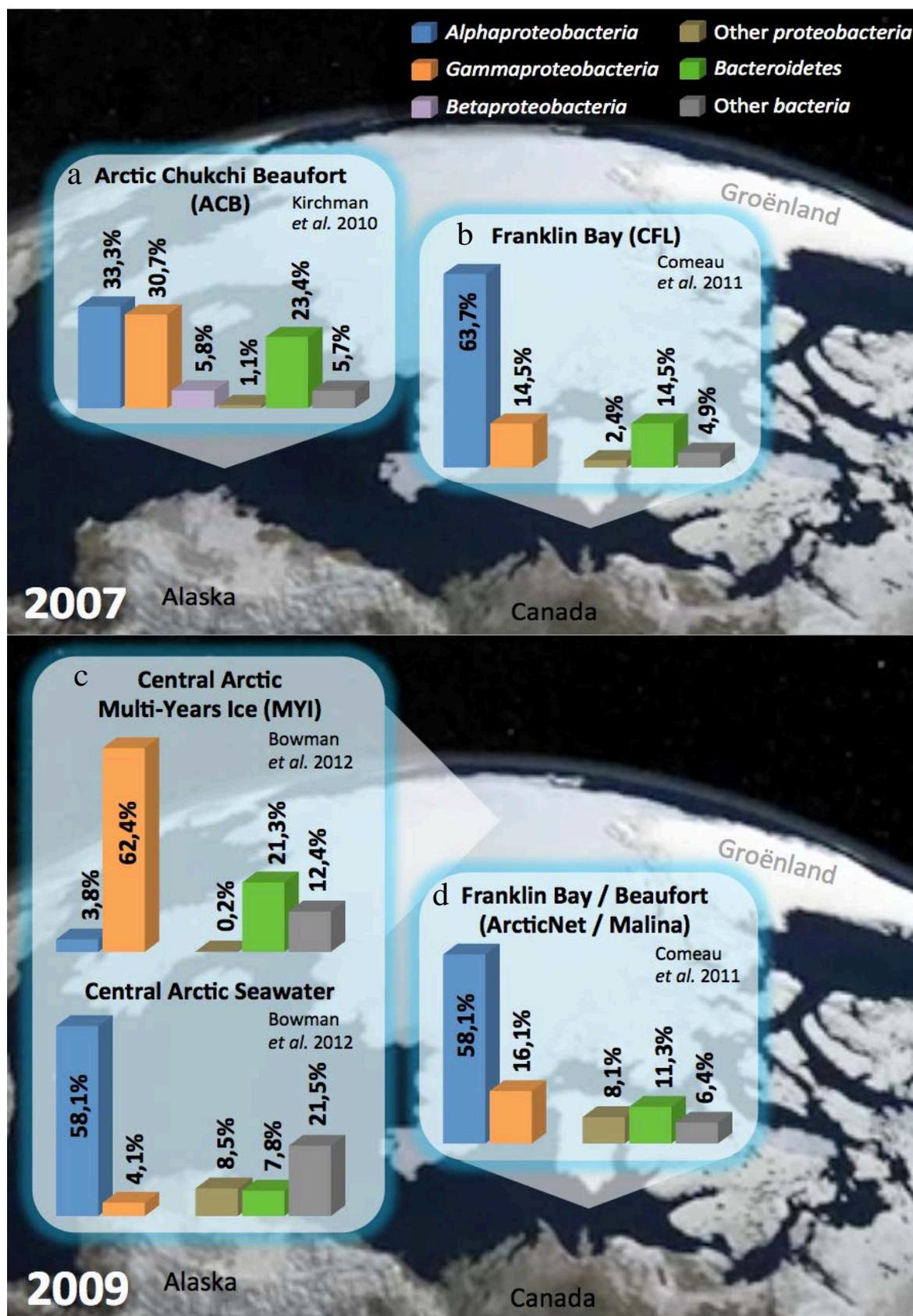


Figure 40. Distribution et diversité des groupes majeurs de bactéries marines arctiques de surface évaluées par pyroséquençage de la région V6 de l'ARNr 16S. Prélèvements effectués en 2007 (haut) et en 2009 (bas). (Kirchman *et al.* 2010, Comeau *et al.* 2011, Bowman *et al.* 2012).

plus importantes en moyenne qu'à plus basses latitudes (en comparant avec les données du GOS et de l'ICoMM, voir § 1.3.3). Là aussi l'apport de la glace peut se révéler important pour la distribution de ce groupe compte tenu de leur nature épiphytique, de leur capacité à flotter (présence chez certaines espèces de vacuoles gazeuses) et à adhérer aux surfaces comme la glace (Glöckner *et al.* 1999, Bowman 2006). Ortega-Retuerta *et al.* (2012c) ont analysé par pyroséquençage les communautés bactériennes libres et attachées aux particules le long d'un gradient estuaire – océan hauturier en mer de Beaufort et confirment un gradient augmentant en proportion de *Bacteroidetes* (*Flavobacteriaceae*) vers les eaux côtières et océaniques (plus grande concentration de glace). Ils montrent, en accord avec les tendances générales de ce groupe, une diminution des *Betaproteobacteria* vers l'océan même si ces dernières persistent au large. De manière intéressante, ce groupe n'apparaît en proportion non négligeable que dans la mer des Tchouktches et Beaufort et semble absent par ailleurs (bien qu'il puisse être comptabilisé dans le groupe « Other *proteobacteria* » comprenant également les δ et ϵ dans les études de Comeau *et al.* (2011) et Bowman *et al.* (2012)). Ce groupe semble également être abondant dans les eaux de fonte de la glace de mer dans le détroit de Fram (Brinkmeyer *et al.* 2004). Dans leur méta-analyse, Ghiglione *et al.* (2012) notent que les groupes, souvent trouvés en milieu terrestre ou dulçaquicole, des *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, et *Acidobacteria* sont plus communs et abondants dans l'océan arctique qu'en Antarctique. Ce constat est, sans doute lié à la forte influence riveraine en Arctique. Les *Alphaproteobacteria*, groupe dominant dans les eaux arctiques, sont dans les proportions les plus hautes enregistrées à plus basses latitudes avec une moyenne d'environ 60 % de la communauté bactérienne (contre 30 à 55% dans les données GOS et ICoMM).

A plus fine résolution taxinomique, les SAR11 (*Alphaproteobacteria*) sont, comme dans de nombreux océans, le groupe majeur dans l'océan arctique hauturier en surface (Bano et Hollibaugh 2002, Bowman *et al.* 2012) et également en domaine côtier (Comeau *et al.* 2011) ainsi qu'en profondeur (Galand *et al.* 2010) mais semblent peu représentées dans les glaces de mer (Bowman *et al.* 2012). Ghiglione *et al.* (2012) reportent que les communautés côtières d'été comme d'hiver sont dominées par les SAR11 et des groupes de *Gammaproteobacteria* incultivées (Ant4D3). En été, des groupes d'*Alphaproteobacteria* proches des genres *Loktanella* et *Sulfitobacter* (*Rhodobacteraceae*) et de *Bacteroidetes* proches du genre *Polaribacter* (*Flavobacteriaceae*) sont également abondants (contrairement à l'hiver où seuls les SAR11 et Ant4D3 dominent). En revanche, au large, bien que les SAR11 soient toujours largement dominantes, le groupe des Ant4D3 diminue au profit des SAR86

parmi les *Gammaproteobacteria* et un autre groupe de *Rhodobacterales* appartenant au genre *Roseobacter* augmente au détriment des *Loktanella* et *Sulfitobacter*. Les pyroséquençages de Comeau *et al.* (2011) et Bowman *et al.* (2012) ont montré que les familles des *Rhodobacteraceae* (dont les *Roseobacter*) parmi les *Alphaproteobacteria*, et des *Flavobacteriaceae* parmi les *Bacteroidetes* sont également ponctuellement abondantes en mer et sont les familles dominantes dans les glaces. Ces deux dernières familles sont habituellement trouvés abondantes, à plus basses latitudes, lors d'efflorescences algales ou dans les eaux riches (Kirchman 2002, Buchan *et al.* 2005) ce qui serait concordant avec leurs fortes abondances dans les communautés des glaces, caractérisées par leur capacité à de fortes efflorescences ponctuelles dans le temps et l'espace. Par ailleurs, Dyda *et al.* (2009) ont montrés que la contribution de certains groupes à la structure du bactérioplancton arctique variait en fonction de la nature de la matière carbonée disponible, en particulier, les *Loktanella* et *Sulfitobacter* dominaient lorsqu'ils étaient incubé avec en majorité de la matière organique terrigène.

Il ressort globalement qu'en comparaison des autres océans (décrit § 1.3.3), les groupes majeurs dans l'océan arctique dessinent les mêmes tendances avec une biogéographie similaire notamment en fonction du statut nutritif des masses d'eau (c.-à-d. les zones côtières ou hauturières). Cependant à l'échelle du genre ou de l'espèce (OTU) et parfois de la famille, les groupes bactériens semblent montré une spécificité arctique {Ghiglione, 2012 #931}. Ceci pourrait être vue comme une régionalisation, et par là un certain endémisme, pouvant traduire des adaptations aux conditions environnementales locales, drastiques en Arctique. Toutefois, cette vue peut être nuancée en considérant que la vue de la diversité peut varier plus temporellement que spatialement dans certaines régions {Kan, 2007 #1241}. De façon plus critique, la diversité observée est dépendante de la méthode utilisée pour la déterminer ainsi que du traitement bioinformatique pour traiter les séquences obtenues (notamment le choix du seuil d'homologie de séquences définissant l'OTU).

3.3.3. *La vie bactérienne dans le froid*

Comment la température contrôle la croissance bactérienne est une question très controversée et fait l'objet d'études conflictuelles. Basé sur une production bactérienne faible ainsi qu'un faible ratio production bactérienne/production primaire, enregistrés dans les eaux froides, Pomeroy et Deibel (1986), pour expliquer les biomasses plus importantes des

organismes polaires de rangs trophiques supérieurs, ont proposé que la croissance bactérienne était très faible dans les zones polaires. Cette hypothèse a été contestée notamment dans les eaux en permanence froides par de multiples études comme par exemple Wheeler *et al.* (1996) et Yager *et al.* (2001). Kirchman *et al.* (2009) ont également trouvé une production bactérienne significativement plus faible dans les océans polaires (mers arctiques des Tchoukches/ de Beaufort et mer antarctique de Ross) qu'à plus basses latitudes. Cependant, ils trouvent également de fortes valeurs ponctuelles dans les environnements froids en permanence suggérant que d'autres facteurs que la température jouent sur la production bactérienne notamment une variation dans les flux de la boucle microbienne (voir § 1.4.3) visualisables par le ratio production bactérienne/production primaire. Même si ce dernier est faible, il augmente très fortement avec la température entre $-1,8^{\circ}\text{C}$ et 4°C , au-dessus l'augmentation est plus faible. Ces résultats ont été interprétés comme une très forte utilisation par les bactéries hétérotrophes du carbone organique issu de la production primaire insensible à la baisse de la température, excepté en dessous de 4°C (température critique). Les auteurs avancent que les faibles abondances bactériennes en Arctique sont principalement liées à l'apport en MOD et en plus faible mesure à la température qui limite les taux de croissance.

Le froid permanent exerce de fortes contraintes notamment thermodynamiques, sur les organismes et leur fonctionnement. En particulier le froid (diminution d'enthalpie), joue sur la stabilité accrue et la flexibilité réduite des macromolécules telles que les glycolipides de la membrane, les acides nucléiques et les enzymes (Bakermans 2012). Les bactéries vivant dans les milieux froids, appelées psychrophiles⁶² ou psychrotolérantes⁶³ selon la température optimale de leur croissance, ont développé de multiples stratégies en réponse à ces contraintes. Pour limiter la formation de glace, de nombreux solutés compatibles comme la glycine bêtaïne, le glycérol, le tréhalose, le sucrose, la proline et le DMSP, peuvent être synthétisés. Ces composés ont différents rôles et sont impliqués dans les réponses à de nombreux stress autres que la température. Ils peuvent empêcher la formation de cristaux de

⁶² **Psychrophile** : dont les températures cardinales de croissance sont 0°C ou moins (minimum), 15°C (optimum) et 20°C (maximum). Actuellement la limite de température connue pour la reproduction est de -12°C et -20°C pour le métabolisme.

⁶³ **Psychrotolérante** : dont les températures optimales de croissance sont comprises entre 18°C et 45°C (mésophile) mais qui supporte, et continue de se reproduire (à plus faible rendement) à des températures plus basses.

glace et palier au manque d'eau par différentes stratégies : en empêchant la nucléation, en se liant aux cristaux de glace, en abaissant la température de cristallisation de l'eau à l'intérieur de la cellule ou en limitant les liaisons entre protéines et glace (Welsh 2000). Pour maintenir la fluidité de la membrane, les psychrophiles et psychrotolérants utilisent un mélange de la composition en acides gras principalement en augmentant la quantité d'acides gras polyinsaturés mais également en acides gras avec des chaînes courtes, branchées ou cycliques augmentant le désordre (viscosité) de la membrane (White *et al.* 2000). L'augmentation du désordre protéique interne (c.-à-d. une proportion accrue de peptides non organisés en hélice alpha ou en feuillet beta) est une réponse générique permettant une plus grande flexibilité. Les enzymes présentent également des adaptations de leur cinétique, leur permettant de fonctionner à basse température (plus grande plasticité du site actif). En compensation d'une affinité réduite, il semblerait qu'une des réponses est l'augmentation de la concentration intracellulaire des substrats (Bakermans 2012). Napolitano *et al.* (2005) ont montré que le niveau d'ATP contenu dans les psychrophiles est plus élevé que dans les méso- et thermophiles. Ces auteurs avancent que cela pourrait constituer une stratégie compensatoire pour maintenir les processus biochimiques à basse température (déplacement thermodynamique des réactions) qui reposerait sur une adaptation des protéines clés dans le métabolisme des adénylates comme l'ATP synthase ou l'AMP phosphatase/désaminase permettant une plus grande production d'ATP que de consommation.

OBJECTIFS

OBJECTIFS	109
4.CHAPITRE 4. Objectif de la thèse et le projet MALINA	107
4.1.MALINA, une problématique liée au réchauffement global	107
4.2.Description du système fleuve Mackenzie / mer de Beaufort.....	108
4.2.1.Présentation, caractéristiques physiques et saisonnalité	108
4.2.2.Activité et diversité microbiennes dans le plateau du Mackenzie	112
4.2.3.Echantillonnage.....	114
4.3.Intégration du travail de thèse	117
4.3.1.Problématique.....	117
4.3.2.Objectifs	118
4.3.3.Approches techniques	121

CHAPITRE 4. Objectif de la thèse et le projet MALINA

4.1. MALINA, une problématique liée au réchauffement global

Les diverses études et synthèses scientifiques récentes prédisent 6 impacts majeurs du changement climatique global (voir § 3.2) sur les écosystèmes arctiques :

1- L'augmentation de la température de l'air, de la terre et de l'eau. Dans le cas d'un scénario d'émissions de gaz à effet de Serre modérées⁶⁴, une augmentation de la température annuelle moyenne allant jusqu'à 7°C est prédite au-dessus de l'océan Arctique au cours du prochain siècle pour une augmentation globale de $2,8 \pm 1,6$ °C (IPCC 2007).

2- L'augmentation du rayonnement ultraviolet parallèle à l'appauvrissement de la couche d'ozone qui a diminué de 10 à 15 % depuis 1979 au dessus de l'Arctique.

3- La fonte des glaces et en particulier de la calotte glaciaire pérenne. Sa disparition totale en été est prédite pour la fin de ce siècle ayant des conséquences directes pouvant modifier profondément l'environnement arctique : exposition de la colonne d'eau au rayonnement solaire, augmentation des forçages atmosphériques à la surface de l'océan et une modification de la salinité de surface.

4- La fonte du pergélisol et augmentation de l'érosion côtière libérant de grande quantité de matière organique dont une grande partie pourrait être transportée par les eaux de ruissellement vers les fleuves et l'océan et utilisée par les processus bactériens.

5- L'augmentation du débit des fleuves qui d'ici 2080 pourrait atteindre 24 à 31% (Arnell 2005)

6- La modification de la circulation océanique avec la réduction du couvert de glace et l'augmentation d'apport en eau douce qui pourraient conduire à des modifications majeures de la circulation thermohaline et géostrophique de l'océan Arctique.

⁶⁴ Selon les modélisations du *Special Report on Emissions Scenarios*, en suivant le scénario A1B basé sur une vision d'un monde à croissance économique très rapide se reposant sur un équilibre entre énergies fossiles et renouvelables

C'est dans ce cadre de changements climatiques amplifiés en arctique qu'a été organisée la campagne MALINA⁶⁵. Le projet MALINA (*Mackenzie Light and Carbon*) est un programme scientifique international de 4 ans (2008-2012) qui visait à déterminer l'impact des augmentations de lumière et de carbone dans le système fleuve Mackenzie / mer de Beaufort. Plus particulièrement, il avait pour but de déterminer l'impact des changements climatiques sur le devenir du carbone d'origine terrestre exporté vers l'océan Arctique, sur la biodiversité microbienne, et sur la production photosynthétique de carbone organique. L'étude a été abordée sous forme d'une campagne océanographique majeure conduite dans le système Fleuve Mackenzie / Mer de Beaufort entre juillet et août 2009 en vue de documenter les différents stocks de matières organiques et de nutriments, les processus de transformation de ces stocks et les caractéristiques hydrodynamiques et optiques du milieu.

4.2. Description du système fleuve Mackenzie / mer de Beaufort

4.2.1. *Présentation, caractéristiques physiques et saisonnalité*

Le secteur arctique choisi pour mener cette étude est le plateau continental du fleuve Mackenzie en Mer de Beaufort. Au cours des dernières décennies, cette région a connu une réduction significative du couvert de glace estivale (Barber et Hanesiak 2004) et des augmentations du rayonnement ultraviolet et du débit fluvial sont attendues comme accrues dans les décennies futures. Le choix de cette zone d'étude a également été motivé par les données acquises entre 2002 et 2004 dans cette région par le Canada, les Etats-Unis, le Japon, et d'autres pays (y compris la France) dans le cadre du projet international CASES (*Canadian Arctic Shelf Exchange Study* ; <http://www.cases.quebec-ocean.ulaval.ca/index.html>).

Le Mackenzie est le principal fleuve Nord Américain se jetant dans l'Arctique et bien que ce soit le quatrième fleuve arctique en termes d'export d'eau douce avec un débit de $330.10^6 \text{ km}^3/\text{a}$, il est de loin le premier en termes de particules exportées avec 124.10^6 t/a (soit plus que la totalité de la quantité déversée par le bassin eurasien ; voir Tableau II, § 3.1.3).

⁶⁵ Malina est le nom de l'esprit inuit incarnant le Soleil, jeune femme exceptionnellement belle qui, rouge de honte, fuit perpétuellement son violeur qui n'est d'autre que son frère Annigan (ou Aningaaq), incarnant la Lune. Ce dernier a été démasqué par les marques de suif que Malina lui a fait une nuit, il fut alors chassé et une nuit se mit à poursuivre Malina qui prit une torche avant de s'enfuir. Son poursuivant se fatigue et maigrit perpétuellement, à tel point qu'il doit s'arrêter tous les 28 jours pendant 3 jours pour se reposer et manger (nouvelle Lune). Il rattrape cependant régulièrement sa sœur, donnant des éclipses, mais elle réussit toujours à s'échapper et tout recommence à zéro

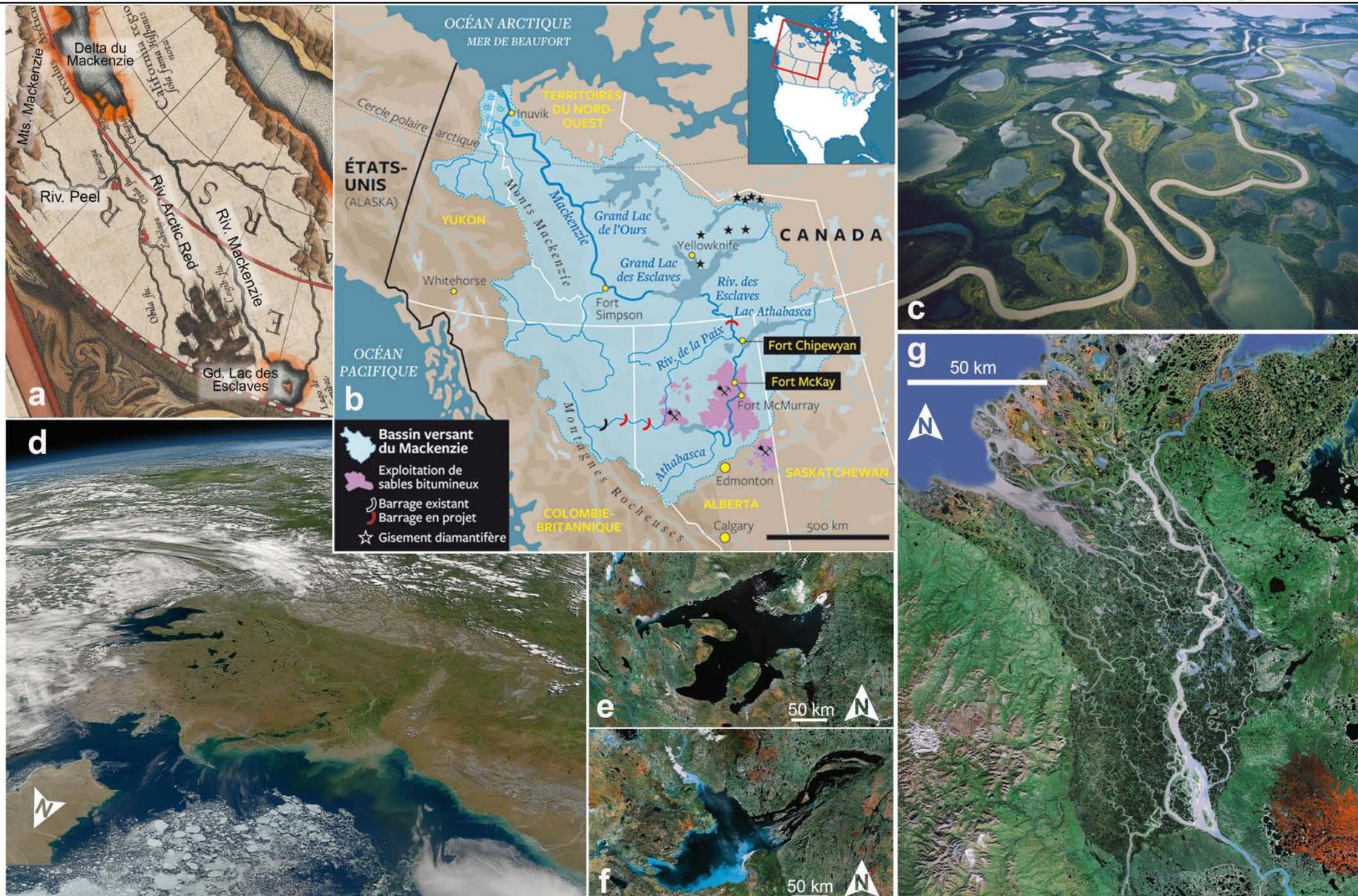


Figure 41. Vues du fleuve Mackenzie. Selon Mercator (a, voir Figure 29) ; bassin de drainage (b) ; photographie de la zone humide du delta (c) ; vues satellites centrées sur l'embouchure (d), les grands lacs de l'Ours (e) et des esclaves (f) ainsi que la zone humide du delta (g).

Ces exports représentent l'équivalent de $4,1 \cdot 10^6$ t/a de carbone organique total (3^{ème} plus important parmi les fleuves arctiques) principalement particulaire (plus de 60 %) d'origine terrigène (Rachold *et al.* 2004). Bien qu'il figure déjà sur les cartes du XVI^{ème} siècle (Figure 41 a), le Mackenzie a été exploré en 1789 par Alexandre Mackenzie (1764–1820) qui le descendit en canoë, dans l'espoir de trouver un passage Nord-Ouest vers l'Océan Pacifique mais atteignit finalement l'océan Arctique. C'est le fleuve le plus long du Canada avec 1 738 km, et avec ses affluents de la Paix et Finlay, il est, avec 4 241 km, le deuxième plus long système fluvial d'Amérique du Nord. Le bassin versant du fleuve Mackenzie comprend 1,81 million km² soit trois fois la superficie de la France (Figure 41 b). L'aire de drainage présente une grande variété de paysages, de climats et de systèmes dulçaquicoles dont notamment 3 des grands lacs Canadiens, de l'Ours (31 153 km², Figure 41 e), des Esclaves (28 568 km², Figure 41 f) et Athabasca (7 850 km²), l'embouchure se compose d'un vaste delta marécageux de 13 500 km² (Figure 41 c et g).

Le plateau continental du Mackenzie est plus restreint que ceux des fleuves eurasiens mais représente tout de même 60 000 km² constituant le Sud de la mer de Beaufort. Il est bordé à l'est par le Golfe d'Amundsen, à l'ouest par le canyon du Mackenzie et au sud par le delta du fleuve Mackenzie (Figure 42, haut). Au large de la mer de Beaufort passe le fort gyre de surface d'Est en Ouest. En profondeur passe d'Ouest en Est, le fort sous-courant de Beaufort longeant le bord du plateau continental apportant une partie de l'eau Pacifique du courant d'Alaska qui plonge dans la zone de Point Barrow séparant la mer des Tchoukches de la mer de Beaufort. Sur le plateau continental du Mackenzie, la circulation est très variable et souvent reliée à l'importante saisonnalité du débit du fleuve Mackenzie qui décharge la quasi-totalité de son eau douce dans la fenêtre temporelle relativement courte de l'été arctique (3-4 mois). En été, les eaux du Mackenzie, qui sont déchargées par deux canaux principaux (Ouest et Est) dominent les 5 à 10 premiers mètres de la surface alors qu'en hiver, un couvert de glace et d'importantes stamukhis se forment et, freinant le débit fluvial, peuvent potentiellement produire des eaux saumâtres. En fonction de l'orientation et de la force des vents, des tourbillons importants d'eau de surface du courant d'Alaska pénètrent en surface du plateau continental (Watanabe 2011) et des remontées d'eaux profondes peuvent ponctuellement se produire en bordure du plateau continental en particulier près du golfe d'Amundsen.

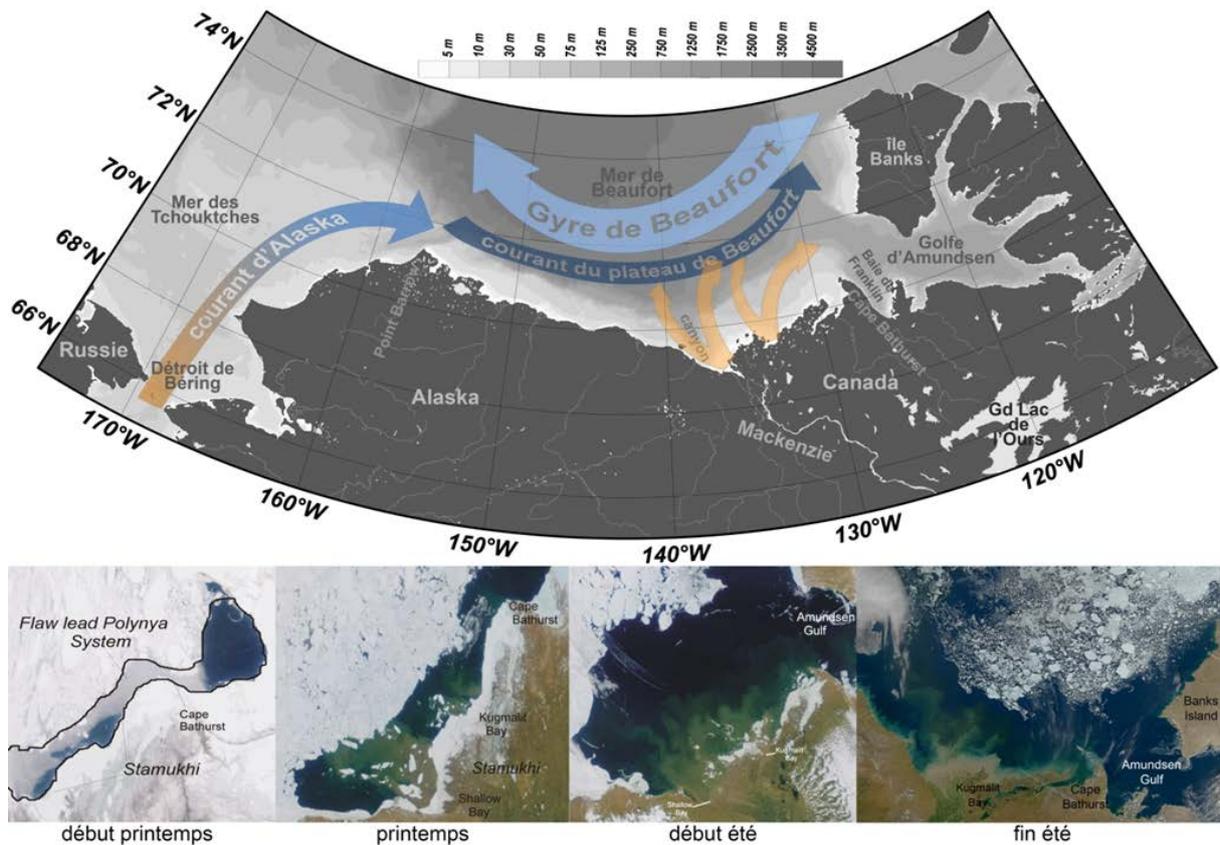


Figure 42. Carte de localisation de la Mer de Beaufort et principaux courants (haut) ainsi que la cinétique de fonte des glaces sur le plateau du Mackenzie (bas). Le gyre de Beaufort (bleu clair); le sous-courant de Beaufort qui longe le bord du plateau continental (*Beaufort Shelf Undercurrent*; en bleu foncé); la dispersion attendue du panache d'été du Mackenzie (en orange) qui varie selon la direction et l'intensité des vents dominants. En bas, quatre images satellites prises en mai 2004, juin 2004 et 1998, et septembre 2006.

Le plateau continental du Mackenzie présente une saisonnalité très marquée (Figure 42, bas) avec 3 phases distinctes. À la fin de l'hiver, la banquise continentale (*Landfast ice*) fait environ 2 m d'épaisseur et s'étend jusqu'à l'isobathe d'environ 20 m. La marge externe de la banquise continentale est soumise aux mouvements de la banquise Arctique (qui se déplace sous l'effet des vents) qui résulte en une accumulation de glace de mer pouvant atteindre plusieurs mètres d'épaisseur (>20m). La *stamukhi* forme un barrage naturel qui emprisonne les eaux du Mackenzie qui se sont accumulées durant l'hiver et forment un « lac » saisonnier contenant jusqu'à 70 km³ d'eau douce (le lac Herlinveaux). Au-delà, un corridor d'eau de mer de quelques dizaines de km de large s'ouvre entre glace de terre et de mer sous l'effet des vents (*flaw lead polynya*). Cette zone libre de glace, en contact direct avec l'atmosphère, est un lieu d'importants échanges de chaleur et par conséquent un lieu potentiel de convection profonde. La production primaire est faible au cours de cette période à cause de la limitation par la lumière (cycle solaire, glace, mélange vertical intensif). Au printemps, la « débâcle printanière » commence au sud par la crue du fleuve Mackenzie et progresse graduellement

vers le nord. En juin, le débit du fleuve est maximal et inonde la zone côtière jusqu'à ce que la *stamukhi* cède sous la pression générée par la masse d'eau douce se trouvant en amont. Cette poussée d'eau relativement chaude et très turbide intervient souvent avant même que la glace n'ait commencé à fondre sous l'action du rayonnement solaire. Rapidement, le panache s'étend sur plusieurs milliers de kilomètres carrés sur le plateau continental. En été, avec la fonte des glaces et les apports continuels du Mackenzie, une couche de 5 à 10 mètres d'eau douce se forme et occupe entièrement le plateau continental. En septembre, les eaux sont complètement libres de glace. Le déplacement du panache du Mackenzie dépend principalement des conditions de vent. Quand les vents sont calmes, la force de Coriolis maintient les flots d'eau douce le long de la côte en direction Est, avant d'éventuellement entrer dans le Golfe d'Amundsen. Les vents d'Est ont tendance quant à eux à transporter les eaux du Mackenzie au large dans le Bassin Canadien.

4.2.2. *Activité et diversité microbiennes dans le plateau du Mackenzie*

Les eaux du Mackenzie sont riches en nitrates et silicates (respectivement 10 et 65 mmol/m³) mais dépourvues de phosphates. Au large du Mackenzie sur le plateau continental (>20 km), le stock de nutriments présent dans la couche de surface à la fin de l'hiver dépend fortement de l'intensité du mélange vertical hivernal. L'accès aux eaux profondes venant du Pacifique, riches en nutriments (c.-à-d. ~15 mmol N m⁻³, ~2 mmol P m⁻³ et ~30 mmol Si m⁻³), dépend de l'apport automnal d'eau douce qui affecte le mélange vertical. Le bloom printanier est limité par les phosphates dans le secteur influencé par le Mackenzie (profondeur inférieure à 20 m) alors que sur le reste du plateau et au large, ce sont les nitrates qui limitent la croissance phytoplanctonique (Macdonald *et al.* 1987, Carmack *et al.* 2004). L'apport en nutriments nouveaux dans la couche de surface durant l'été dépend de l'intensité des événements d'upwellings, eux-mêmes affectés par la présence de glace. En effet, les conditions sont favorables aux remontées d'eaux riches quand le couvert de glace libère la marge continentale. Carmack *et al.* (2004) ont évoqué les conséquences possibles des changements du couvert de glace sur les apports en nutriments et la production primaire sur le plateau du Mackenzie.

Sur le plateau du Mackenzie, la production primaire est la plus grande source de carbone organique particulaire. Cependant, seulement 2% en moyenne de cette production se retrouvent enfouis dans les sédiments marins selon MacDonald *et al.* (1998) classant le plateau du Mackenzie comme globalement hétérotrophe. Il est clair néanmoins que ce bilan

est contraint par peu d'observations. O'Brien *et al.* (2006) suggèrent que sur le plateau, la production primaire est limitée par la lumière à cause de la turbidité associée au panache du Mackenzie. En revanche, les eaux situées près de la frange du plateau et sur la pente continentale bénéficient au printemps des nutriments amenés par le Mackenzie et la convection hivernale, sans être limitées par la lumière. C'est pourquoi on y observe une forte production nouvelle qui se traduit par un flux vertical de particules nettement dominé par le COP_{bio} .

Peu d'informations sur l'activité bactérienne dans la zone d'étude sont disponibles. L'étude issue de CASES de Garneau *et al.* (2009) a montré que l'activité bactérienne dans le plateau Mackenzie était en grande partie due à l'activité des bactéries attachées aux particules et pouvait atteindre 98% de l'incorporation de leucine dans l'estuaire du Mackenzie. Ces résultats discordants montrent l'importance d'étudier en parallèle les processus de production bactérienne et de production primaire.

Les analyses moléculaires ont mis en évidence l'originalité des bactéries (et *Archeae*) arctiques (du moins l'originalité des séquences du gène codant pour l'ARNm 16S, voir § 3.3.2) suggérant que ces conditions environnementales drastiques sélectionnent des micro-organismes particuliers. Outre les récentes études de pyroséquençage en centre-arctique, mer des Tchouktches et baie de Franklin, décrites dans la section 3.3.2, la diversité, l'abondance et l'activité du bactérioplancton ont été précédemment évaluées dans le delta du fleuve Mackenzie et l'océan côtier proche. En particulier dans le cadre de la campagne CASES, les communautés bactériennes (Garneau *et al.* 2006, 2009) et archéennes (Galand *et al.* 2006, 2008a, 2008b) ont été étudiées. Ces études ont mis en évidence, comme dans d'autres systèmes estuariens la forte contribution des *Betaproteobacteria* dans le Mackenzie et leur diminution graduelle, en relation avec l'augmentation de salinité, au profit des *Alphaproteobacteria* à travers le plateau continental jusque dans les eaux du large où toutefois elles persistent dans la couche dessalée de surface au large. Pour ce qui est des groupes de *Gammaproteobacteria* et de *Bacteroidetes*, les résultats, obtenus par différentes méthodes, divergent : les études estivales par FISH (tributaire de la spécificité et de la pénétration des sondes) de Garneau *et al.* (2006) montrent que ces groupes sont à tendances marines et sont peu présents dans le Mackenzie alors que l'étude printanière par clonage-séquençage (distordant la vue de la diversité en privilégiant certains groupes) de Galand *et al.* (2008a) a montré une forte contribution des *Bacteroidetes* d'eau douce dans le Mackenzie et marines

sur le plateau ainsi que des *Gammaproteobacteria* peu présentes dans le fleuve et la mer mais en revanche très présentes dans le lac de retenue (eau douce / saumâtre) formé derrière la Stamukhi et sur le plateau. Les études de Garneau *et al.* (2006, 2009) ont démontré l'importance des bactéries associées aux particules à proximité du delta du Mackenzie. Les relations entre l'abondance, la structure des communautés et l'activité des bactéries libres et attachées aux particules ont également été abordées durant la campagne MALINA. La structure des communautés bactériennes a été évaluée à l'aide de la CE-SSCP (*capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism*), une approche d'empreintes moléculaires (voir § 1.3.1), ainsi que par pyroséquençage. Ces approches complémentaires ont permis d'estimer la contribution relative des communautés bactériennes libres et attachées dans la transformation du COP et du COD d'origine terrigène ou biologique en mer de Beaufort.

4.2.3. *Echantillonnage*

La campagne à la mer du projet MALINA a pris place pendant l'été 2009, de mi-juillet à septembre (Figure 43) à bord du brise-glace Canadien de recherche, le *CCGS Amundsen*. Elle s'est déroulée en deux temps, un premier transect (*leg 1*) couvrant le Pacifique Nord-Est de Vancouver (Canada) à la mer de Beaufort en passant par le détroit de Béring et la mer des Tchouktches pendant lequel des échantillonnages d'eau de surface ont été effectués. Dans un second temps (*leg 2*), la mer de Beaufort / plateau du Mackenzie ont été intensivement échantillonnés. Les échantillons ont été récoltés grâce à une rosette équipée de bouteilles Niskin. Les stations littorales se situaient à proximité des embouchures du Mackenzie où a été déployée une embarcation légère pour réaliser un échantillonnage en amont dans le Mackenzie. Des échantillons d'eau ont été ramenés à bord et des profils CTD et optiques ont été réalisés manuellement. Pendant cette période, les indices de NAO/AO sont passés de positifs en début d'année à fortement négatifs pendant l'été (Figure 44, haut). Ceci implique en partie, un gyre de Beaufort renforcé et des conditions de glace assez denses. Elles ont persisté pendant 37 semaines (contre 32 en 2008 et 36 en 2007) et on comptait une couverture de 50% de la mer de Beaufort au 1^{er} juillet 2009. Ces conditions de glace sont en grande partie dues aux conditions atmosphériques : en juillet, de hautes pressions sur le Groënland et la mer de Beaufort ont assuré un temps dégagé et des vents de Nord qui ont poussé les glaces vers le plateau continental (Figure 44, milieu). Un basculement au mois d'Août vers un

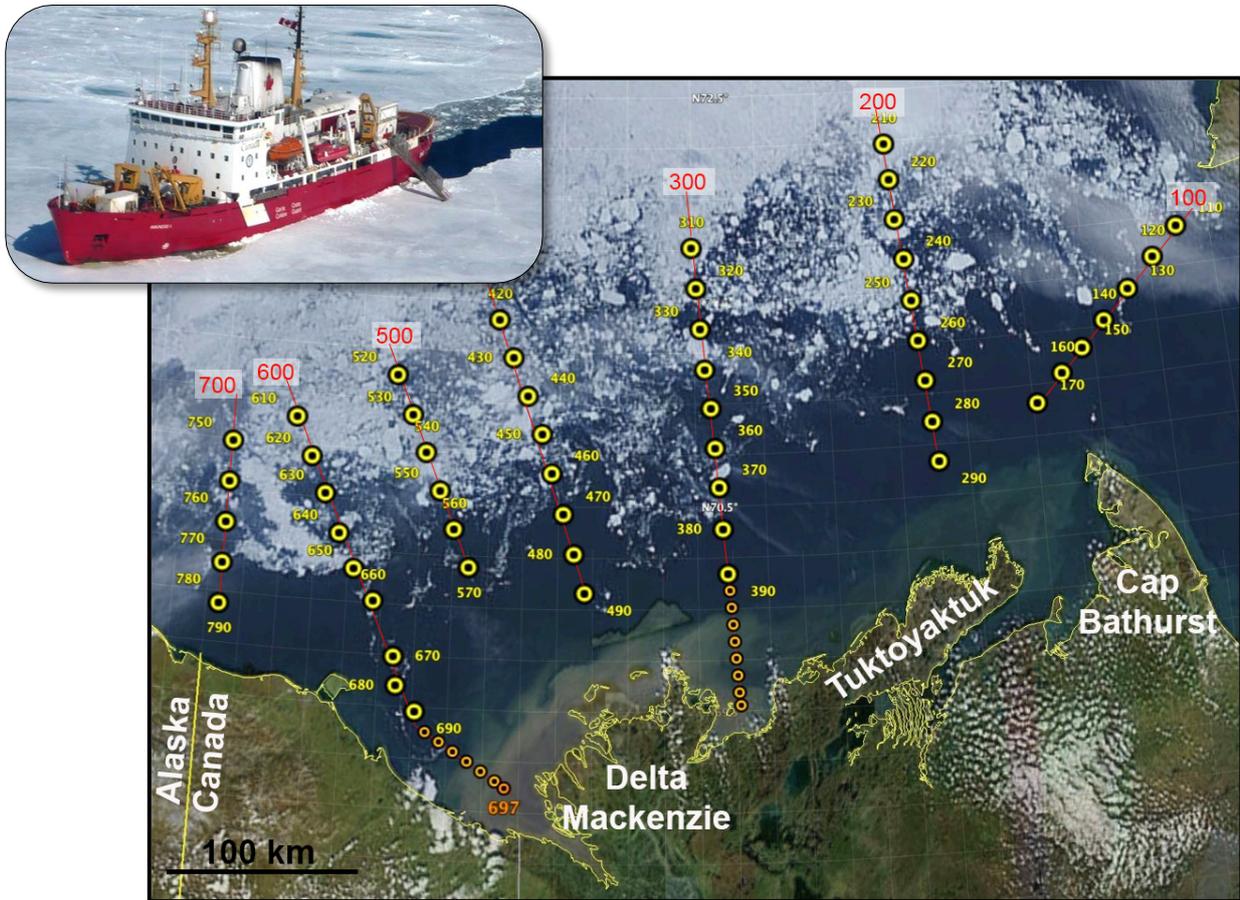


Figure 43. Carte de l'échantillonnage de la campagne MALINA en mer de Beaufort (leg 2). En jaune les stations hauturières, en orange les stations littorales, en rouge les noms et trajets des transects. Dans l'encart en haut à gauche, le brise-glace *CCGS Amundsen*.

système de basses pressions sur les mers sibériennes et le détroit de Béring a conduit à un changement de dominance du vent au profit du Sud Sud-Est produisant un retrait et une fonte des glaces pendant la campagne en mer de Beaufort. La direction générale du panache du Mackenzie a également été déviée sous l'action des vents et de la force des courants, principalement dirigée vers l'Ouest et tirée vers le large en Juillet, elle s'est rabattue vers l'Est et est restée cantonnée au plateau en Août (Figure 44, bas). Un événement d'*upwelling* (eaux froides) a eu lieu à l'Est du Cap Bathurst. Ces conditions environnementales ont impliqué l'échantillonnage des transects 100 et 200 une semaine après l'*upwelling* de fin Juillet et celui du transect 600 (la principale sortie des eaux Mackenzie) pendant la phase la plus intense de décharge du Mackenzie. Sur l'ensemble du *leg 2*, les conditions ont été globalement un couvert glaciaire et nuageux persistants ainsi qu'une importante décharge de sédiments fluviaux. Cela implique, une faible disponibilité de lumière et une forte stratification de la colonne d'eau due à la force du gyre de Beaufort et à l'eau douce apportée par la fonte de la glace et l'étendue du panache du Mackenzie.

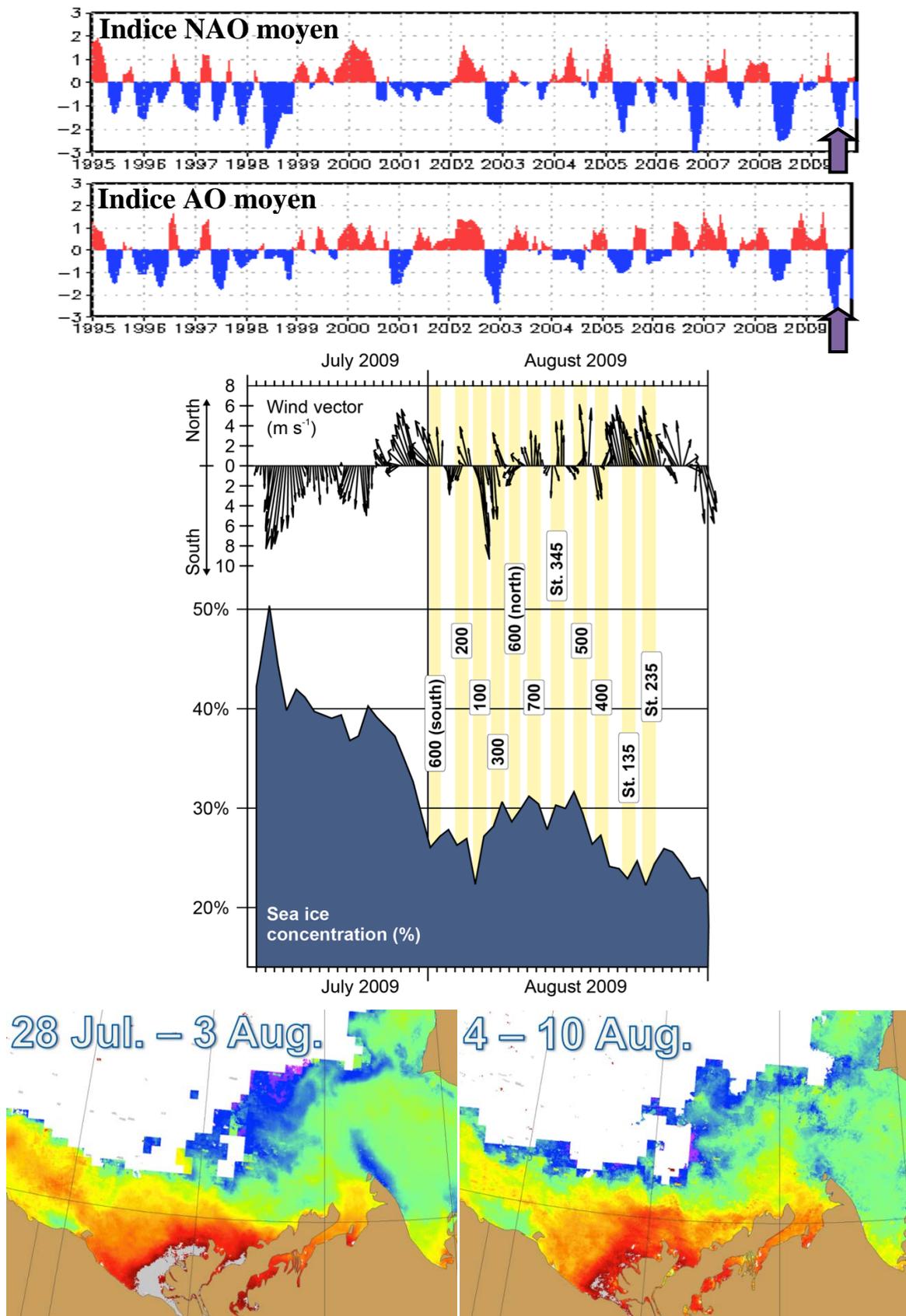


Figure 44. Indice de NAO et AO moyens de début 1995 à fin 2009 (haut), conditions de vents et de glace (milieu) et panache du Mackenzie pendant la campagne MALINA en mer de Beaufort (leg2). En bas, les couleurs rouges sont des températures supérieures à 10°C et bleues en dessous de 2°C. D'après Forest *et al.* (Comm. Pers.) pour le milieu et bas et <http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/precip/CWlink/> pour les indices.

4.3. Intégration du travail de thèse

4.3.1. *Problématique*

Bouleversant la vue dichotomique d'un monde bactérien pélagique soit autotrophe soit hétérotrophe, l'importance, tant numérique qu'écologique, des bactéries photohétérotrophes est une découverte récente (moins de 20 ans). Leurs métabolismes particuliers, permettant l'utilisation à la fois de la matière organique comme source principale d'énergie et de carbone et l'énergie lumineuse comme source additionnelle d'énergie (voir § 2.1), font de ce groupe fonctionnel un élément potentiellement clé dans les processus bactériens de reminéralisation du carbone organique et de transformation des éléments biogéochimiques. De surcroît, la photohétérotrophie est un métabolisme présent chez une grande variété d'organismes, sans lien direct de parenté et est apparue sous différentes formes, faisant de ce type métabolique plus qu'une singularité anecdotique, une vraie généralité puisque des organismes le pratiquant sont trouvés dans tous les environnements où ils sont recherchés. Toutefois, de nombreux écosystèmes restent encore peu ou pas explorés pour réellement pouvoir asseoir la place de ce groupe fonctionnel dans les processus bactériens. L'océan arctique en fait partie, où seule une étude récente porte sur la photohétérotrophie (Cottrell et Kirchman 2009). Cette étude pionnière a examiné la diversité par clonage-séquençage des 3 grands groupes de bactéries photohétérotrophes pélagiques (picocyanobactéries coccales, BPAA, B-PR) au début de l'été et en hiver 2007 de part et d'autre du cap de *Point Barrow* (Alaska), entre mers des Tchouktches et de Beaufort. Les photohétérotrophes ont été quantifiées, par cytométrie en flux pour les *Cyanobacteria*, microscopie à épifluorescence infrarouge pour les BPAA et qPCR pour les groupes de B-PR et BPAA dominants les banque de clones. Les principaux résultats de l'étude sont :

- L'abondance comme l'activité de la communauté bactérienne totale et de la communauté des picoeucaryotes photosynthétiques diminuent entre été et hiver.

- Les abondances des BPAA et les B-PR suivent la diminution de la communauté bactérienne totale entre été et hiver. A l'inverse l'abondance des *Synechococcus* ne diminue pas en hiver mais reste en faible abondance (80 à 40 cellules/ml soit moins de 0,05% du bactérioplancton) suggérant que ces dernières compensent le manque d'énergie lumineuse et la mortalité par leurs capacités hétérotrophes.

- Les BPAA (évaluées par IREM) sont 1 000 fois plus abondantes que les *Synechococcus* aux deux saisons et représentent une contribution permanente de 5 à 8 % des procaryotes. Les auteurs en concluent que la lumière accrue en été n'apporte pas un avantage

compétitif à ces photohétérotrophes. La communauté des BPAA est dominée par les *Rhodobacterales* (α -3-*proteobacteria*) en été comme en hiver. En été le phylogroupe F, proche du genre *Loktanella* (voir Figure 24) domine avec le phylogroupe I proche du groupe du genre *Rhodoferrax* (*Betaproteobacteria*). D'ailleurs, le genre *Rhodoferrax* avec *Polynucleobacter* sont les genres majoritaires retrouvés dans les bibliothèques de clones de l'ADNr 16S construites dans le fleuve et le lac Mackenzie par Galand *et al.* (2008a). En hiver, en revanche, l'importance des BPAA proches des *Betaproteobacteria* est réduite au profit d'un autre groupe de *Rhodobacterales*, le phylogroupe E, proche du genre *Sulfitobacter*.

- Les B-PR appartiennent principalement à des groupes inconnus ou éloignés, des références connues à l'époque de l'étude suggérant un probable endémisme fort. La quantification par qPCR des 2 groupes dominants les banques de clones révèle de faibles abondances (en moyenne 0,2 % des procaryotes). Toutefois, une ré-analyse des séquences obtenues par Cottrell et Kirchman avec les séquences références disponibles en 2012, a permis une attribution plus fine montrant une dominance des banques de clones par des groupes originaux d'*Alphaproteobacteria* en été (60%) comme en hiver (46%). Les *Gammaproteobacteria* dominent nettement le reste des clones en été (40%) comme en hiver (33%).

Ces résultats, outre le fait d'être pionniers, ont l'avantage de présenter les différences entre été et hiver de tous les groupes de photohétérotrophes potentiellement présents en Arctique. Cependant ils sont basés sur un nombre restreint d'échantillons (4 en été et 3 en hiver) dans une zone géographique peu étendue (inférieure à 25 km autour de *Point Barrow*) avec un nombre limité de clones analysés (entre 20 et 24 clones par bibliothèque, 2 bibliothèques en hiver et 2 en été). Les informations sur l'importance numérique et écologique des photohétérotrophes en Arctique restent donc encore largement lacunaires.

Dans le contexte de MALINA, dont l'objectif général est de déterminer l'impact des augmentations de lumière et de carbone terrigène dans le système fleuve Mackenzie / mer de Beaufort, évaluer les stocks et la diversité des photohétérotrophes, capables d'utiliser ces deux ressources, apparaît comme crucial.

4.3.2. Objectifs

L'objectif général de cette thèse est donc l'évaluation des stocks et de la diversité des photohétérotrophes dans le système estuaire du fleuve Mackenzie / mer de Beaufort. Le but *in*

fine est de fournir des pistes sur (i) la biogéographie des communautés photohétérotrophes, leurs contributions à la structure de la communauté procaryotique et les paramètres environnementaux les structurant ; (ii) la relation qu'elles entretiennent avec la lumière et le carbone terrigène afin de prédire leur importance potentielle dans les changements climatiques en cours ; (iii) l'importance des apports des formes de photohétérotrophie aux groupes phylogénétiques la pratiquant dans un contexte de multiples gradients écologiques forts (salinité, température, richesse nutritive et en particules, énergie lumineuse disponible).

La vue synoptique des photohétérotrophes et des paramètres physico-chimiques les contrôlant, s'intègre dans l'objectif de caractérisation du réseau trophique bactérien du plateau du Mackenzie de la campagne MALINA (Figure 45). Un autre aspect innovant de cette étude réside dans l'intégration de la diversité et l'abondance des photohétérotrophes évaluées par diverses approches, dans des zones de fortes transitions et à grande échelle, que ce soit lors du trajet d'environ 7 500 km au travers du Pacifique Nord, du détroit de Béring et de la mer des Tchouktches ou lors de l'échantillonnage intensif en mer de Beaufort couvrant plus de 135 750 km² (soit environ 1 % de l'océan arctique dans son ensemble).

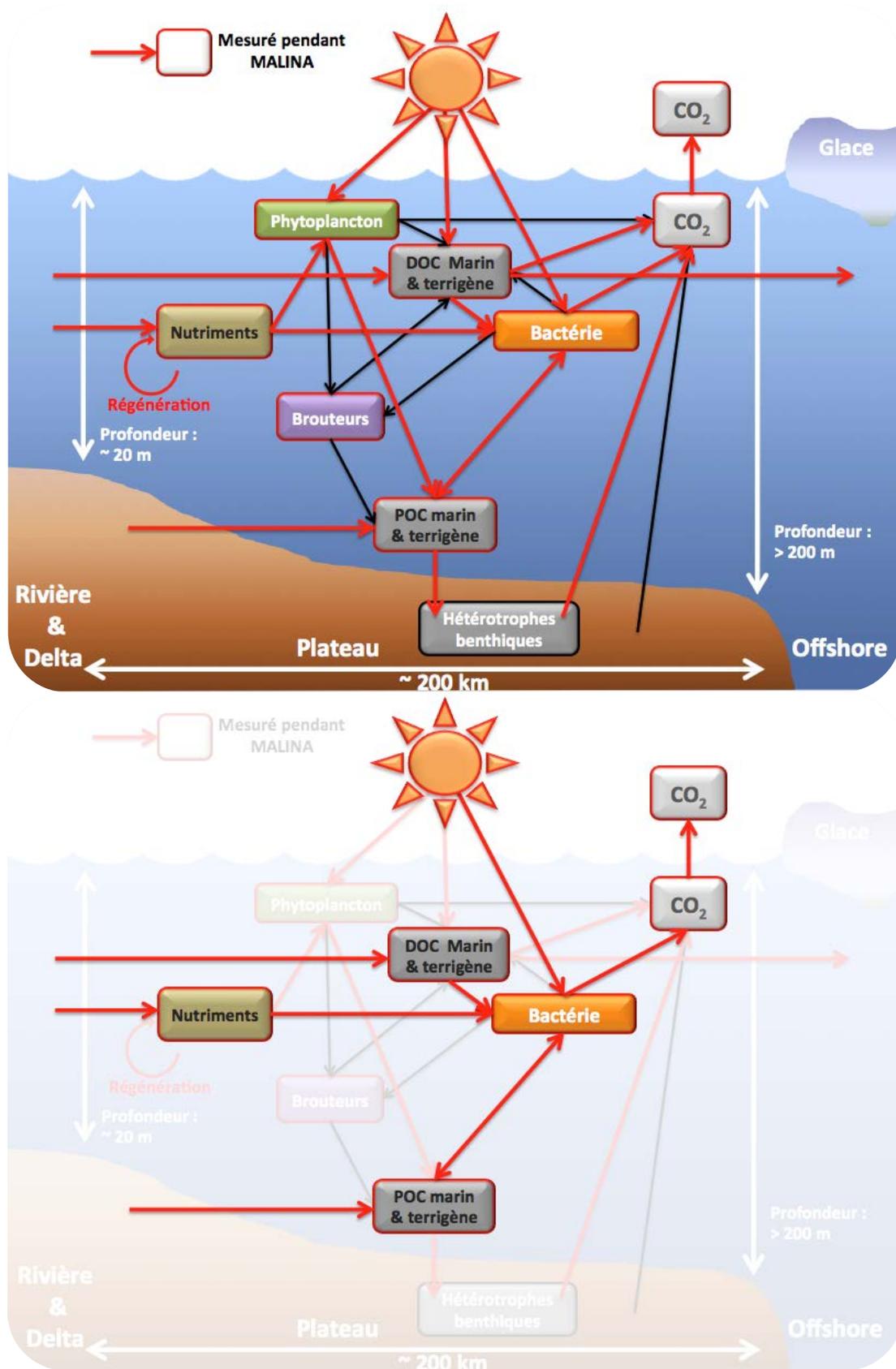


Figure 45. Représentation schématique simplifiée des composants de l'écosystème du plateau du Mackenzie et les compartiments ciblés par le projet MALINA dans son ensemble (haut) et par notre étude (bas). Les cartouches représentent les stocks, les flèches les flux. Les 3 cartouches centrales (phytoplancton, DOC et bactéries) représentent les stocks contrôlant les processus d'intérêt de MALINA.

4.3.3. *Approches techniques*

Pour répondre à ces objectifs, nous avons choisi de multiples techniques en adéquation avec les précédentes études permettant une comparaison avec ces dernières. Nous avons choisi d'aborder l'évaluation des stocks par 3 approches distinctes et adaptées à chaque type d'organisme ciblé (les techniques seront détaillées par la suite dans chaque chapitre de l'étude) :

- les picocyanobactéries coccales ont été quantifiées en utilisant la détection de signaux spécifiques de fluorescence grâce à la cytométrie en flux embarquée à bord. Les BPAA ont été quantifiées *a posteriori* (en laboratoire 6 mois après les prélèvements) par microscopie à épifluorescence infrarouge. Ces mesures ont été effectuées dans le laboratoire de David Kirchman (Université du Delaware) sous la direction de Matthew Cottrell qui a mis au point cette technique. Les données ont ensuite été validées à Roscoff sur un ensemble de points par qPCR des groupes majoritaires du gène diagnostique *pufM*. Un dosage de la quantité de bactériochlorophylle *a* a également été effectué par Joséphine Ras du laboratoire d'observation de Villefranche-sur-Mer.

- L'évaluation des stocks de B-PR ne pouvant être estimée par une méthode optique directe, les groupes principaux ont été quantifiés par qPCR. Cette technique nécessite cependant comme pré-requis la connaissance de la diversité. Ainsi 8 groupes dominants (dans les banques de clones) de gènes codant pour l'opsine ont été quantifiés ainsi que le gène codant pour l'ARNr 16S bactérien (proxy de la communauté bactérienne).

Nous avons choisi d'aborder l'étude de la diversité par deux approches complémentaires, une méthode culturale et une approche moléculaire. Concernant l'approche culturale, des isolements ont été réalisés lors de la campagne à partir d'échantillons d'eau fraîchement prélevés sur un milieu solide adapté. Ce milieu tente de se rapprocher de l'environnement dans lequel les groupes non encore isolés de photohétérotrophes vivent, il mime des conditions de carbone faibles mais variées et a été fabriqué à partir d'eau prélevée *in situ* (en surface et à la DCM) de laquelle les organismes vivants ont été retirés. De nombreuses études rapportant que les groupes bactériens arctiques sont très liés à la communauté phytoplanctonique et à sa production, du DMSP, un composé sécrété par le phytoplancton eucaryote, a été rajouté. Après incubation en conditions contrôlées, les cultures ont été criblées, soit par un système optique captant les infrarouges pour les BPAA soit par PCR pour les B-PR. Les souches positives ont été alors purifiées, regroupées en fonction de l'empreinte moléculaire de leur ADNr 16S (tRFLP) et les gènes diagnostiques (*pufM* et PR)

ainsi que le 16S des représentants de chaque groupe obtenu ont été séquencés. Dans l'approche environnementale, nous avons choisi d'évaluer directement la diversité des gènes diagnostiques dans l'environnement par une méthode de clonage-séquençage. L'ADN total de l'ensemble des stations échantillonnées lors de la campagne a été extrait et le choix des stations analysées a été basé sur les différences d'empreintes moléculaires des communautés de BPAA et de B-PR. La profondeur de séquençage a été évaluée par l'indice de couverture des banques pour s'assurer que la totalité des grands groupes présents ait été séquencée. Des analyses phylogénétiques poussées ont été par la suite menées en tenant compte des contraintes liées à la nature des séquences obtenues : relative faible longueur de séquence (~300 pb), forts taux de mutation liés aux probables transferts latéraux et contrainte de la structure de la protéine générée.

L'ensemble des données obtenues par ces différentes approches de diversité et d'abondance a été ensuite comparé et analysé par divers outils statistiques aux jeux de données biotiques et abiotiques recueillis par les autres participants de la campagne MALINA afin de déterminer si des facteurs structurant expliqueraient la distribution des photohétérotrophes et fourniraient des indices sur l'écologie de ces derniers.

RÉSULTATS

5.CHAPITRE 5. Les BPAA dans l’océan arctique ouest.	125
5.1. Préambule	125
5.1.1. Etat des connaissances en Arctique.....	125
5.1.2. Ambitions.....	126
5.1.3. Point technique.....	127
5.2. Article 1: <i>Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean</i>	130
5.3. Epilogue	172
5.3.1. Résultats complémentaires.....	172
5.3.2. Evolutions possibles dans un contexte de réchauffement global	176
6.CHAPITRE 6. Les B-PR dans l’océan arctique ouest.	177
6.1. Préambule	177
6.1.1. Etat des connaissances en Arctique.....	177
6.1.2. Ambitions.....	178
6.1.3. Point technique.....	178
6.2. Article 2: <i>Alphaproteobacteria</i> dominates the summer proteorhodopsin-containing community in the western Arctic Ocean	181
6.3. Epilogue	222
6.3.1. Résultats complémentaires.....	222
6.3.2. Evolutions possibles dans un contexte de réchauffement global	234

CHAPITRE 5. Les BPAA dans l'océan arctique ouest.

5.1. Préambule

5.1.1. *Etat des connaissances en Arctique*

Comme dit précédemment, peu de données existent sur l'importance écologique des BPAA dans l'océan arctique. Cottrell et Kirchman (2009) ont toutefois montré que ces dernières sont présentes dans les eaux côtières en mer des Tchouktches. Les abondances relatives ne sont pas négligeables puisqu'elles constituent 5 à 8 % des procaryotes, ce qui est dans les moyennes hautes pour ce groupe fonctionnel dans l'océan côtier (Jiao *et al.*(2007) ; voir § 2.2.3). Ces valeurs sont plus proches des fortes valeurs (~ 10 %), rencontrées dans les estuaires (Schwalbach et Fuhrman 2005, Waidner et Kirchman 2007), que celles mesurées dans l'océan Pacifique ($1,08 \pm 0,74$ % ; Jiao *et al.*(2007)). Cependant, cette étude est limitée tant spatialement que dans le nombre d'échantillons analysés ou la profondeur de séquençage. Les groupes phylogénétiques retrouvés (Figure 46) appartiennent à des familles communes dans les efflorescences de phytoplancton (pour les membres des *Rhodobacterales*) et en

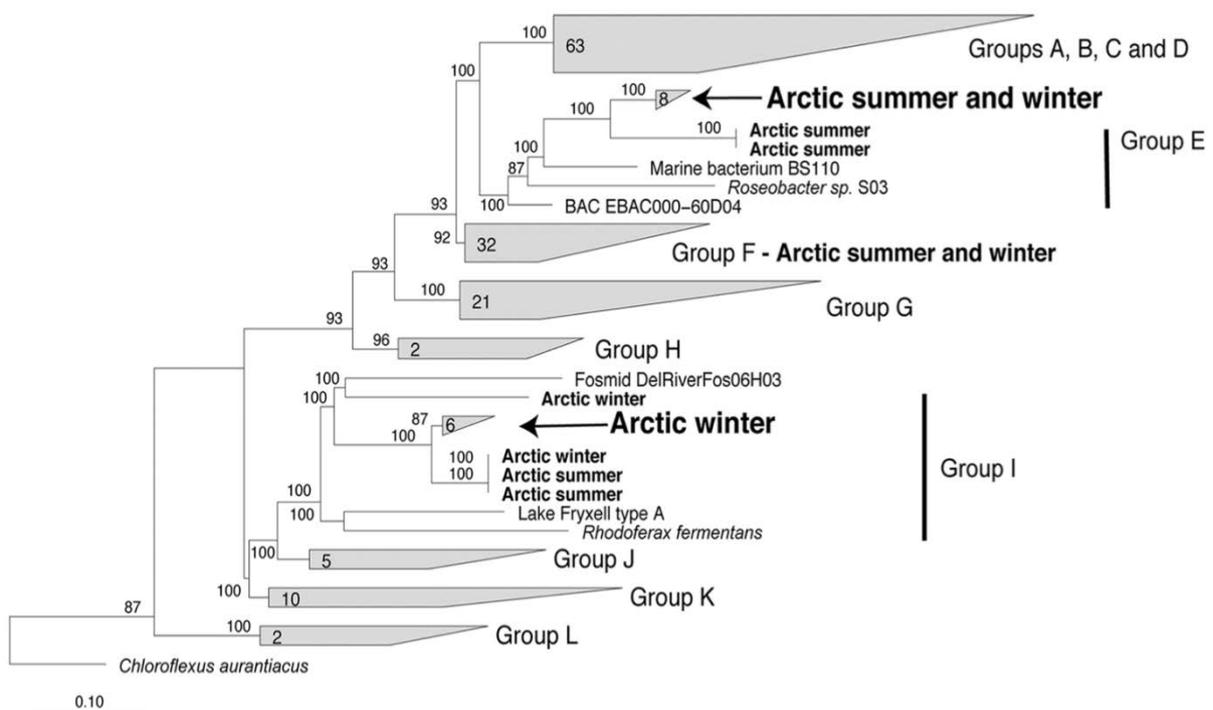


Figure 46. Arbre phylogénétique des séquences *pufM* d'été 2007 et d'hiver 2008 obtenues par Cottrell et Kirchman (2009). Les phylogroupes définis précédemment par Yutin *et al.* (2007) ont servi à construire l'arbre et sont indiqués de A à L.

milieu dulçaquicole (pour les membres des *Betaproteobacteria*). Ce qui soulève la question de l'origine des BPAA : forment-elles des communautés autochtones, endémiques à l'Arctique ou bien allochtones, résultant d'un transport du Pacifique ou de milieux dulçaquicoles ? Bien que ces séquences semblent originales, les arguments en faveur de la dernière hypothèse sont que (i) la mer des Tchoukches est énormément influencée par les entrées d'eau Pacifique *via* le détroit de Béring, et (ii) bien qu'aucuns fleuves ne se jettent dans la zone analysée, le Yukon se jette en amont (dans le détroit de Béring) du courant principal baignant *Point Barrow*. Déterminer l'origine et la diversité des BPAA dans l'océan arctique reste encore un challenge.

5.1.2. *Ambitions*

Dans cet article, nous avons voulu déterminer, avec le plus de précision et de profondeur possibles, l'importance écologique et l'origine de la communauté estivale des bactéries phototrophes anoxygéniques anaérobies dans le plateau continental du Mackenzie afin d'envisager l'évolution possible de leurs populations dans un contexte de réchauffement global. Les questions que nous nous sommes adressées sont les suivantes :

- Les BPAA sont-elles présentes dans le système d'étude ? Si oui, quelle est leur importance numérique ?

- Leur diversité génétique est-elle limitée à celle trouvée par Cottrell et Kirchman 2 ans auparavant ? Quels sont les groupes dominants, sont-ils différents de ceux retrouvés aux plus basses latitudes et sont-ils actifs ?

- Quelle est la diversité taxinomique des BPAA cultivables ?

- Quels sont les facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent spécifiquement la diversité et l'abondance des BPAA, en particulier quels rôles ont la lumière et les sources de carbone ? Sont-elles soumises aux mêmes pressions que la communauté bactérienne totale ? Le corollaire étant est-ce que la photohétérotrophie leur apporte un avantage dans cet environnement particulier ?

- Compte tenu de ces données, peut-on déterminer leur origine et prédire leur évolution dans un contexte d'augmentation de la lumière et du carbone terrigène du au réchauffement global ?

5.1.3. *Point technique*

Nous avons abordé l'abondance des BPAA d'un point de vue global en effectuant un suivi par microscopie à épifluorescence infrarouge (IREM) couvrant la totalité de la zone d'échantillonnage. A chaque station, 6 prélèvements ont été effectués à différentes profondeurs de la zone euphotique. En bref, à chaque prélèvement, le nombre de cellules totales a été déterminé à bord par cytométrie en flux et des volumes variables ont été filtrés sur filtres de polycarbonate (0,22 µm) de manière à obtenir des concentrations de bactéries facilement quantifiables au microscope, 160 filtres ont été ainsi traités. Pour la quantification par IREM, nous avons suivi le protocole de Cottrell *et al.* (2006). Une portion de filtre (1/12) a été découpée et colorée au DAPI (1 µg/ml) dilué dans du PBS 1X pendant 15 minutes. Chaque morceau de filtre a été monté sur une lame microscopique avec de l'huile minérale. Puis il a été observé sous microscope à épifluorescence infrarouge. Vingt champs ont été comptés aléatoirement. Pour chaque champ, 4 photos successives ont été prises avec des filtres et des temps d'exposition différents : 1 filtre pour compter le nombre de cellules contenant de l'ADN (DAPI), 1 filtre pour compter le nombre de cellules contenant de la chlorophylle (phytoplancton/cyanobactéries), 1 filtre pour compter le nombre de cellules contenant de la phycoérythrine (Cy3, *Synechococcus* sp.) et 1 filtre pour compter le nombre de cellules contenant de la bactériochlorophylle (IR, AAP). Un programme développé par M. Cottrell a permis d'obtenir, par soustraction, à partir de ces 4 photos le nombre de BPAA (particules émettant seulement dans l'infrarouge et contenant de l'ADN) présentes par champ (voir Figure 22).

Etant donné que la synthèse de BChl *a* est en partie régie par le cycle lumineux ^{et/ou} l'intensité lumineuse (Yurkov et van Gemerden 1993, Shimada 1995), nous avons quantifié l'abondance du gène *pufM* spécifique du groupe majoritaire dans les banques de clones par PCR quantitative. Cette technique permet la visualisation en temps réel de la formation d'amplicons au cours d'une réaction de PCR. En utilisant des amorces spécifiques d'un groupe phylogénétique et une gamme étalon avec des nombres de copies du gène d'intérêt connus, il est possible de déterminer la concentration de ce groupe dans les échantillons naturels. En utilisant une quantification du nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 16S (proxy du nombre de *Bacteria*), il est alors possible de connaître l'abondance relative du groupe d'intérêt dans la communauté bactérienne totale. Pour ce faire, dans cette étude, nous avons dessiné des amorces spécifiques du *pufM* du groupe majoritaire dans les banques de

clones et créé un étalon de mesure avec des dilutions successives d'un nombre connu de copies de ce gène permettant ainsi d'estimer, par la suite, le nombre de copies de ce gène, dans les échantillons naturels. Nous avons fait de même avec un étalon de mesure de l'ARNr 16S et quantifié le nombre de copie de 16S dans les échantillons naturels. En prenant le ratio 1 gène *pufM* {Schwalbach, 2005 #546} pour 1,9 gène d'ARNr 16S {Campbell, 2008 #153} par cellule, nous avons pu calculer la proportion, dans la communauté bactérienne totale, de l'OTU majoritaire dans les banque de clones et ce le long de deux radiales rivière-large.

Nous avons abordé la diversité culturelle des BPAA en réalisant des isolements sur un milieu gélosé basé sur de l'eau de mer prélevée sur place (filtrée et stérilisée par autoclavage) contenant des sources de carbone variées en faible quantité, le LNHM (*Low Nutrient Heterotrophic Medium*) élaboré par Rappé *et al.* (2002) avec un ajout de DMSP permettant l'amélioration de croissance de certaines bactéries oligotrophes comme celles appartenant au groupe SAR11 (Stingl *et al.* 2007b). Les cultures d'isolement ont ensuite été placées dans des armoires thermostatées recréant des conditions de croissance proches de celles mesurées in situ, c.-à-d. environ 4°C avec des conditions faibles de luminosité ($120 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour la surface et $25 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour la DCM) en cycle jour - nuit 10:14. Les colonies produisant de la BChl *a* ont ensuite été détectées grâce à un système optique (Figure 47). Les isolats positifs ont été purifiés sur un milieu gélosé (Marine Agar dilué). Ces cultures ont été criblées par tRFLP (*terminal Restriction Fragment length Polymorphism*). Pour accroître la sensibilité de cette technique, nous avons utilisé des amorces sens et antisens toutes deux marquées ainsi qu'une double digestion avec 2 enzymes de restriction. L'ARNr 16S et le gène *pufM* représentants de chaque groupe tRFLP ont été séquencés dans les deux sens (sens, anti-sens) par la méthode classique de Sanger et assemblés en contig en utilisant CAPcontig sous Bioedit. L'alignement des séquences d'ARNr 16S obtenues et des proches séquences références identifiées par BLASTn a été effectué en utilisant un algorithme tenant compte de la structure secondaire de l'ARNr (MAFFT Q-INS-I). Leur affiliation génétique précise a été inférée par approche bayésienne, maximum de parcimonie, maximum de vraisemblance et par *neighbor-joining* avec un nombre élevé de ré-échantillonnages (*bootstrapping*, 500 ou 1 000 répliques), un arbre consensus fournissant une phylogénie robuste a été généré.

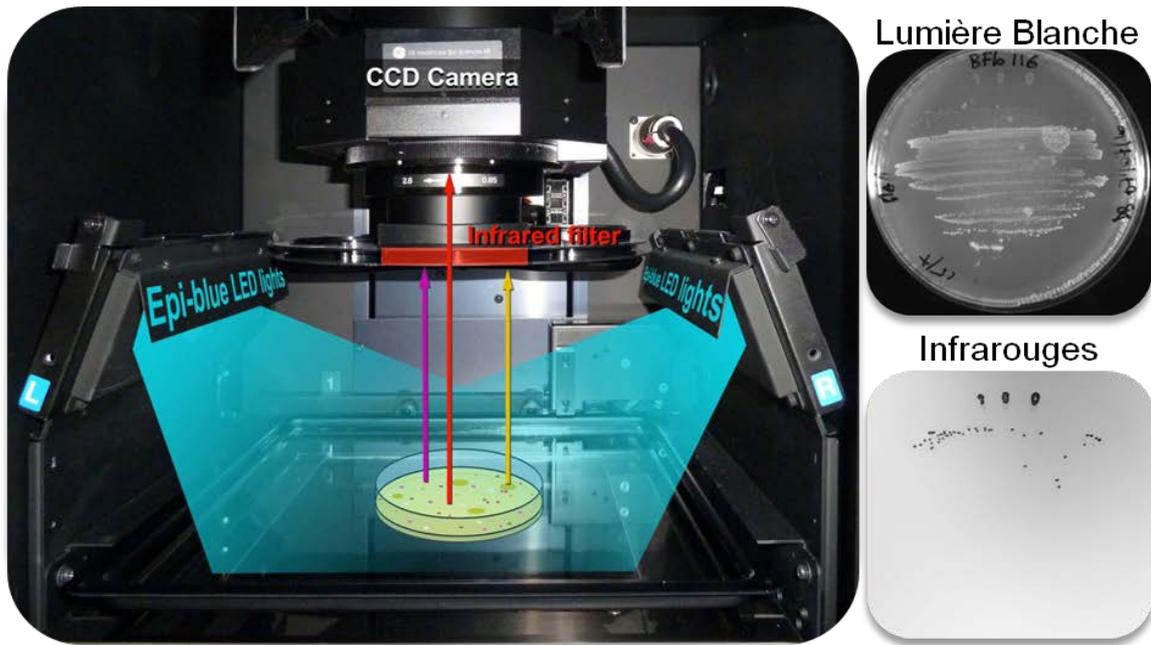


Figure 47. Système optique de détection des souches produisant de la BChl *a*. Le système est basé sur une épi-illumination dans le Cyan (390 ± 100 nm) par 2 rampes de LEDs, cette longueur d'onde excite la BChl *a* qui fluoresce alors dans l'infrarouge. Un filtre *long-pass* infrarouge (> 750 nm) placé devant une caméra CCD haute sensibilité permet de photographier uniquement les isolats émettant dans l'infrarouge.

La diversité moléculaire de *pufM* a également été évaluée. Les ADN totaux ont été extraits de 81 filtres Stérivex (cartouches de filtration stériles) de porosité $0,22 \mu\text{m}$ obtenus après préfiltration à $3 \mu\text{m}$ d'eau de mer collectés à partir de 29 stations (de 1 à 4 profondeurs par station). Les communautés de BPAA de ces échantillons ont été comparées par les empreintes moléculaires de leurs *pufM* obtenues par TTGE (*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*). Cette technique permet la séparation du mélange de séquences *pufM* amplifiées le long d'un gel d'électrophorèse donnant ainsi un profil unique à chaque communauté. Sur la base de cette comparaison, 13 banques de clones *pufM* ont été construites. Le choix des amorces utilisées pour amplifier le gène *pufM* s'est porté sur celles utilisées auparavant par Lehours *et al.* (2010). Il s'agit des amorces *pufM*-F (Béjà *et al.* 2002) et *pufM*-WAW (Achenbach *et al.* 2001). Un nombre suffisant de clones a été séquencé pour obtenir une couverture de banque proche ou supérieure à 80 % de la diversité estimée. Les séquences d'ADN obtenues ont été classées en OTUs (à 94 % de similarité) et alignées en fonction de la protéine encodée. Compte-tenu de la courte taille des fragments séquencés (~ 245 pb) et du fort taux de mutation sur les 3^{ème} et même 2^{nde} position du codon, ces séquences ont été ajoutées par parcimonie à un arbre robuste généré par inférence bayésienne à partir de séquences entières. Cette démarche est celle utilisée dans l'article de référence de Yutin *et al.* (2007). Une analyse des corrélations entre les paramètres environnementaux mesurés par les

autres participants de MALINA a permis d'explorer les relations qu'entretient la communauté BPAA avec son environnement abiotique. Ce choix a été motivé compte tenu d'analyses multivariées plus poussées (analyses des correspondances et des redondances canoniques, en composant principal, régressions multiples, positionnement multidimensionnel) n'ayant pas montré de résultats statistiquement fiables^{et/ou} n'apportant pas plus d'informations que de simples liens de corrélations (y compris en fragmentant de diverses façons le jeu de données).

5.2. Article 1: *Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean*

Article accepté dans FEMS Microbiology Ecology (IF 3.408)

Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean

Dominique Boeuf^{1,2}, Matthew T. Cottrell³, David L. Kirchman³, Philippe Lebaron^{4,5} &
Christian Jeanthon^{1,2}

¹*UPMC, Univ Paris VI, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique, Roscoff, France*

²*CNRS, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique, Roscoff, France*

³*School of Marine Science and Policy, University of Delaware, Lewes, Delaware, USA*

⁴*UPMC, Univ Paris VI, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-mer, France*

⁵*CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-mer, France*

Correspondence: Christian Jeanthon, Station Biologique, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France. Phone : +33 298292563 ; Fax : +33 298292324 ; E-mail: jeanthon@sb-roscoff.fr

Running title: AAP bacteria in the western Arctic Ocean

Keywords: photoheterotroph; aerobic anoxygenic phototrophic bacteria; *pufM* gene; bacteriochlorophyll; Arctic Ocean; Mackenzie River

Abstract

Aerobic anoxygenic phototrophic (AAP) bacteria are found in a range of aquatic and terrestrial environments, potentially playing unique roles in biogeochemical cycles. Although known to occur in the Arctic Ocean, their ecology and the factors that govern their community structure and distribution in this extreme environment are poorly understood. Here, we examined summer AAP abundance and diversity in the North East Pacific and the Arctic Ocean with emphasis on the southern Beaufort Sea. AAP bacteria comprised up to 10 and 14% of the prokaryotic community in the bottom nepheloid layer and surface waters of the Mackenzie plume, respectively. However, relative AAP abundances were low in offshore waters. Environmental *pufM* clone libraries revealed that AAP bacteria in the *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* classes dominated in offshore and in river-influenced surface waters, respectively. The most frequent AAP group was a new uncultivated betaproteobacterial clade whose abundance decreased along the salinity gradient of the Mackenzie plume even though their photosynthetic genes members were actively expressed in offshore waters. Our data indicate that AAP bacterial assemblages represented a mixture of freshwater and marine taxa mostly restricted to the Arctic Ocean and highlight the substantial influence of riverine inputs on their distribution in coastal environments.

Introduction

Aerobic anoxygenic phototrophic (AAP) bacteria are photoheterotrophs that require oxygen for their growth and for bacteriochlorophyll *a* (Bchl *a*) synthesis. They inhabit a wide variety of illuminated habitats in diverse terrestrial, freshwater, and marine environments (Béjà *et al.* 2002, Csotonyi *et al.* 2010, Atamna-Ismaeel *et al.* 2012). First discovered in coastal marine waters (Shiba *et al.* 1979), AAP bacteria have been intensively studied in the marine environment (Cottrell *et al.* 2006, Mašín *et al.* 2006, Lehours *et al.* 2010). Their abundance and distribution vary greatly among oceanic regimes, suggesting that there is a broad range of potential ecological niches for these microbes. AAP bacteria seem to be more abundant in shelf and coastal areas than in the open ocean (Schwalbach et Fuhrman 2005, Sieracki *et al.* 2006). Although their abundance can be high in some oligotrophic regions (Lami *et al.* 2007), AAP bacteria typically constitute a small percentage (2 to 4%) of total prokaryotes in oceanic environments (Cottrell *et al.* 2006, Jiao *et al.* 2007). However, their proportions can exceed 10% in eutrophic estuaries (Waidner et Kirchman 2007). Despite the lower abundances in most oligotrophic pelagic marine environments, AAP bacteria constitute a very dynamic part of the bacterial community and potentially contribute significantly to the cycling of organic carbon in the upper ocean (Koblížek *et al.* 2007). Culture-dependent and -independent studies have shown AAP bacteria to be genetically diverse with members of the *Alpha*-, *Beta*-, and *Gammaproteobacteria* (Béjà *et al.* 2002, Yutin *et al.* 2007, Jeanthon *et al.* 2011). The environmental factors controlling the population structure and diversity of these photoheterotrophic bacteria remain poorly understood.

Arctic marine ecosystems are characterized by strong seasonality in incident light, ice cover, temperature, and river discharge which affect salinity and other biogeochemical properties. In the Beaufort Sea, the Mackenzie River delivers considerable freshwater, nutrients and organic matter which exert strong controls on the productivity, salinity and

water circulation (Aagaard et Carmack 1989, Opsahl *et al.* 1999). Despite a short growing season and extensive sea ice coverage, the most river-influenced of the world's oceans supports a productive aquatic ecosystem. Recent studies over the Mackenzie Shelf in the Beaufort Sea have revealed diverse and active communities of Bacteria and Archaea that vary across salinity gradients (Galand *et al.* 2006, Garneau *et al.* 2006, Galand *et al.* 2008a).

Our current knowledge of the abundance, distribution, and activity of AAP bacteria in perennially cold marine waters is still limited. In the only study in the Arctic, AAP bacteria contributed 5 to 8% of the total prokaryotic community in close coastal sites of the western Beaufort and eastern Chukchi Seas (Cottrell et Kirchman 2009). Seasonal shifts in the abundance of AAP bacteria between summer and winter paralleled changes in the abundance of the total prokaryotic community. There were no substantial shifts in the community structure of AAP bacteria between the two seasons. Although *pufM* genes in Arctic surface waters could be assigned to taxonomic groups previously identified in metagenomic shotgun sequences from the GOS expedition (Yutin *et al.* 2007), their sequences were distinct from those retrieved in lower-latitude waters (Cottrell et Kirchman 2009). The latter study was limited to a couple of coastal sites and did not examine, for example, the transition zones between offshore and large Arctic rivers that have a major influence on coastal ocean biogeochemistry.

In this study, we collected samples across a several-thousand kilometers transect above the 60°N latitude that yielded an unprecedented resolution of the Beaufort Sea during summer. To examine the AAP bacterial community structure and factors that govern it, we combined the use of infrared epifluorescence microscopy and culture-dependent and independent approaches. The Beaufort Shelf surface circulation is strongly influenced by ice, winds and freshwater input resulting from river discharge and sea-ice melt. We hypothesized

that AAP bacterial abundance and composition would change substantially along this transect and that riverine inputs would have a substantial influence on the AAP bacterial populations.

Materials and methods

Study area, sampling and oceanographic parameters

The MALINA cruise took place onboard the Canadian research icebreaker *CCGS Amundsen* during summer 2009 from Victoria (BC, Canada) to the Beaufort Sea (Leg 1b) and then throughout the Beaufort Sea (Leg 2b) (Fig.1). Most of the stations sampled on the west–east transect in the Beaufort Sea (leg2) were ice-free. However, surface waters of eastward offshore waters were still ice-covered. Surface seawater samples were collected with a clean bucket during Leg 1b and in the Mackenzie plume (stations 395, 398, 694, and 697) during Leg 2b. In the Beaufort Sea, seawater was collected from six depths using Niskin bottles mounted on a CTD (conductivity temperature depth probe) rosette. Ancillary data of temperature, salinity, pH, dissolved oxygen, colored dissolved organic matter, inorganic and organic nutrients, and chlorophyll *a* are given in Table S1.

Bacterioplankton biomass for DNA and total RNA extraction were collected onboard. Seawater samples were prefiltered through 47 mm diameter and 3 µm pore size polycarbonate filters (Cyclopore, Whatman, USA) before the final collection of bacterioplankton cells onto 0.22 µm-pore-size Sterivex cartridges (Millipore, USA) for DNA extraction or onto 27 mm diameter and 0.22 µm-pore-size Durapore filters (Millipore, USA) for RNA extraction. Sterivex cartridges were filled with 1.6 ml of lysis buffer (0.75 M sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 8), immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. To limit the degradation of mRNA, small volumes of seawater (~ 1 liter) were filtered as rapidly as possible, immediately upon retrieval of the CTD. RNA filters were transferred in collection

tubes containing 0.8 ml of RLT buffer (Qiagen, Hamburg, Germany) with 1 % of β -mercaptoethanol, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. The time from the start of filtration to storage was 15-20 min.

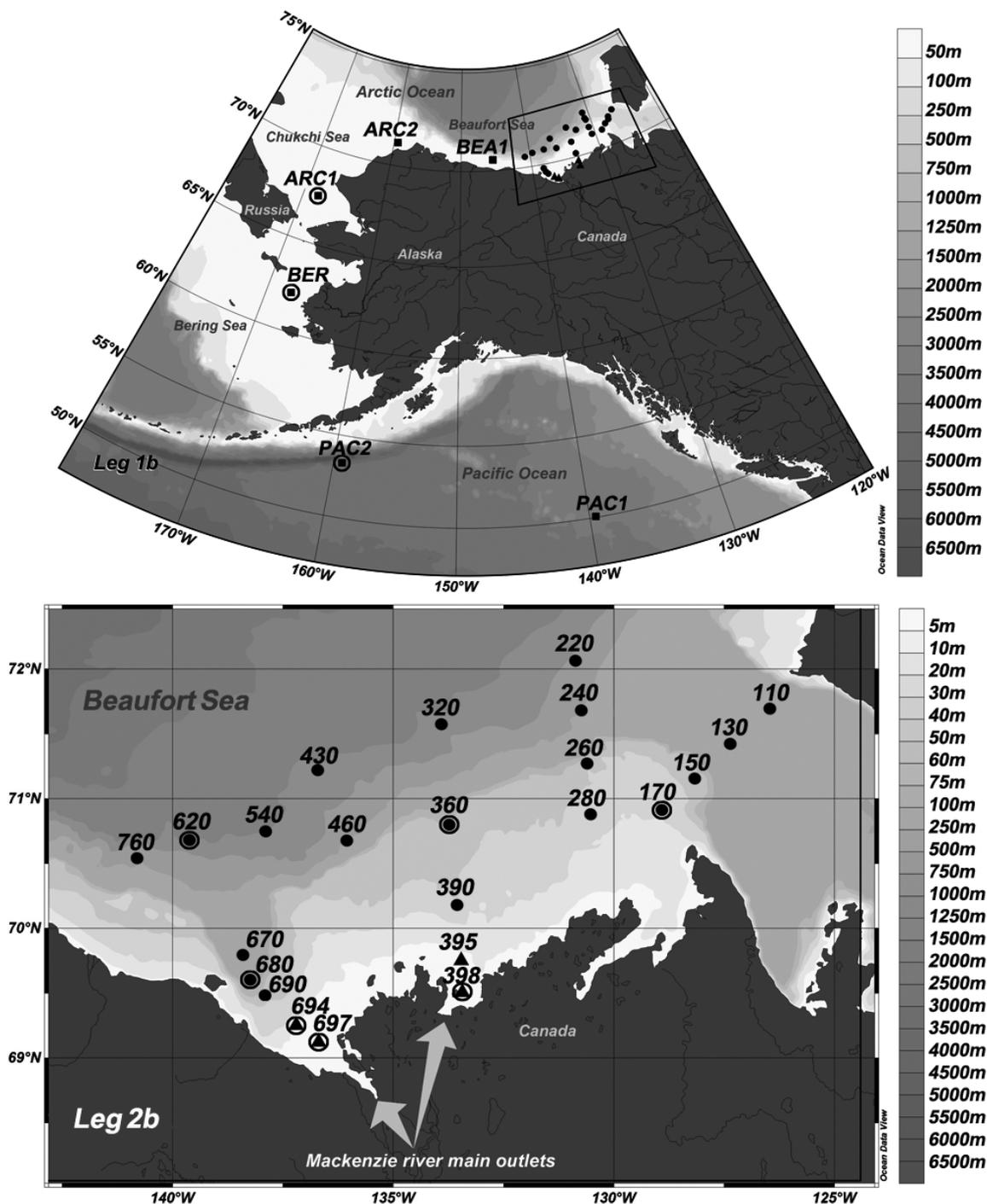


Fig. 1. Locations of stations sampled during legs 1b and 2b of MALINA cruise. Leg 1b stations (black squares) were sampled only at the surface; leg 2b stations were sampled at several depths (black dots) or only at the surface (black triangles). Circles indicate stations where *pufM* clone libraries were constructed. Grey shades correspond to bottom depths.

Microscopic enumeration of AAP bacteria and total prokaryotes

Prokaryotes were enumerated by epifluorescence microscopy of paraformaldehyde-fixed samples that were filtered onto 0.2- μm pore-size black polycarbonate filters. Filters were stored at -80°C for up to 4 months prior to analysis. Total prokaryotes were enumerated after staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), $1\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ final concentration in $1\times$ phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min. The AAP bacteria were enumerated using an Intensified Retiga charge-couple device camera (Qimaging, Surrey, BC Canada) and image analysis routines to enumerate cells that fluoresce blue when stained with DAPI and have infrared fluorescence (BChl *a* signal), but not red or orange fluorescence (Chl *a* and phycoerythrin signals, respectively) (Cottrell *et al.* 2006). AAP bacterial abundance data were imported into Ocean Data View version 4 (Schlitzer 2010) and interpolated using the DIVA gridding tool.

Isolation and identification of AAP bacterial strains

Seawater samples (50-100 μl) collected at the surface and at the deep chlorophyll maximum (DCM) were spread onto low nutrient heterotrophic medium (Cho et Giovannoni 2004) prepared using seawater collected at station 860 at the surface and the DCM, respectively. Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) was added to the medium at a final concentration of 100 nM. Culture plates were incubated for up to 2 months at 4°C into thermostatic cabinets illuminated by luminescent tubes at irradiance levels of $120\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (for surface samples) and $25\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (for DCM samples). BChl *a*-containing colonies were detected as previously described (Jeanthon *et al.* 2011).

Bacterial DNA was extracted using the QuickExtract™ Bacterial DNA Extraction Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). Small-subunit (16S) rRNA genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using universal reverse primer 1492R and

Bacteria-specific forward primer 27F (Table 1), whose 5' ends were labeled with 6-hexachlorofluorescein (6-HEX) and with 6-carboxyfluorescein (6-FAM), respectively. Reaction mixtures (25 μ L) contained 5 X buffer (5 μ l), 2mM MgCl₂, 10 pmoles of each desoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Eurogentec, Seraing, Belgium), 10 pmoles of each oligonucleotide primer, 1.25 U of GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) and 1 μ l of cell extract. The initial denaturation step consisted of heating the reaction mixture at 95 °C for 5 min, and the thermal profile then consisted of 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and extension at 72 °C for 1.5 min. A final extension step was carried out at 72 °C for 10 min. The PCR products were digested with the restriction endonucleases *Hinf*I and *Msp*I (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) for 4 h at 37°C. After enzymatic inactivation at 80°C for 20 min, T-RFLP digests were diluted in Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems, Carlsbad CA, USA) and terminal-restriction fragments (T-RFs) were separated in a 3130 *xl* Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Data were analyzed using the PeakScanner™ Software (Applied Biosystems).

16S rRNA gene sequences of at least two randomly chosen strains from each T-RFLP group were amplified by PCR using 8F-1492R primers (Table S2) following the same conditions as described above. PCR products were purified by ExoSAP-IT PCR purification kit (GE Healthcare) and sequenced using the latter primers with an ABI 3130 POP7 sequencer (Applied Biosystems).

16S rRNA gene sequences were compared to sequences in public databases with BLASTn (Altschul *et al.* 1997). The new sequences were aligned using the Q-INS-I algorithm of the MAFFT sequence alignment program version 6.5 (Katoh *et al.* 2009). A set of 16S rRNA sequences with high similarity to those determined in this study were retrieved and added to the alignment. Phylogenetic trees were computed using Bayesian, neighbor-joining,

maximum parsimony and maximum likelihood inference approaches using MrBayes (Ronquist et Huelsenbeck 2003) and MEGA 5 softwares (Tamura *et al.* 2011), respectively.

The presence of *pufM* was determined by using PCR amplification with specific primers (Lehours *et al.* 2010). When necessary, bands of the targeted size were isolated from the gel using a DNA gel extraction kit (Millipore, Billerica, MA, USA). Gel-purified products were concentrated with a Microcon YM50 centrifugal filter devices (Millipore) and sequenced using *pufMF* and *pufM-WAW* primers (Table S2).

Diversity analysis of *pufM* gene

A total of 42 DNA samples were extracted as previously described (Marie *et al.* 2010). To select samples for *pufM* diversity analysis, amplification and fingerprinting of *pufM* communities using temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) were performed as described by Lehours *et al.* (2010). For the construction of partial *pufM* DNA clone libraries, fresh PCR products were cloned directly or after gel purification using the TOPO-TA cloning kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The sequences were trimmed to remove any vector and primer sequences. DNA sequences were translated into amino acid sequences and aligned using the ClustalW program in MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). The resulting protein alignment was back-translated to nucleotide acid sequences that were realigned manually. A conservative value of 94% nucleic acid sequence similarity was chosen for clustering sequences into Operational Taxonomic Units (OTUs) using MOTHUR (Schloss *et al.* 2009). Representative sequences (defined as the sequence with the minimum distance to all other sequences in the OTU) were obtained using MOTHUR. The coverage value (Mullins *et al.* 1995), the Shannon index, $H_{Shannon}$ (Shannon *et al.* 1949) and the bias-corrected richness-estimator, S_{Chao1} (Chao *et al.* 2005) were calculated for each library.

A *pufM* database containing 35 aligned sequences (720 total nucleotide positions) of cultured species and environmental clones retrieved from GenBank and the GOS scaffold nucleotide sequences was constructed using MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011) according to (Yutin *et al.* 2007). A phylogenetic tree was constructed by Bayesian inference using MrBayes with substitution rates varying according to codon positions. Four parallel MCMC chains of 3.5 million generations were run; trees were sampled every 100 generations. A consensus tree was constructed after the exclusion of 10,000 ‘burnin’ trees. The *pufM* database and the consensus tree were imported into ARB software (Ludwig *et al.* 2004). Representative sequences of each OTU (245 pb) and short *pufM* environmental reference sequences were aligned as above and added to the consensus Bayesian tree using the ADD_BY_PARSIMONY algorithm implemented in ARB. Non-informative taxa were removed from the final tree.

For cluster analysis, the dataset was randomly resampled before analysis. A distance matrix was computed from the presence of OTUs in clone libraries at a 94% identity threshold using Dice coefficient (Dice 1945) and a dendrogram was inferred with the unweighted pair-group average algorithm (UPGMA) as implemented in XLSTAT (Addinsoft, New York, USA).

***In situ* abundance of OTU 6 members**

OTU 6, the most abundant group retrieved in the *pufM* libraries, was targeted by qPCR. Primers targeting specifically *pufM* genes from OTU 6 (Table S2) were designed using ARB. Primer specificity was confirmed by constructing a clone library as described above and sequencing 31 clones. All sequences were identical to those of OTU 6 members. QPCR conditions were as in Table S2. Two plasmid clones from our *pufM* and 16S rRNA libraries were used as positive controls and for standard curves (10-fold dilution series) in the qPCR

assays. Plasmid DNA was linearized with *Hind*III and quantified using the Picogreen assay (Invitrogen).

QPCR was performed in triplicate, with 1 μ l of environmental sample DNA normalized to 100 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ or plasmid DNA solution in a total reaction volume of 10 μ l using the SYBR *Green/ROX* qPCR *Master Mix* kit (Applied Biosystems). QPCR assays were performed using a Chromo4 Real-Time PCR Detection System and the Opticon Monitor software package (Bio-Rad) with the following thermal cycling conditions: 95°C for 15 min, 45 cycles of denaturation at 95°C for 45 s, primer annealing at the primer-specific annealing temperature (Table S2) for 45 s with fluorescence measurements after this step, and polymerase extension at 72°C for 15 s. Melting curves were generated after each assay to check the specificity of the amplification by heating from 65 to 95°C at a rate of 0.1°C.s⁻¹ and taking fluorescence measurements every 0.5°C. Only single peaks were observed in the dissociation curves for both the standards and samples, indicating specific amplification with each set of primers. Average amplification efficiencies were as follows: 16S rDNA = 99.2% and OTU 6-*pufM* = 97%.

No inhibition was detected when a known quantity of standard was added to DNA extracts from surface waters of stations 697, 680, 620 and 398 (data not shown). The estimates of OTU 6-*pufM* abundance were normalized to 16S rRNA gene abundance in order to estimate the fraction of the bacterial community bearing OTU 6-*pufM* type (Campbell *et al.* 2008).

Activity of OTU 6 members

Reverse-transcription PCR was used to produce cDNA from mRNA transcripts to determine whether *pufM* was being transcribed by OTU 6 members at the time of sampling. RNA samples were extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's

instructions with several modifications. Glass beads (50 μ l) were added to the samples after thawing on ice and the tubes were mixed vigorously for 10 min. Genomic DNA was removed using a Turbo DNA-free kit (Ambion, Life Technologies, Paisley, UK). DNA removal in RNA samples was confirmed by control PCR amplifications without the reverse transcription step. No amplification was detected in these controls. ThermoScript RT-PCR system (Invitrogen, Carlsbad, USA) was used for the reverse transcription of *pufM* mRNA from total RNA samples. All reverse transcription reactions were performed in a total reaction volume of 10 μ l. cDNA synthesis was performed at 55 °C using the reverse primer as gene-specific primer. PCR products obtained as above were cloned directly or after gel extraction and sequenced. *pufM* genes amplified using cDNA from station 620 were cloned and sequenced as described above. Of 31 clones that were analyzed, all contained the expected *pufM* gene sequences.

Nucleotide sequence accession numbers

Unique environmental *pufM* gene sequences obtained in this study are available in GenBank database under the accession numbers JN248465 to JN248539. The 16S rRNA and *pufM* gene sequences of the isolates are available in GenBank database under the accession numbers JN248461 to JN248464 and JN378828 to JN378831, respectively.

Results

Oceanographic context

Using salinity and temperature profiles, several water masses were delineated in the Beaufort Sea/Mackenzie system (Fig. S1; Table S1). Surface waters in the Mackenzie plume stations and under the influence of the Firth river (station 680) displayed the highest temperatures and

lowest salinities. The influence of the Mackenzie decreased eastward in the shelf where colder and denser surface waters were recorded. Ice melting in offshore waters likely resulted in fresher and colder surface waters. Below 40-50m depth, cold, high salinity deep ocean waters consistent with Pacific Ocean intrusion were observed. Nitrate concentrations in surface waters were low. Surface-water phosphate increased with salinity, whereas silicate and nitrate decreased, as expected in this river-influenced region (Carmack *et al.* 2004). Similar to hydrographic features, total Chl *a* levels decreased greatly from the river plume region towards the more oligotrophic and marine shelf and offshore waters.

Abundance of total prokaryotes and AAP bacteria

Total prokaryotic abundances ranged from 9.1×10^4 cells ml⁻¹ to 3.4×10^5 cells ml⁻¹ in surface waters sampled from the North Pacific Ocean to the Chukchi Sea. Along this transect, AAP bacterial abundances as measured by infrared epifluorescence microscopy were low (about 0.1% to 0.5%) but the contribution (14.8%) was high in the Chukchi Sea (ARC1). In the Beaufort Sea, abundances of total prokaryotes decreased slightly from the river plume to offshore surface waters (Table S1; Fig. 2a to 2d). Similar to total Chl *a*, AAP abundances dropped 10-fold between the plume and the shelf surface waters and by another 10-fold between the shelf and offshore surface waters (Fig. 2e; Table S1). AAP bacterial abundances were highest in surface waters of the Mackenzie plume (6.3 %), reaching 14% of total prokaryotes at station 398 (Fig. 2f and 2g). High contributions (up to 10%) were also found in the bottom nepheloid layer (BNL) of transects 200 and 300 (Fig. 2g and 2h).

For the overall dataset, total prokaryotes and AAP bacterial abundances were positively correlated with temperature and negatively with salinity (Table S3). AAP proportions correlated significantly with ammonium, silicate, total, particulate, and dissolved organic carbon, nitrogen, and phosphorus and total Chl *a*. In contrast to relative AAP bacterial

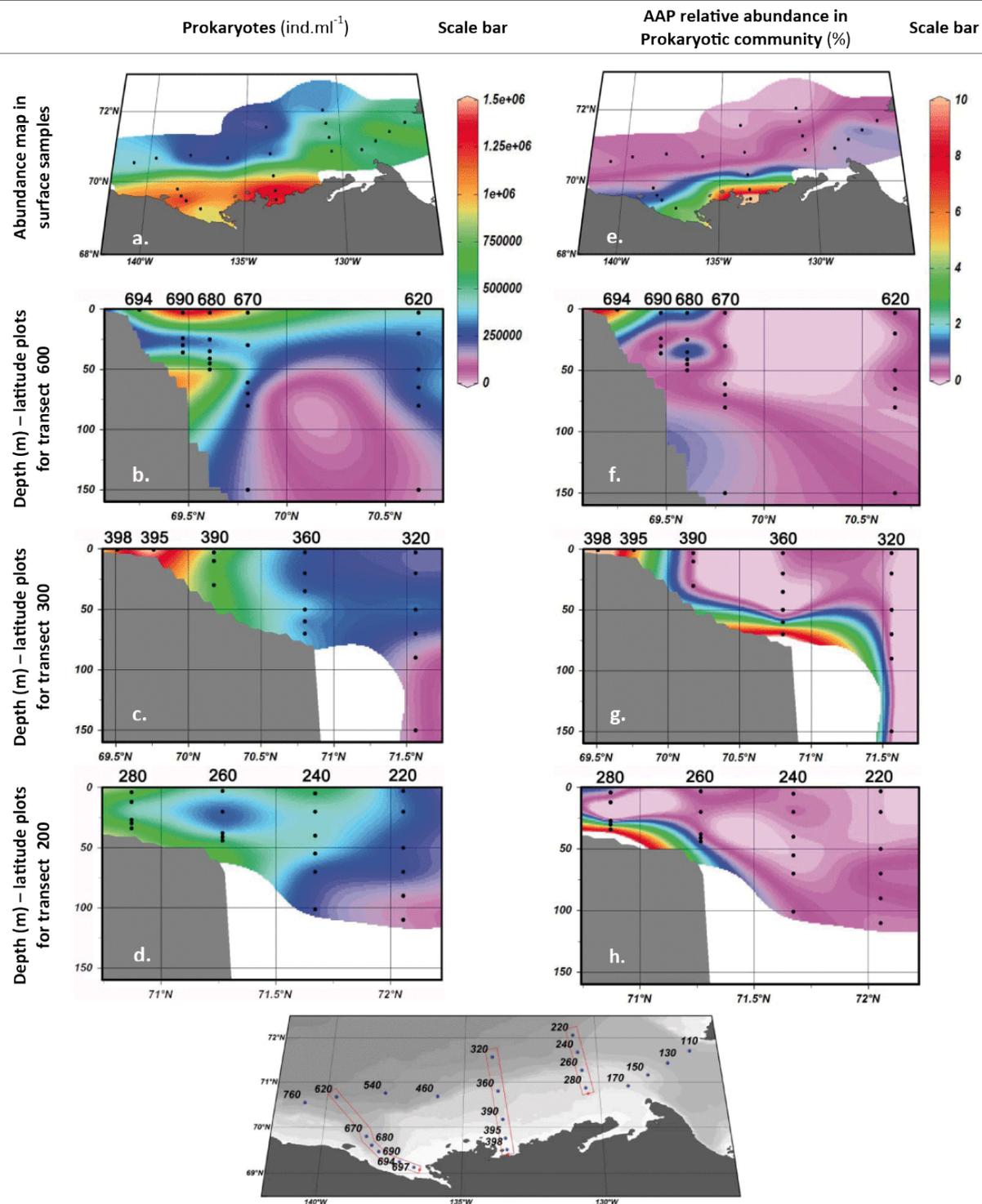


Fig. 2. Spatial distribution of total prokaryotes (cells ml⁻¹) and AAP bacteria (%) in surface waters of the Beaufort Sea (a, e) and along the transects 600 (b, f), 300 (c, g) and 200 (d, h) as shown on the map (e).

abundance, total prokaryote abundance did not covary significantly with most of the parameters. High AAP bacterial abundances in the BNL were related to dissolved inorganic nitrogen and phosphorus, suggesting the presence of a diffusive flux of nutrients from the organic-rich sediments, the BNL, or both (Sundby *et al.* 1992).

Diversity and distribution of environmental *pufM* sequences

Based on their TTGE band patterns and their location, 13 samples were selected for further cloning and sequencing. Of 365 clones analyzed, 43 distinct OTUs were identified after grouping the sequences at 94% nucleic acid sequence similarity⁶⁶. The diversity in the river-influenced stations was high as indicated by the S_{Chao1} values (estimated numbers of expected OTUs) and diversity indices (Table S4) while the coverage index was low. However, coverage estimates (> 83%) and rarefaction curves (data not shown) indicated that most of the diversity was detected in the libraries from marine stations. The diversity of AAP bacteria was generally lower in surface than in deeper waters. Cluster analysis of the AAP bacterial community composition separated the Beaufort Sea samples in two main clusters according to water masses (Fig. S2). One contained surface samples (upper polar mixed layer) and the other grouped waters below 50m (Pacific summer water). North Pacific Ocean and Bering Sea samples grouped together.

A phylogenetic tree was constructed for all 43 OTUs from this study and from previous studies of *pufM* sequences (Fig. 3). The phylogenetic analysis revealed that 41 OTUs were tentatively assigned to either *Alpha*- (22 OTUs, ~ 49 % of the sequences) or *Betaproteobacteria* (17 OTUs; ~ 48% of the sequences). Two OTUs (~ 2 % of the sequences) belonged to *Gammaproteobacteria*. Two singletons could not be confidently assigned.

⁶⁶ Pour le détails des OTUs et leur affiliation phylogénétique, voir Tableau III page 173

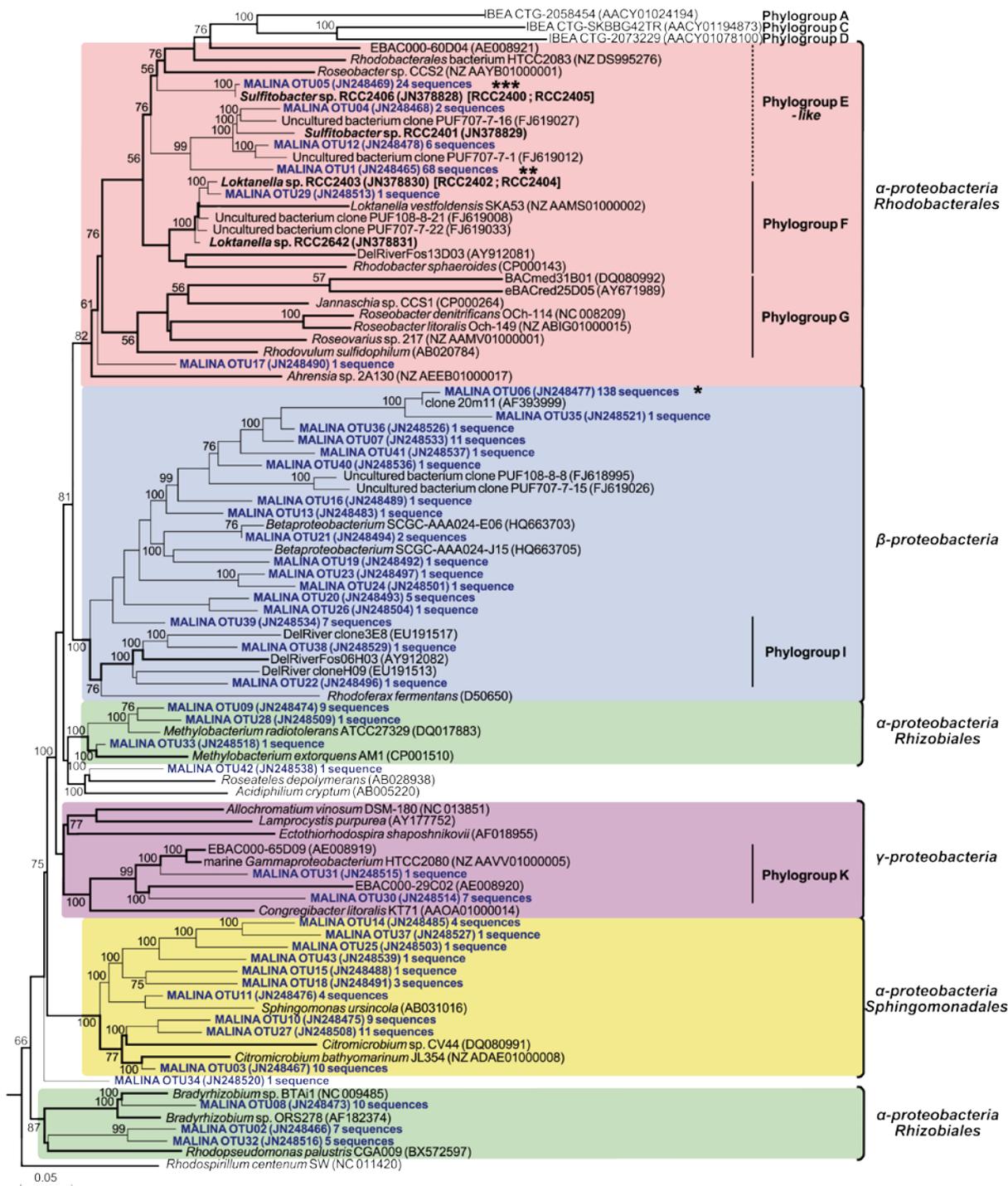


Fig. 3. Phylogenetic tree showing the relationships between *pufM* gene sequences from MALINA isolates (in bold) and environmental samples (in blue) and relatives retrieved in GenBank (in black). Asterisks indicate the three most abundant OTUs in clone libraries. The tree is based on a bayesian tree to which short sequences were added by ARB_PARSIMONY. Initial bayesian tree is shown in bold lines. The numbers on nodes represent branch confidence values. Vertical bars indicate taxonomic groups defined by Yutin *et al.* (2007). The scale bar represents dissimilarity between nucleotide positions.

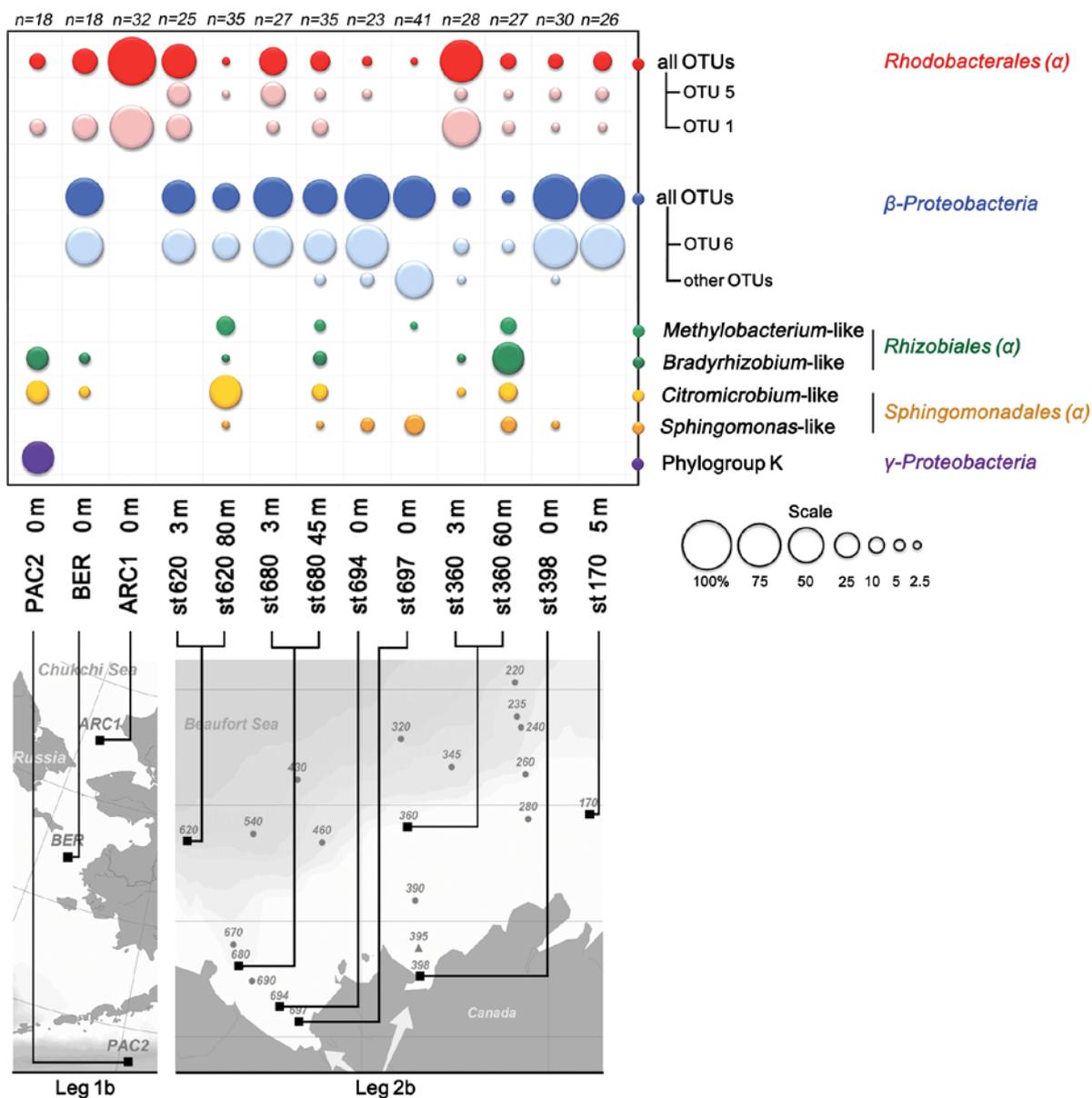


Fig. 4. Relative abundance of phylogenetic clusters in samples from the North Pacific waters (leg 1b) to the Beaufort Sea (leg 2b). Numbers of analyzed clones in each library are indicated.

The betaproteobacterial OTU 6 was the most frequent OTU (38 % of the sequences) and had *pufM* sequences partially identical (153 bp out of 245 bp) to that of environmental clones from the Monterey Bay (Béjà *et al.* 2002). OTU 6 belonged to a large cluster of 13 OTUs that also contained two sequences obtained by single-cell sequencing (Martinez-Garcia *et al.* 2012) and a mixture of arctic sequences (Cottrell et Kirchman 2009), but it did not have

any close relationship to known AAP bacteria. Two singleton OTUs belonged to betaproteobacterial phylogroup I defined by Yutin *et al.* (2007) that formed a sister lineage containing sequences of fosmid clones from the Delaware river (Waidner et Kirchman 2005) and *Rhodoferrax fermentans* (Page *et al.* 2004). Betaproteobacterial sequences dominated in clone libraries from river-influenced waters (Fig. 4). OTU 6, the most abundant OTU, was recovered in all Beaufort Sea stations and in the Bering Sea but was absent in the North Pacific Ocean and Chukchi Sea.

Alphaproteobacterial OTU 1 and OTU 5, the second and third most abundant OTU (18.6% and 6.6% of the sequences, respectively) together with OTU 4, -12 and -29 were closely related to environmental clones recovered from the Chukchi and Beaufort Seas (Cottrell et Kirchman 2009) (Fig. 3). These sequences dominated libraries from offshore waters of the Beaufort and Chukchi Seas. Among them, OTUs 4 and 5 were only detected in the Beaufort Sea (Fig. 4). In contrast, OTU 1 was retrieved from the North Pacific Ocean to the Chukchi Sea with relative proportions increasing northwardly. It also occurred in most Beaufort Sea samples.

Other *Alphaproteobacteria* grouped mainly with cultivated members of the *Bradyrhizobiaceae* and of genera *Citromicrobium*, *Methylobacterium* and *Sphingomonas* (Fig. 3). *Bradyrhizobiaceae*- and *Citrobacterium*-like sequences showed similar distribution patterns. They co-occurred in surface waters of the North Pacific Ocean and in shelf and offshore DCM layers of the Beaufort Sea. Sequences related to *Sphingomonas* and *Methylobacterium* were only found at the surface in the Mackenzie mouth and at the DCM level along the plume (Fig. 4). Gammaproteobacterial OTUs belonged to the phylogroup K defined by Yutin *et al.* (2007). They prevailed in surface waters libraries of the North Pacific Ocean but were not detected in higher latitude samples.

Diversity of AAP isolates

To gain more insights into the origin of the *pufM* genes obtained in this study, AAP bacteria were isolated that grew on low nutrient heterotrophic medium. BChl *a*-containing colonies were detected only from shelf and offshore surface waters of the Beaufort Sea. Based on T-RFLP analyses of 16S rRNA gene, the 92 *pufM*-positive strains were distributed in four groups (Table 1). In accordance with their position in the *pufM* phylogenetic tree (Fig. 3), representative strains of these groups had 16S rRNA gene sequences closely related to *Sulfitobacter* and *Loktanella* (Fig. 5). Interestingly, the *pufM* partial sequences of most isolates were identical or nearly identical to environmental sequences obtained in this study. About half of the isolates were affiliated with *S. marinus* (Fig. 5) and had *pufM* sequences that matched with OTU 5, the third most abundant OTU in the *pufM* libraries (Fig. 3). The 16S rRNA gene sequences of both *Sulfitobacter* representatives RCC 2406 and RCC 2401 were most closely related with that of isolates from Antarctic Sea ice and Arctic marine sediments, respectively (Table 1). The two other T-RFLP groups were affiliated to the genus *Loktanella*. Both *Loktanella* groups had *pufM* sequences almost identical to that of OTU 29. On the basis of their 16S rRNA gene sequences, both groups clustered with strains isolated from Antarctic lakes (Van Trappen *et al.* 2004), the major one having a sequence similar to that of *Loktanella* sp. WM1 isolated from the Baltic Sea (Salka *et al.* 2008). No gamma- or betaproteobacterial AAP strains were isolated.

Table 1. Main features of T-RFLP groups determined among the 92 AAP isolates and affiliation of their representative strains.

T-RF size (bp)		Nb of strains	Representative strains	16S rRNA gene closest relative			<i>pufM</i> gene closest relative		
FAM ^a	HEX ^b			Name	Accession number	% similarity	Name	Accession number	% similarity
300	121; 123	47	RCC 2406 (RCC 2405; RCC 2400)	<i>Sulfitobacter</i> sp. ZS5-11	FJ196046	99	Unc.bacterium MALINA OTU5	JN248469	100
298	123; 125	2	RCC 2401	<i>Sulfitobacter</i> sp. ZS2020	FJ889550	99.6	Unc.bacterium MALINA OTU4	JN248468	92
299	123; 125	41	RCC 2403 (RCC 2402; RCC 2404)	<i>Loktanella</i> sp. WM1	EF421433	100	Unc.bacterium MALINA OTU29	JN248513	99
298	123; 124;125	2	RCC 2642	<i>Loktanella</i> <i>salsilacus</i> LMG 22002	AJ582229	99.5	Unc.bacterium MALINA OTU29	JN248513	99

^aFAM, carboxyfluorescein; ^bHEX, hexachlorofluorescein; T-RF, terminal restriction fragment;

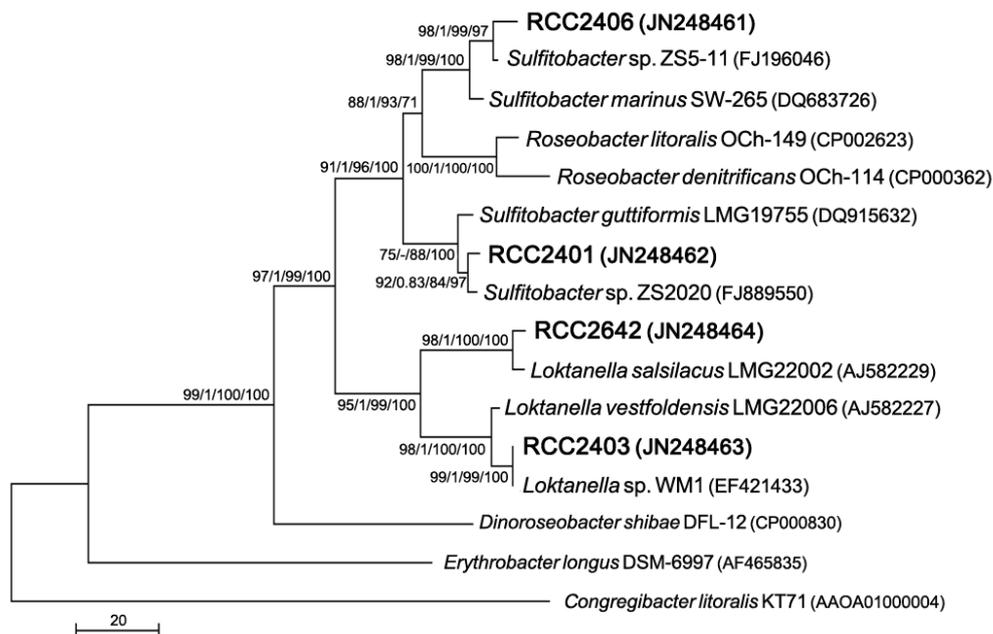


Fig. 5. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA sequences indicating the position of MALINA isolates. Numbers show nodal supports from bayesian posterior probabilities, and maximum likelihood, maximum parsimony and neighbor-joining analyses, respectively. The scale bar represents dissimilarity percentage between nucleotide positions.

Abundance and activity of OTU 6 members

Since *pufM* in the OTU 6 clade clustered with betaproteobacterial sequences, we hypothesized that OTU 6 members would have a freshwater origin. The relative abundance of OTU 6 was investigated using quantitative PCR along the two salinity gradients of the Mackenzie River (transects 300 and 600). Proportions of OTU 6-like *pufM* genes decreased gradually from higher-temperature and lower-salinity to lower-temperature and higher-salinity waters in both transects (Fig. 6). However, we noticed a high proportion of OTU 6 at station 680 associated with increasing temperature and decreasing salinity. This contribution was higher than the expected based on simple dilution. It could be related to a local input of OTU 6 members released from the Firth River. A subsequent PCR survey of our samples using specific primers detected OTU 6 members in all Beaufort Sea surface samples except at the three northern offshore stations (110, 220, and 320).

To investigate if members of this clade actively express photosynthetic genes in cold marine waters, we extracted mRNA from surface samples of transect 600 and amplified OTU 6-specific genes. We confirmed by sequencing that all *pufM* cDNA clones were OTU 6 members. Active OTU 6 members were detected in all samples including the most offshore station 620, although their contribution to total abundance was low according to qPCR assays (Fig. 6).

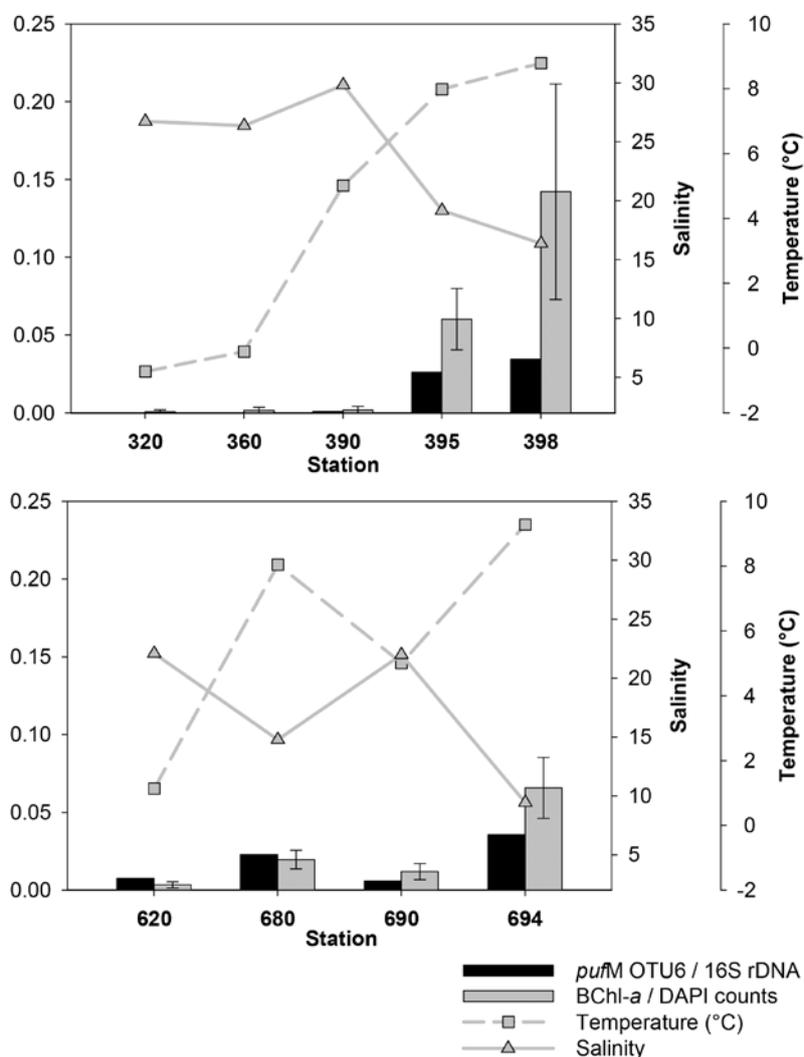


Fig. 6. Surface relative abundance of OTU 6 members (qPCR) and AAP bacteria (IR microscopy) along transects 300 and 600 in relation with temperature and salinity.

Discussion

Little is known about AAP bacteria in polar environments. The main objective of this study was to explore their abundance, diversity, and distribution patterns in a significant and typical

arctic region and to evaluate their ecology and biogeographical trends. Our results indicate that the distribution patterns generally observed in oligotrophic open ocean and eutrophic estuarine environments of temperate and tropical regions (Jiao *et al.* 2007, Lamy *et al.* 2011) also occur in the Beaufort Sea.

Links between AAP population abundance and environmental variables

Our results indicate that particulate and dissolved organic matter and Chl *a* concentrations positively influenced the relative abundance of AAP bacteria but did not contribute to the success of the prokaryote community as a whole. This suggests that AAP bacteria may respond to organic supply differently and have higher mineralization capacities than the bacterial community. In addition to AAP bacteria associated with the thick surface turbidity layer, proportions of AAP bacteria were high in the thinner but more turbid bottom nepheloid layer. Interestingly, AAP bacteria in surface and bottom layers showed contrasting relationships to several environmental variables, suggesting that the two particle-rich environments represent substantially different habitats. The two habitats could differ because of different types of particles in the water column, phytoplankton, and mineral-rich fine particles in the surface layer and coarse aggregates of suspended sediments in the bottom layer (Doxaran *et al.* 2012). These particle-rich waters might be important not only in terms of sediment transport but also as sites of microbially mediated organic transformations. The latter possibility is consistent with observations of increased microbial production and activity in particle-rich surface and bottom waters of the Mackenzie plume (Vallières *et al.* 2008, Garneau *et al.* 2009). Although we did not quantify the proportion of particle-associated AAP bacteria, earlier studies in other nutrient-rich environments (Waidner et Kirchman 2007) suggest that they may represent a significant part of the AAP bacterial community in the Mackenzie plume. Being associated with particles seems to enhance the synthesis of BChl *a*

in estuaries (Waidner et Kirchman 2007, Cottrell *et al.* 2010). It is likely that the energy gained by AAP bacteria via phototrophy in these environments is suitable for cost-intensive metabolic processes such as degradation of humic-rich DOM from riverine and terrestrial runoff.

AAP bacterial diversity and distribution

Most OTUs recovered were closely related (>94% similarity) to existing Arctic sequences or belonged to novel OTUs. Only 8 OTUs matched sequences from elsewhere. The arctic *pufM* genes were also different from those in Antarctic sea-ice and coastal seawater (Koh *et al.*, 2011). Consistent with previous findings (Cottrell et Kirchman 2009), this suggests that most OTUs found in this study might be restricted to the Beaufort Sea, which seems to constitute a microbial province favoring endemism (Lovejoy *et al.* 2007).

The most striking observation from our data set is the widespread distribution of a AAP betaproteobacterial clade (OTU 6) in the entire shelf. *Betaproteobacteria* are usually low in abundance in the open ocean and the few betaproteobacterial sequences that have been retrieved from the marine environment are from coastal environments (Rappé *et al.* 2000, Riemann *et al.* 2008). In contrast, they represent a consistently large fraction of the bacterioplankton in freshwater lakes and diverse river types (Glöckner *et al.* 2000, Zwart *et al.* 2002) including the Mackenzie River where they are abundant (Garneau *et al.* 2006, Galand *et al.* 2008a). Since the Arctic Ocean receives about 10% of global riverine discharge (Aagaard et Carmack 1989), the stratified surface waters of the Arctic Ocean share many characteristics of an estuary where *Betaproteobacteria* form less than a few of the total prokaryotic community (Galand *et al.* 2010, Kirchman *et al.* 2010). Most betaproteobacterial OTUs recovered in this study were new (< 94% similarity to existing sequences) and do not group with the *Rhodoferrax*, *Roseateles*, and *Rubrivivax pufM* clusters often identified in other estuarine and freshwater systems (Waidner et Kirchman 2008, Salka *et al.* 2011). They

formed several clusters divergent from the phylogroup I (Yutin *et al.* 2007) that include arctic sequences (Cottrell et Kirchman 2009) and single amplified genome (SAG) sequences from temperate freshwater lakes (Martinez-Garcia *et al.* 2012). Interestingly, the 16S rRNA sequences from the latter *pufM*-containing SAGs were primarily related to the betaproteobacterial *Polynucleobacter* cluster that are common in the Mackenzie river (Galand *et al.* 2008a). Since horizontal gene transfer of the photosynthetic gene cluster is possible (Igarashi *et al.*, 2001), phylogenetic data need to be interpreted with caution especially in groups with only a few species with known *pufM* and 16S sequences.

Our data clearly indicate that betaproteobacterial AAP bacteria exhibited a strong river to ocean gradient, suggesting that these bacteria grew in the Mackenzie River and then were mixed with Beaufort coastal waters. The distribution of OTU 6 in the Beaufort Sea was consistent with satellite observations of the offshore extension of Mackenzie turbid waters over the continental shelf (Doxaran *et al.*, 2012). However, the presence of OTU 6 in Bering and Beaufort coastal waters contrasted with that of other betaproteobacterial OTUs found only near the mouth of the Mackenzie River. Since mortality of freshwater bacteria can be an important process in estuaries (Painchaud *et al.* 1995), one explanation is that OTU 6 members have a broader salinity tolerance than other AAP betaproteobacteria. The presence of partial *pufM* sequences identical to that of OTU 6 in marine waters of Monterey Bay (Béjà *et al.* 2002) supports this hypothesis. Further studies are required to estimate their contribution in other marine Arctic regions and to identify parameters that control their distribution.

Previous studies showed that some *Betaproteobacteria* are still active in marine waters (Cottrell et Kirchman 2004), including in the Arctic (Alonso-Sáez *et al.* 2008). Here, we showed that the OTU 6 *pufM* gene was actively transcribed in saline waters during the arctic summer, which is surprising because BChl *a* synthesis is partly or totally inhibited by light in

AAP bacteria currently in culture (Yurkov et van Gemerden 1993, Tomasch *et al.* 2011). Our data suggest that BChl *a* synthesis in OTU 6 members is not fully repressed by light, like in *Dinoroseobacter shibae* and *Roseateles depolymerans* (Suyama *et al.* 2002, Tomasch *et al.* 2011). In most AAP bacteria isolated so far, photoheterotrophy generates additional metabolic energy enhancing AAP bacterial growth under light (Koblížek *et al.* 2003, Cooney *et al.* 2006). Considering the variety of sharp environmental gradients encountered by OTU 6 members in the transition zone between freshwater and marine waters, it is likely that, when light is sufficient, photoheterotrophy may have different physiological roles in warm, organic matter-rich freshwater and in cold, saline oligotrophic waters. The nature of their physiological adaptation and metabolic versatility needs to be elucidated to understand the selective advantage that photoheterotrophy provides them.

To our knowledge, AAP strains have not previously been isolated from the Arctic Ocean. In this study, the isolates provided a valuable set of data that allowed the taxonomic identification of two predominant *pufM* phylotypes. We successfully isolated *pufM*-containing bacteria, but only from surface waters, consistent with the phototrophic character of AAP bacteria. Our arctic isolates were restricted to different species of the genera *Sulfitobacter* and *Loktanella*. Although these species were cultivated from temperate to polar regions (Labrenz *et al.* 2000, Van Trappen *et al.* 2004, Salka *et al.* 2008), the strains isolated in this study were most similar to microorganisms residing in polar waters. Among them, the *Sulfitobacter* strains clustering into OTU 5 were absent outside the Beaufort Sea, suggesting that they potentially represent typical arctic members. *Sulfitobacter* and *Loktanella* species are often found in surface waters and numerous interactions with phytoplankton have been reported (Moran *et al.* 2007). These metabolically versatile bacteria can satisfy a significant part of their carbon and sulfur demands by assimilating DMSP released during the decay of phytoplankton blooms (González *et al.* 1999, Mou *et al.* 2005). The Beaufort Sea waters

sampled during this study exhibited post-bloom characteristics, with low levels of Chl *a* in the surface layer. Since surface waters of the Beaufort Sea are oligotrophic in summer, the capacity to derive energy from light and reduced sulfur compounds would give a physiological advantage for competing in this extreme environment. The influence of light and starvation on BChl *a* and biomass formation has been studied in AAP bacteria such as *Sulfitobacter* and *Loktanella* that contain low amounts of BChl *a* (Biebl et Wagner-Döbler 2006). Since this type of AAP bacteria seems to use phototrophy genes only under simultaneous illumination and extreme shortage of organic nutrients, their distribution in arctic waters may be linked to their photoheterotrophic mode of metabolism.

AAP diversity was highest at the shelf and offshore DCM layers of the Beaufort Sea where Pacific Summer Water mixes with the BNL. *Methylobacterium*- and *Sphingomonas*-like bacteria, mostly absent in surface waters, were common at these depths along the Mackenzie plume. Although a few species of both genera have been isolated from seawater (Vancanneyt *et al.* 2001, Wang *et al.* 2007), these bacteria have a widespread distribution in diverse terrestrial habitats including soil, freshwater, and lake sediments (White *et al.* 1996, Green 2006). Our data suggest that *Methylobacterium*- and *Sphingomonas*-like bacteria share the same habitat, more likely associated with soluble humic material in river water (Kirk 2011). In line with this hypothesis, these bacteria were found to actively participate in humic matter degradation (Balkwill *et al.* 2006, Hutalle-Schmelzer *et al.* 2010). Two groups of *Bradyrhizobiaceae*-related sequences were detected mostly in DCM samples of the Beaufort Sea shelf. One group was loosely associated to the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* that is widely distributed in nature including coastal marine sediments (Oda *et al.* 2003). The other grouped with strictly aerobic anoxygenic phototrophic *Bradyrhizobium* strains that form nitrogen-fixing nodules on stems and/or roots of many legumes (Giraud et Fleischman 2004). Like *Methylobacterium* and *Sphingomonas*

clusters, these clades were mostly recovered in the deep layers of the Mackenzie plume, suggesting that they were also entrained by the river sediment load. However, their distribution was similar to that of *Citromicrobium*-like clades that are typical marine bacteria (Yurkov *et al.* 1999, Jeanthon *et al.* 2011). Furthermore, we also retrieved them from North Pacific Ocean surface waters, supporting earlier reports of *Bradyrhizobiaceae* in the North Pacific Ocean gyre and the Bering Sea where terrestrial inputs are unlikely (Hu *et al.* 2006). It is therefore tempting to speculate that arctic *Bradyrhizobiaceae*-related *pufM* sequences are marine photosynthetic bacteria possibly transported in Pacific waters.

Conclusion

Our transect analysis in the coastal arctic ecosystem of the Mackenzie River and Beaufort Sea shelf revealed strong spatial gradients in environmental properties and in the abundance and composition of AAP bacterial communities. We showed that AAP bacteria represent a significant fraction of the total prokaryotic community in the arctic coastal environments impacted by riverine inputs. Our results highlight that OTU 6 members are an important and widely distributed but largely unknown component of AAP bacterial communities. However, we do not know the impact of phototrophic light harvesting on energy requirements and carbon metabolism of these bacteria. Future studies are needed to explore their role in biogeochemical cycling in coastal ecosystems.

Acknowledgements

This study was conducted as part of the Malina Scientific Program funded by ANR (Agence Nationale de la Recherche), INSU-CNRS (Institut National des Sciences de l'Univers – Centre National de la Recherche Scientifique), CNES (Centre National d'Etudes Spatiales)

and ESA (European Space Agency). We thank all participants to the MALINA cruises for their help, especially M. Babin who coordinated the project, K. Lévesque for the logistics, and all *CCGS Amundsen* crew members. We warmly thank D. Doxaran, P. Raimbault, N. Garcia, and J. Ras for providing ancillary data. We are grateful to M. Koblížek for help with detection of AAP bacterial colonies using the infrared system available in his laboratory, M. Perennou and G. Tanguy (Biogenouest Sequencing Platform-FR2424-Station Biologique) for help with sequencing. This work was supported by the European Union programs MicroB3 (UE-contract-287589) and MaCuMBA (FP7-KBBE-2012-6-311975). D. Boeuf was supported by a grant from the French Ministry of Higher Education and Research. D. L. Kirchman and M. T. Cottrell were supported by NSF grant OCE 1030306.

References

- Aagaard K & Carmack EC (1989) The Role of Sea Ice and Other Fresh Water in the Arctic Circulation. *J Geophys Res* **94**: 14485-14498.
- Alonso-Sáez L, Sánchez O, Gasol JM, Balagué V & Pedrós-Alio C (2008) Winter-to-summer changes in the composition and single-cell activity of near-surface Arctic prokaryotes. *Environ Microbiol* **10**: 2444-2454.
- Atamna-Ismaeel N, Finkel O, Glaser F, von Mering C, Vorholt JA, Koblížek M, Belkin S & Béjà O (2012) Bacterial anoxygenic photosynthesis on plant leaf surfaces. *Environ Microbiol Rep* **4**: 209–216.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Balkwill DL, Fredrickson JK & Romine MF (2006) *Sphingomonas* and related genera. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Vol. 7 (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackebrandt E, eds.), pp. 605-629. Springer, New York.
- Béjà O, Suzuki MT, Heidelberg JF, Nelson WC, Preston CM, Hamada T, Eisen JA, Fraser CM & DeLong EF (2002) Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* **415**: 630-633.

- Biebl H & Wagner-Döbler I (2006) Growth and bacteriochlorophyll *a* formation in taxonomically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in chemostat culture: influence of light regimen and starvation. *Process Biochem* **41**: 2153-2159.
- Campbell BJ, Waidner LA, Cottrell MT & Kirchman DL (2008) Abundant proteorhodopsin genes in the North Atlantic Ocean. *Environ Microbiol* **10**: 99-109.
- Carmack EC, Macdonald RW & Jasper S (2004) Phytoplankton productivity on the Canadian Shelf of the Beaufort Sea. *Mar Ecol Prog Ser* **277**: 37-50.
- Chao A, Chazdon RL, Colwell RK & Shen TJ (2005) A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol Lett* **8**: 148-159.
- Cho JC & Giovannoni SJ (2004) Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 432-440.
- Cooney MJ, Johnston WA, Pohl S & Bidigare RR (2006) Influence of photoperiod on pigmentation and metabolic efficiency of the marine aerobic anoxygenic photosynthetic bacterium *Erythrobacter longus* Strain NJ 3 Y. *Aquat Microb Ecol* **43**: 303-309.
- Cottrell MT & Kirchman DL (2004) Single-cell analysis of bacterial growth, cell size, and community structure in the Delaware estuary. *Aquat Microb Ecol* **34**: 139-149.
- Cottrell MT & Kirchman DL (2009) Photoheterotrophic microbes in the Arctic Ocean in summer and winter. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4958-4966.
- Cottrell MT, Mannino A & Kirchman DL (2006) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mid-Atlantic Bight and the North Pacific Gyre. *Appl Environ Microbiol* **72**: 557-564.
- Cottrell MT, Ras J & Kirchman DL (2010) Bacteriochlorophyll and community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in a particle-rich estuary. *ISME J* **4**: 945-954.
- Csotonyi JT, Swiderski J, Stackebrandt E & Yurkov V (2010) A new environment for aerobic anoxygenic phototrophic bacteria: biological soil crusts. *Environ Microbiol Rep* **2**: 651-656.
- Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26**: 297-302.
- Doxaran D, Ehn J, Bélanger S, Matsuoka A, Hooker S & Babin M (2012) Optical characterisation of suspended particles in the Mackenzie River plume (Canadian Arctic Ocean) and implications for ocean colour remote sensing. *Biogeosciences* **9**: 3213-3229.
- Galand PE, Lovejoy C & Vincent WF (2006) Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *Aquat Microb Ecol* **44**: 115-126.
- Galand PE, Lovejoy C, Pouliot J, Garneau ME & Vincent WF (2008) Microbial community diversity and heterotrophic production in a coastal Arctic ecosystem: A stamukhi lake and its source waters. *Limnol Oceanogr* **53**: 813-823.
- Galand PE, Potvin M, Casamayor EO & Lovejoy C (2009) Hydrography shapes bacterial biogeography of the deep Arctic Ocean. *ISME J* **4**: 564-576.

- Garneau ME, Vincent WF, Alonso-Sáez L, Gratton Y & Lovejoy C (2006) Prokaryotic community structure and heterotrophic production in a river-influenced coastal arctic ecosystem. *Aquat Microb Ecol* **42**: 27-40.
- Garneau ME, Vincent WF, Terrado R & Lovejoy C (2009) Importance of particle-associated bacterial heterotrophy in a coastal Arctic ecosystem. *J Mar Syst* **75**: 185-197.
- Giraud E & Fleischman D (2004) Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynthesis Res* **82**: 115-130.
- Glöckner FO, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A & Amann R (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5053-5065.
- González JM, Kiene RP & Moran MA (1999) Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the α -subclass of the class *Proteobacteria*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3810-3819.
- Green PN (2006) *Methylobacterium*. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Vol. 5 (Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H & Stackebrandt E, eds.), pp. 257-265. Springer, New York.
- Hu Y, Du H, Jiao N & Zeng Y (2006) Abundant presence of the γ -like Proteobacterial *pufM* gene in oxic seawater. *FEMS Microbiol Lett* **263**: 200-206.
- Hutalle-Schmelzer KML, Zwirnmann E, Krüger A & Grossart HP (2010) Enrichment and cultivation of pelagic bacteria from a humic lake using phenol and humic matter additions. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 58-73.
- Igarashi N, Harada J, Nagashima S, Matsuura K, Shimada K & Nagashima KV (2001) Horizontal transfer of the photosynthesis gene cluster and operon rearrangement in purple bacteria. *J Mol Evol* **52**: 333-341.
- Jeanthon C, Boeuf D, Dahan O, Le Gall F, Garczarek L, Bendif EM & Lehours AC (2011) Diversity of cultivated and metabolically active aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **8**: 1955-1970.
- Jiao N, Zhang Y, Zeng Y, Hong N, Liu R, Chen F & Wang P (2007) Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean. *Environ Microbiol* **9**: 3091-3099.
- Katoh K, Asimenos G & Toh H (2009) Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol Biol* **537**: 39-64.
- Kirchman DL, Cottrell MT & Lovejoy C (2010) The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Environ Microbiol* **12**: 1132-1143.
- Kirk JTO (2011) *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge Univ Pr, New York.

- Koblížek M, Bějá O, Bidigare RR, Christensen S, Benitez-Nelson B, Vetriani C, Kolber MK, Falkowski PG & Kolber ZS (2003) Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean. *Arch Microbiol* **180**: 327-338.
- Koblížek M, Mašín M, Ras J, Poulton AJ & Prášil O (2007) Rapid growth rates of aerobic anoxygenic phototrophs in the ocean. *Environ Microbiol* **9**: 2401-2406.
- Koh EY, Phua W & Ryan KG (2011) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in Antarctic sea ice and seawater. *Environ Microbiol Rep* **3**: 710-716.
- Labrenz M, Tindall B, Lawson PA, Collins MD, Schumann P & Hirsch P (2000) *Staleyella guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., alpha-3-Proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 303-313.
- Lami R, Cottrell MT, Ras J, Ulloa O, Obernosterer I, Claustre H, Kirchman DL & Lebaron P (2007) High abundances of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in the South Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4198.
- Lamy D, Jeanthon C, Cottrell MT *et al.* (2011) Ecology of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **8**: 973-985.
- Lehours AC, Cottrell MT, Dahan O, Kirchman DL & Jeanthon C (2010) Summer distribution and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mediterranean Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiol Ecol* **74**: 397-409.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L & Meier H (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363-1371.
- Lovejoy C, Vincent WF, Bonilla S, Roy S, Martineau MJ, Terrado R, Potvin M, Massana R & Pedrós-Alió C (2007) Distribution, phylogeny, and growth of cold-adapted picoprasinophytes in Arctic Seas. *J Phycol* **43**: 78-89.
- Marie D, Shi XL, Rigaut-Jalabert F & Vaultot D (2010) Use of flow cytometric sorting to better assess the diversity of small photosynthetic eukaryotes in the English Channel. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 165-178.
- Martinez-Garcia M, Swan BK, Poulton NJ, Gomez ML, Masland D, Sieracki ME & Stepanauskas R (2012) High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton. *ISME J* **6**: 113-123.
- Mašín M, Zdun A, Ston-Egiert J, Nausch M, Labrenz M, Moulisova V & Koblížek M (2006) Seasonal changes and diversity of aerobic anoxygenic phototrophs in the Baltic Sea. *Aquat Microb Ecol* **45**: 247-254.
- Moran MA, Belas R, Schell MA *et al.* (2007) Ecological genomics of marine Roseobacters. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4559-4569.

- Mou X, Moran MA, Stepanauskas R, González JM & Hodson RE (2005) Flow-cytometric cell sorting and subsequent molecular analyses for culture-independent identification of bacterioplankton involved in dimethylsulfoniopropionate transformations. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1405-1416.
- Mullins TD, Britschgi TB, Krest RL & Giovannoni SJ (1995) Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol Oceanogr* **40**: 148-158.
- Oda Y, Star B, Huisman LA, Gottschal JC & Forney LJ (2003) Biogeography of the purple nonsulfur bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5186-5191.
- Opsahl S, Benner R & Amon RMW (1999) Major flux of terrigenous dissolved organic matter through the Arctic Ocean. *Limnol Oceanogr* **44**: 2017-2023.
- Page KA, Connon SA & Giovannoni SJ (2004) Representative freshwater bacterioplankton isolated from Crater Lake, Oregon. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6542-6550.
- Painchaud J, Therriault J & Legendre L (1995) Assessment of salinity-related mortality of freshwater bacteria in the Saint Lawrence estuary. *Appl Environ Microbiol* **61**: 205-208.
- Rappé MS, Vergin K & Giovannoni SJ (2000) Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. *FEMS Microbiol Ecol* **33**: 219-232.
- Riemann L, Leitet C, Pommier T, Simu K, Holmfeldt K, Larsson U & Hagström Å (2008) The native bacterioplankton community in the central Baltic Sea is influenced by freshwater bacterial species. *Appl Environ Microbiol* **74**: 503-515.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.
- Salka I, Moulisova V, Koblizek M, Jost G, Jurgens K & Labrenz M (2008) Abundance, depth distribution, and composition of aerobic bacteriochlorophyll *a*-producing bacteria in four basins of the central Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4398-4404.
- Salka I, Čuperová Z, Mašín M, Koblížek M & Grossart HP (2011) *Rhodofera*-related *pufM* gene cluster dominates the aerobic anoxygenic phototrophic communities in German freshwater lakes. *Environ Microbiol* **13**: 2865-2875.
- Schlitzer R (2010) Ocean Data View, <http://odv.awi.de>.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T *et al.* (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7537-7541.
- Schwalbach MS & Fuhrman JA (2005) Wide-ranging abundances of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence microscopy and quantitative PCR. *Limnol Oceanogr* **50**: 620-628.

- Shannon CE, Weaver W, Blahut RE & Hajek B (1949) *The mathematical theory of communication*. University of Illinois press Urbana.
- Shiba T, Simidu U & Taga N (1979) Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *Appl Environ Microbiol* **38**: 43-45.
- Sieracki ME, Gilg IC, Thier EC, Poulton NJ & Goericke R (2006) Distribution of planktonic aerobic anoxygenic photoheterotrophic bacteria in the northwest Atlantic. *Limnol Oceanogr* **51**: 38-46.
- Sundby B, Gobeil C, Silverberg N & Mucci A (1992) The phosphorus cycle in coastal marine sediments. *Limnol Oceanogr* **37**: 1129-1145.
- Suyama T, Shigematsu T, Suzuki T, Tokiwa Y, Kanagawa T, Nagashima KVP & Hanada S (2002) Photosynthetic apparatus in *Roseateles depolymerans* 61A is transcriptionally induced by carbon limitation. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1665-1673.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.
- Tomasch J, Gohl R, Bunk B, Diez MS & Wagner-Döbler I (2011) Transcriptional response of the photoheterotrophic marine bacterium *Dinoroseobacter shibae* to changing light regimes. *ISME J* **5**: 1957-1968.
- Vallières C, Retamal L, Ramlal P, Osburn CL & Vincent WF (2008) Bacterial production and microbial food web structure in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *J Mar Syst* **74**: 756-773.
- Vancanneyt M, Schut F, Snauwaert C, Goris J, Swings J & Gottschal JC (2001) *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 73-79.
- Van Trappen S, Mergaert J & Swings J (2004) *Loktanella salsilacus* gen. nov., sp. nov., *Loktanella fryxellensis* sp. nov. and *Loktanella vestfoldensis* sp. nov., new members of the Rhodobacter group, isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1263-1269.
- Waidner LA & Kirchman DL (2005) Aerobic anoxygenic photosynthesis genes and operons in uncultured bacteria in the Delaware River. *Environ Microbiol* **7**: 1896-1908.
- Waidner LA & Kirchman DL (2007) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria attached to particles in turbid waters of the Delaware and Chesapeake estuaries. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3936-3944.
- Waidner LA & Kirchman DL (2008) Diversity and distribution of ecotypes of the aerobic anoxygenic phototrophy gene, *pufM*, in the Delaware estuary. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4012-4021.
- Wang X, Sahr F, Xue T & Sun B (2007) *Methylobacterium salsuginis* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 1699-1703.
- White DC, Sutton SD & Ringelberg DB (1996) The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 301-306.

- Yurkov VV & Beatty JT (1998) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 695-724.
- Yurkov VV & van Gemerden H (1993) Impact of light/dark regimen on growth rate, biomass formation and bacteriochlorophyll synthesis in *Erythromicrobium hydrolyticum*. *Arch Microbiol* **159**: 84-89.
- Yurkov VV, Krieger S, Stackebrandt E & Beatty JT (1999) *Citromicrobium bathyomarinum*, a novel aerobic bacterium isolated from deep-sea hydrothermal vent plume waters that contains photosynthetic pigment-protein complexes. *J Bacteriol* **181**: 4517-4525.
- Yutin N, Suzuki MT, Teeling H, Weber M, Venter JC, Rusch DB & Béjà O (2007) Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling expedition metagenomes. *Environ Microbiol* **9**: 1464-1475.
- Zwart G, Crump BC, Kamst-van Agterveld MP, Hagen F & Han SK (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* **28**: 141-155.

Supplementary Informations

Table S1. Summary of environmental parameters of water masses delineated during the MALINA cruise. For each, the median and range are reported.

Parameters ^a	Water samples categories			
	River plume surface	Shelf surface	Offshore surface	Other depths
n =	5	29	17	60
Max depth sampled (m)	surface	50	50	151
Temperature (°C)	8.8 (7.99 ; 10.32)	1.03 (-0.87 ; 5.02)	-0.58 (-1.04 ; 1.13)	-1.21 (-1.43 ; -0.93)
Salinity (psu)	14.77 (0.15 ; 19.17)	30.17 (21.98 ; 32.2)	28.02 (22.09 ; 30.2)	31.92 (30.3 ; 33.65)
O₂ (mg.l⁻¹)	8.07 (7.34 ; 10.48)	8.74 (6.94 ; 10.21)	8.89 (7.98 ; 9.22)	7.68 (6.18 ; 9.35)
pH	8.04 (8.04 ; 8.32)	8.1 (7.91 ; 8.34)	8.11 (8.03 ; 8.15)	8.02 (7.84 ; 8.17)
SiOH₄ (μM)	30.27 (3.52 ; 64.53)	3.92 (3.12 ; 27.9)	3.27 (2.89 ; 7.82)	17.95 (3.38 ; 37.19)
cDOM (V.m⁻¹)	0.12 (0.09 ; 0.15)	0.09 (0.08 ; 0.14)	0.08 (0.07 ; 0.13)	0.1 (0.08 ; 0.12)
NO₃ (μM)^b	0.7 (0 ; 3.62)	0.02 (0 ; 6.49)	0.01 (0 ; 0.02)	6.15 (0 ; 15.65)
NO₂ (μM)^b	0.01 (0 ; 0.07)	0.01 (0 ; 0.12)	0 (0 ; 0.03)	0.05 (0 ; 0.15)
NH₄ (μM)^b	0.2 (0.07 ; 0.64)	0.02 (0 ; 0.43)	0 (0 ; 0.08)	0.02 (0 ; 0.43)
PO₄ (μM)	0.06 (0 ; 0.21)	0.6 (0.31 ; 1.36)	0.58 (0.33 ; 0.72)	1.24 (0.62 ; 2.97)
TOC (μM)	313.7 (199 ; 462.5)	79.01 (66.15 ; 135)	65.45 (60.62 ; 112)	64.09 (52.55 ; 101)
POC (μM)	16.15 (12.49 ; 52)	7.91 (0 ; 41.16)	2.18 (0.92 ; 5.61)	3.15 (0.39 ; 43.2)
DOC (μM)	295.8 (183 ; 454.6)	68.65 (58.34 ; 107)	62.34 (57.8 ; 108.4)	60 (43.19 ; 83.2)
TON (μM)	17.36 (12.65 ; 29.7)	6.75 (5.11 ; 13.87)	5.85 (4.52 ; 16.27)	7.28 (3.21 ; 15.02)
PON (μM)	3.42 (1.71 ; 15.84)	0.83 (0 ; 3.14)	0.28 (0.17 ; 0.77)	0.36 (0.14 ; 2.65)
DON (μM)	13.69 (10.94 ; 26.7)	5.91 (4.43 ; 11.22)	5.57 (4.34 ; 15.83)	6.76 (3.02 ; 14.68)
TOP (μM)	0.88 (0.23 ; 2.82)	0.24 (0.11 ; 0.66)	0.21 (0.12 ; 0.59)	0.2 (0.02 ; 0.78)
POP (μM)	0.56 (0.13 ; 4.96)	0.06 (0 ; 0.24)	0.02 (0.01 ; 0.06)	0.02 (0.01 ; 0.24)
DOP (μM)	0.22 (0.1 ; 1.99)	0.17 (0.09 ; 0.53)	0.19 (0.11 ; 0.56)	0.17 (0 ; 0.76)
Total Chl <i>a</i> (μg.l⁻¹)	2.3 (0.18 ; 4.53)	0.16 (0.02 ; 3.23)	0.05 (0.01 ; 0.1)	0.17 (0.01 ; 6.43)
Prokaryotes (cells.ml⁻¹)	2.56 10⁵ (8.7 10 ⁴ ; 1.2 10 ⁶)	2.85 10⁵ (6.3 10 ⁴ ; 1.0 10 ⁶)	2.78 10⁵ (1.4 10 ⁵ ; 6.5 10 ⁵)	1.99 10⁵ (3.7 10 ⁴ ; 9.7 10 ⁵)
AAP bacteria (cells.ml⁻¹)	1.60 10⁴ (1.2 10 ⁴ ; 2.3 10 ⁴)	1.02 10³ (0 ; 8.6 10 ³)	1.51 10² (0 ; 2.2 10 ³)	2.33 10² (0 ; 3.6 10 ⁴)
AAP bacteria (%)	6.31 (1.96 ; 14.23)	0.23 (0 ; 1.53)	0.07 (0 ; 0.52)	0.16 (0 ; 9.71)

^a Ancillary data of temperature, salinity, pH, dissolved oxygen, colored dissolved organic matter, inorganic and organic nutrients, and chlorophyll *a* were provide by D. Doxaran, P. Raimbault, N. Garcia and J. Ras.

^b The detection limit is 3 nM for nitrate and nitrite and 5 nM for ammonium.

Table S2. Summary of primers used in this study

Experiment	Gene	Group	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Annealing temp (°C)	Amplicon length (bp)	Reference
t-RFLP	16S rDNA	Bacteria	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	55	1465	(Lane 1991)
			1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT			(Weisburg <i>et al.</i> 1991)
PCR	16S rDNA	Bacteria	8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55	1465	(Edwards <i>et al.</i> 1989)
			1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT			(Weisburg <i>et al.</i> 1991)
PCR / TTGE	<i>pufM</i>	AAPB	PufMF	TACGGSAACTGTWCTAC	58	245	(Béjà <i>et al.</i> 2002)
			Puf-WAW	AYNGCRAACCACCANGCCCA			(Achenbach <i>et al.</i> 2001)
qPCR	16S rDNA	Bacteria	BACT1369F	CGGTGAATACGTTTCYCGG	56	142	(Suzuki <i>et al.</i> 2000)
			PROK1492R	GGWTACCTTGTTACGACTT			(Suzuki <i>et al.</i> 2000)
qPCR	<i>pufM</i>	AAPB-	OTU6-f23	CCACGCACTATCCATTGT	60	146	This study
		OTU6	OTU6-r34	GGGCGGCGCGCTCGGAAG			This study

Table S3. Correlation of total and AAP bacterial abundances ($p < 0.05$) over the entire data set and along Mackenzie-influenced transects.

Variables	All samples ($n=110$)		All depths of transects 600 & 300 ($n=40$)	
	Prokaryotic cells	AAP proportions	Prokaryotic cells	AAP proportions
Temperature	0.24	0.46**	<i>ns</i> ^a	0.59**
Salinity	– 0.23	– 0.45**	<i>ns</i>	– 0.55**
O ₂	<i>ns</i>	– 0.20	<i>ns</i>	<i>ns</i>
cDOM	<i>ns</i>	0.28*	<i>ns</i>	0.32
PAR	0.2	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
TIC	– 0.24	<i>ns</i>	– 0.32	<i>ns</i>
HCO ₃	– 0.24	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
NO ₃	– 0.20	<i>ns</i>	– 0.31	<i>ns</i>
NO ₂	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
NH ₄	<i>ns</i>	0.48**	<i>ns</i>	0.47*
PO ₄	– 0.23	<i>ns</i>	– 0.35	<i>ns</i>
SiOH ₄	<i>ns</i>	0.35**	– 0.34	0.47*
POC	0.24	0.42**	<i>ns</i>	0.57**
PON	<i>ns</i>	0.74**	<i>ns</i>	0.80**
POP	<i>ns</i>	0.77**	<i>ns</i>	0.82**
DOC	<i>ns</i>	0.65**	<i>ns</i>	0.74**
DON	<i>ns</i>	0.59**	<i>ns</i>	0.74**
DOP	<i>ns</i>	0.62**	<i>ns</i>	0.68**
TOC	<i>ns</i>	0.66**	<i>ns</i>	0.73**
TON	0.22	0.63**	<i>ns</i>	0.74**
TOP	<i>ns</i>	0.70**	<i>ns</i>	0.76**
Total Chla	<i>ns</i>	0.43**	<i>ns</i>	0.78**

^a*ns*, not significant ; *, $p < 0.005$; **, $p < 0.001$

Table S4. Clone library comparison of seawater samples collected during the MALINA cruise in summer 2009.

Location	Station-depth	Nb. of clones	Nb. of OTUs ^a	Coverage (%)	S _{Chao1} (LCI-UCI) ^b	H _{Shannon} (LCI-UCI)
leg1b	PAC2 0m	18	7	83	8 (7-18)	1.67 (1.29-2.05)
	BER 0m	18	4	89	5 (4-17)	0.98 (0.6-1.35)
	ARC1 0m	32	2	100	2 (2-2)	0.48 (0.28-0.69)
leg2b	170 3m	26	4	92	4.5 (4-12)	0.59 (0.19-0.98)
	360 3m	28	7	89	8 (7-18)	1.26 (0.82-1.69)
	360 60m	27	8	96	8	1.94 (1.71-2.17)
Beaufort Sea	620 3m	25	3	100	3 (3-3)	1.05 (0.91-1.2)
	620 80m	35	10	83	25 (13-78)	1.84 (1.53-2.14)
	680 3m	27	3	100	3 (3-3)	0.81 (0.56-1.07)
leg2b	680 45m	35	11	86	13.5 (11-28)	1.85 (1.48-2.23)
	694 0m	23	6	78	16 (8-58)	0.87 (0.37-1.38)
	Mackenzie plume	697 0m	41	20	63	72.5 (34-213)
398 0m		30	5	90	6.5 (5-20)	0.67 (0.27-1.08)

^a Operational taxonomic units (OTUs) were defined with Mothur assuming a 94% sequence similarity level.

^b LCI and UCI are the lower and upper bound of 95% confidence interval of the Chao1 and Shannon indexes, respectively.

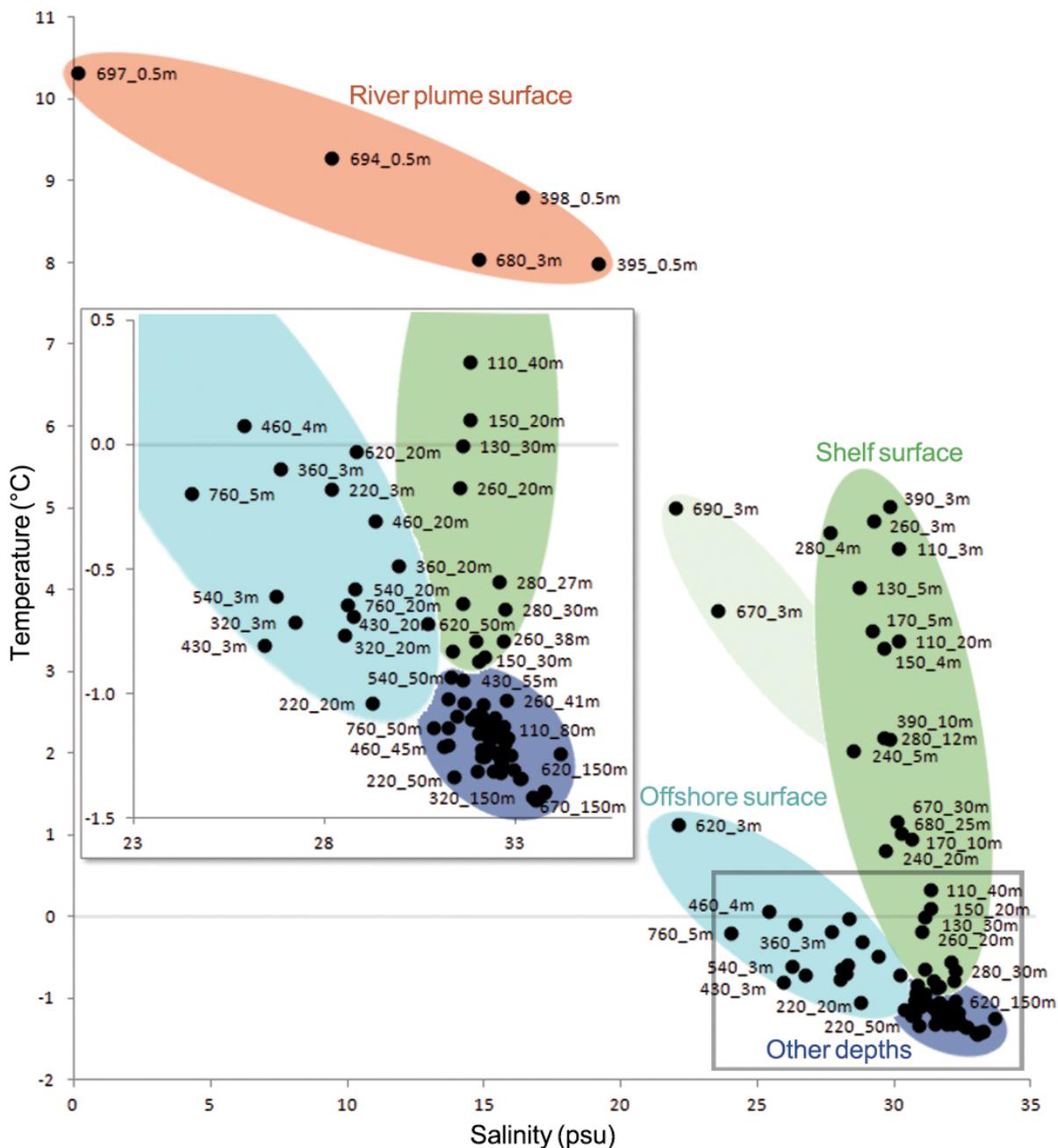


Fig. S1. Temperature-salinity diagram of the water masses observed in the Beaufort Sea during the MALINA cruise. Black dots correspond to water samples; numbers indicate the station and depth sampled.

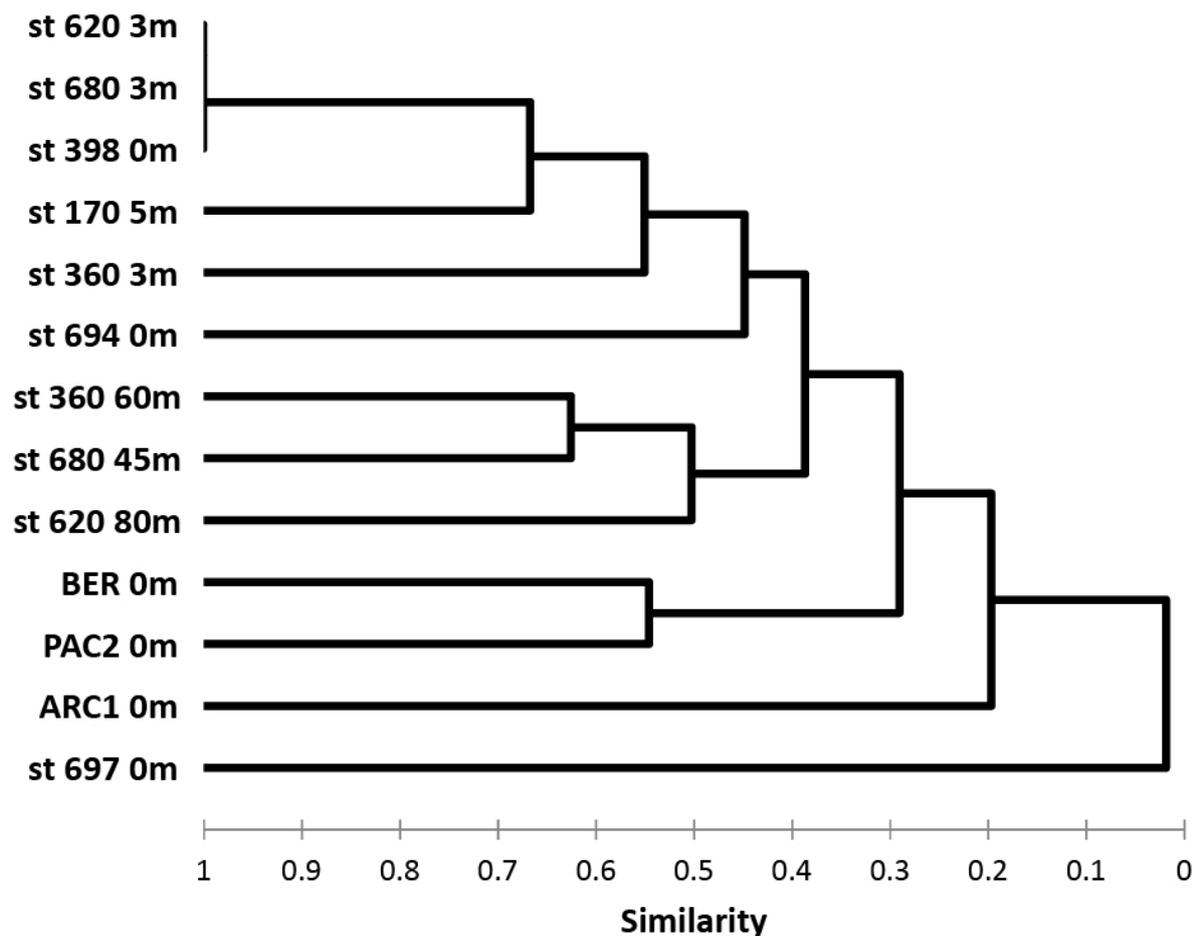


Fig. S2. Dendrogram representing the similarity between the phylogenetic composition of pufM clone libraries. Clustering is based on a distance matrix computed with Dice similarity from the abundance of OTUs in clone libraries defined by a 94% identity threshold between sequences. The dendrogram was inferred with the UPGMA algorithm.

5.3. Epilogue

5.3.1. Résultats complémentaires

Lors de cette étude, nous avons constaté certaines incohérences dans les résultats obtenus. La plus criante concerne la disparité entre la seule séquence appartenant aux *Loktanella* (OTU 29) obtenue dans les banques de clones et le nombre de souches isolées appartenant à ce genre. Par ailleurs, ce résultat n'était pas cohérent avec le nombre élevé de clones proches des *Loktanella* mis en évidence par Cottrell et Kirchman (2009). Les couples d'amorces utilisés diffèrent entre cette dernière étude et la nôtre, et s'il semble que le couple que nous avons utilisé permet d'avoir accès à une diversité plus élevée de BPAA, des mésappariements de l'amorce sens sur notamment les séquences de *Loktanella* ont été en revanche constatés. Par ailleurs, une autre incohérence est constatée entre la diversité obtenue par approche moléculaire et culturelle. La faible diversité culturelle obtenue malgré l'effort d'échantillonnage fourni pourrait être le reflet d'une sélection par le milieu de culture éventuellement par l'ajout de DMSP^{et/ou} d'une faiblesse dans les systèmes de détections de la BChl *a* utilisés ne parvenant pas à détecter les faibles concentrations de ce pigment. En effet, dans ces conditions particulières de culture (4°C, cycle lumineux avec une période courte d'obscurité) les souches de BPAA isolées présentaient peu de coloration et des colonies de petites tailles. Pour la grande majorité des souches, les signaux enregistrés par les systèmes optiques ou fluorimétriques de criblage étaient également faibles en comparaison de souches provenant d'autres environnements, traduisant probablement un faible contenu en BChl *a*. Il est probable que d'autres isolats présentaient un trop faible signal échappant à la détection par les systèmes de criblage utilisés.

Les groupes phylogénétiques précédemment retrouvés par Cottrell et Kirchman (2009) en mer des Tchouktches / mer de Beaufort Ouest ont tous été retrouvés dans notre étude. En revanche, la diversité que nous avons mis en évidence est plus vaste. Ceci est probablement dû aux gradients environnementaux échantillonnés, aux efforts d'échantillonnage et de séquençage plus importants et à la plus grande couverture du couple d'amorce utilisé. Cependant l'importance relative de ces groupes dans les banques de clones varie entre les deux études, de façon très importante pour celui des *Loktanella*. La répartition et le nombre d'OTU groupant avec des taxons typiquement dulçaquicoles (informations sup. dans le Tableau III) et liés potentiellement à la matière organique fluviale de surface et de la BNL

suggèrent que les processus intervenant dans le filtre marginal et la précipitation des particules (Figure 34, § 3.1.3) ont une importance centrale dans la biogéographie des BPAA en mer de Beaufort. Bien que les *Gammaproteobacteria* puissent constituer près d'un tiers de la diversité du bactérioplancton dans l'océan arctique Ouest (Kirchman *et al.* 2010), aucune BPAA appartenant aux *Gammaproteobacteria* n'a été retrouvée en mer de Beaufort (oligotrophe) passée 62°N, alors que ces dernières peuvent être dominantes dans d'autres systèmes oligotrophes dont le gyre Pacifique Nord (Hu *et al.* 2006, Lehours *et al.* 2010).

Tableau III. Affiliation phylogénétique et numéros d'accèsion des OTU retrouvées dans les bibliothèques *pufM* et caractéristiques générales de leurs plus proches parents dans GenBank obtenus par BLASTn.

OTU	Nb of clones	Clone ID	Accession number	Phylogenetic affiliation	Closest relative in GenBank	Identity (%)	Habitat of closest relative	Accession number
MALINA OTU01	68	002	JN248465	<i>α-Proteobacteria</i>	Unc. bact. env0m2	100	Monterey Bay	AY044245
MALINA OTU02	7	044	JN248466	<i>γ-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone-4	90.8	Paddy soil China	AB510453
MALINA OTU03	10	255	JN248467	<i>α-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone JL-ECSP6-8m85	100	China Sea	AY652827
MALINA OTU04	2	014	JN248468	<i>α-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone PUF_707_7_20	96.3	Chukchi Sea	FJ619031
MALINA OTU05	24	206	JN248469	<i>α-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone PROSOPE_49	88	Mediterranean Sea	GQ468979
MALINA OTU06	138	232	JN248477	<i>β-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone 20m11	100	Monterey Bay	AF393999
MALINA OTU07	11	481	JN248533	<i>β-Proteobacteria</i>	Unc. prok. clone 1-63	91.6	Chesapeake Bay	GU079576
MALINA OTU08	10	042	JN248473	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	91.3	<i>Fabaceae</i> nodule symbiont	CP000494
MALINA OTU09	9	061	JN248474	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM2831	96.6	Japanese unhulled rice	CP001001
MALINA OTU10	9	418	JN248475	<i>α-Proteobacteria</i>	Unc. marine bact. clone IO-0m-14	90.5	Indian Ocean	EU862431
MALINA OTU11	4	039	JN248476	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas ursincola</i> DSM 9006	100	Freshwater mat	AB031016
MALINA OTU12	6	069	JN248478	<i>α-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone PUF_108_8_2	99.5	Chukchi Sea	FJ618990
MALINA OTU13	1	101	JN248483	<i>β-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone CY6	90.5	Lake Chaohu China	FJ589103
MALINA OTU14	4	482	JN248485	<i>α-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone CY12	86.6	Lake Chaohu China	FJ589106
MALINA OTU15	1	134	JN248488	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	84	<i>Fabaceae</i> nodule symbiont	CP000494
MALINA OTU16	1	149	JN248489	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	85	Airborne contaminant	CP001510
MALINA OTU17	1	150	JN248490	<i>α-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone-7	86.3	Paddy soil China	AB510456
MALINA OTU18	3	473	JN248491	<i>α-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone-5	83.3	Paddy soil China	AB510454
MALINA OTU19	1	153	JN248492	<i>β-Proteobacteria</i>	Unc. proteobact. DelRiverFos06H03	84.4	Delaware River	AY912082
MALINA OTU20	5	483	JN248493	<i>β-Proteobacteria</i>	Unc. proteobact. DelRiverFos06H03	85.3	Delaware River	AY912082
MALINA OTU21	2	204	JN248494	<i>β-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone TY20	89	Lake Taihu China	FJ589093
MALINA OTU22	1	160	JN248496	<i>β-Proteobacteria</i>	Unc. bact. clone WHP213	92.4	Wuliangsuhai Lake China	GU458812

MALINA OTU23	1	165	JN248497	β -Proteobacteria	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	84.6	Airborne contaminant	CP001510
MALINA OTU24	1	189	JN248501	β -Proteobacteria	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	87	Airborne contaminant	CP001510
MALINA OTU25	1	191	JN248503	α -Proteobacteria	Unc. bact. clone CY12	91.4	Lake Chaohu China	FJ589106
MALINA OTU26	1	192	JN248504	β -Proteobacteria	Unc. bact. clone PROSOPE_49	84.8	Mediterranean Sea	GQ468979
MALINA OTU27	11	344	JN248508	α -Proteobacteria	Unc. bact. clone JL-ECSP6-8m66	92.1	China Sea	AY652823
MALINA OTU28	1	259	JN248509	α -Proteobacteria	Unc. bact. clone PROSOPE_48	98.7	Mediterranean Sea	GQ468978
MALINA OTU29	1	326	JN248513	α -Proteobacteria	Unc. bact. clone PUF_707_7_13	98.9	Chukchi Sea	FJ619024
MALINA OTU30	7	356	JN248514	γ -Proteobacteria	Unc. bact. clone PROSOPE_27	93.2	Mediterranean Sea	GQ468962
MALINA OTU31	1	337	JN248515	γ -Proteobacteria	Unc. bact. clone 2G12	98.3	Delaware Bay	EU191333
MALINA OTU32	5	343	JN248516	γ -Proteobacteria	Unc. bact. clone-3	90.4	Paddy soil China	AB510452
MALINA OTU33	1	408	JN248518	α -Proteobacteria	<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	99.6	Airborne contaminant	CP001510
MALINA OTU34	1	422	JN248520	Undetermined	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> strain S1	89.3	Mud	AY234384
MALINA OTU35	1	425	JN248521	β -Proteobacteria	Unc. prok. clone 12-6	83.8	Chesapeake Bay	GU079562
MALINA OTU36	1	452	JN248526	β -Proteobacteria	Unc. prok. clone 1-63	89.2	Chesapeake Bay	GU079576
MALINA OTU37	1	453	JN248527	α -Proteobacteria	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> strain S1	82.1	Mud	AY234384
MALINA OTU38	1	471	JN248529	β -Proteobacteria	Unc. proteobact. DelRiverFos06H03	89.7	Delaware River	AY912082
MALINA OTU39	7	488	JN248534	β -Proteobacteria	Unc. bact. clone PROSOPE_49	85.9	Mediterranean Sea	GQ468979
MALINA OTU40	1	485	JN248536	β -Proteobacteria	Unc. prok. clone 1-63	89.8	Chesapeake Bay	GU079576
MALINA OTU41	1	486	JN248537	β -Proteobacteria	Unc. prok. clone 1-63	92.3	Chesapeake Bay	GU079576
MALINA OTU42	1	490	JN248538	Undetermined	Unc. bact. clone-7	87.2	Paddy soil China	AB510456
MALINA OTU43	1	494	JN248539	α -Proteobacteria	Unc. bact. clone-17	87.4	Paddy soil China	AB510466

5.3.2. *Evolutions possibles dans un contexte de réchauffement global*

Les relations entre les abondances des populations de BPAA et les paramètres biotiques et abiotiques ont été analysées statistiquement. Il ressort que la communauté BPAA n'est pas corrélée aux mêmes paramètres que la communauté procaryotique totale suggérant que les BPAA ont une réponse spécifique et probablement différente vis-à-vis de la matière organique. Les fortes abondances dans les estuaires du Mackenzie sont en relation forte avec la matière organique (signal plus fort avec le particulaire), laissant présager une forte influence des apports fluviaux sur ces populations. Ceci pourrait être particulièrement favorable pour ce groupe dans un contexte d'augmentation des apports terrigènes par les fleuves à cause de la fonte du pergélisol et de l'augmentation de l'érosion. De surcroît, nous avons montré que des OTUs typiquement dulçaquicoles pouvaient persister et rester actives dans les eaux du large en dépit de leur forte dilution. L'extension suspectée de la couche d'eau supérieure saumâtre en réponse à l'augmentation de la quantité d'eaux douces déversées par les fleuves pourrait permettre l'extension de l'habitat des populations d'AAP halotolérantes. D'autre part, il est probable qu'au large les groupes de BPAA pratiquant le *feast and famine* soient favorisés dans le futur par (i) le réchauffement attendu des eaux arctiques de surface, (ii) la diminution de l'épaisseur et de l'étendue de la glace de mer ainsi que (iii) l'augmentation de la productivité et de l'occurrence des événements d'efflorescence du phytoplancton. Les tendances globales d'évolution laissent à penser que l'émission de CO₂ par le bactérioplancton va augmenter. De plus, de nombreuses populations de BPAA retrouvées dans notre étude pourraient avoir des métabolismes particuliers impliqués dans la biotransformation de composés pouvant avoir des impacts importants sur la régulation climatique comme les *Rhodobacterales* ou les *Rhizobiales* potentiellement impliquées dans la production de composés volatiles soufrés tel le DMS ou l'absorption de méthane.

CHAPITRE 6. Les B-PR dans l'océan arctique ouest.

6.1. Préambule

6.1.1. *Etat des connaissances en Arctique*

Plus encore que pour les BPAA, très peu est connu sur la diversité et l'écologie des B-PR en Arctique. Le travail pionnier de Cottrell et Kirchman (2009) a montré qu'elles y étaient présentes. Toutefois seuls 2 groupes ont été quantifiés, montrant de très faibles abondances relatives (<0,01% du bactérioplancton). De plus, la PR n'ayant été découverte qu'en 2000-2001, les références permettant une affiliation phylogénétique sur ce gène fonctionnel étaient dramatiquement lacunaires. Aussi, quasiment aucun des groupes de séquences codant pour l'opsine retrouvés dans cette étude n'ont pu être affiliés avec certitude (Figure 48). De plus, le nombre d'échantillons traités et la profondeur de séquençage étaient faibles et n'avaient pas permis la détermination de l'écologie des B-PR ni leur répartition dans l'environnement arctique. Les informations sur leur activité dans ce milieu particulier sont d'autre part également inexistantes.

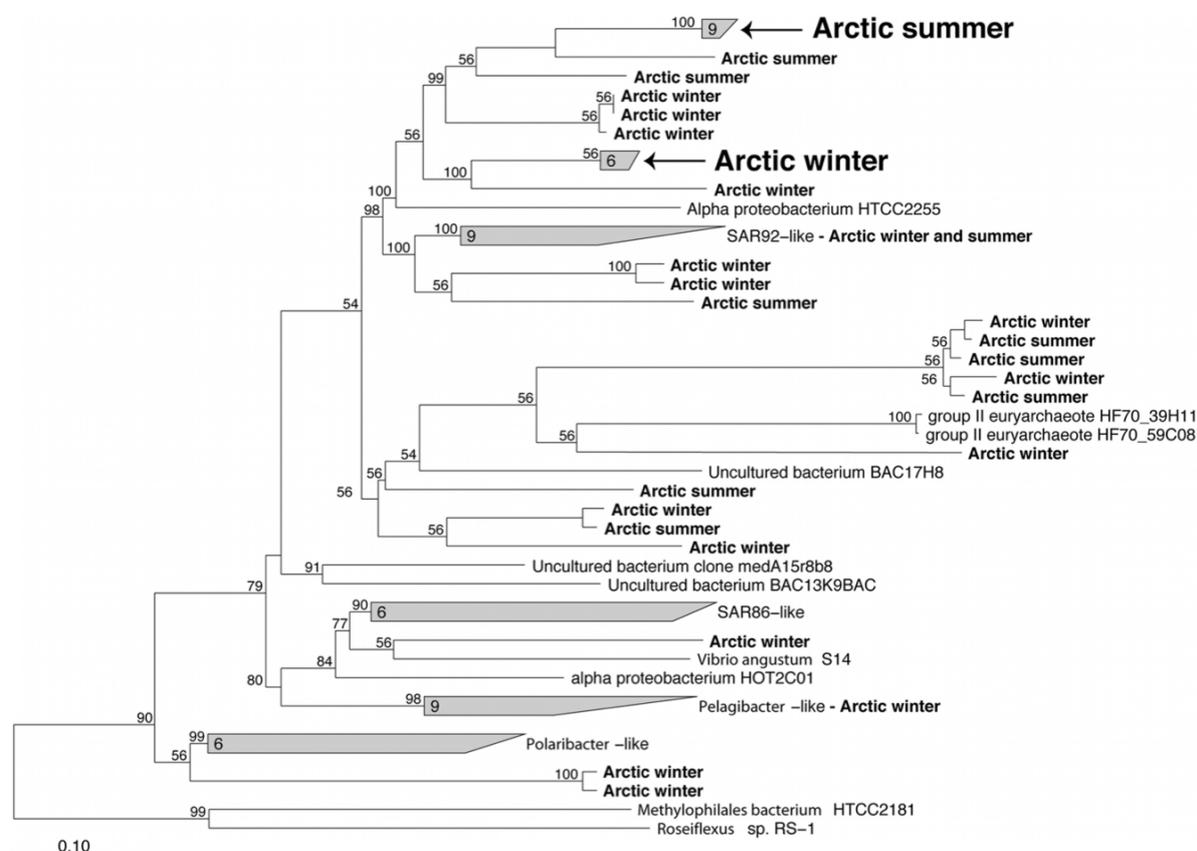


Figure 48. Arbre phylogénétique des séquences codant pour l'opsine de la PR d'été 2007 et hiver 2008 retrouvées par Cottrell et Kirchman (2009).

6.1.2. *Ambitions*

De manière analogue aux BPAA, le but de cette étude est de déterminer à fine échelle l'importance écologique et l'origine de la communauté estivale des bactéries à protéorhodopsine dans le plateau continental du Mackenzie afin de donner des pistes à leur future évolution dans un contexte de réchauffement global. Les questions que nous nous sommes adressées sont les suivantes :

- Les B-PR sont-elles présentes dans le système d'étude moins soumis à l'influence Pacifique ? Si oui, quelle est leur importance numérique ?

- Leur diversité est-elle similaire à celle trouvée par Cottrell et Kirchman 2 ans auparavant ? Quels sont les groupes dominants, sont-ils différents de ceux retrouvés ailleurs et sont-ils actifs ?

- A l'aide des données biotiques et abiotiques des autres participants de la campagne MALINA, peut-on déterminer si des facteurs contrôlent spécifiquement les B-PR, en particulier quels rôles ont la lumière et les sources de carbone ? Sont-elles soumises aux mêmes pressions que la communauté bactérienne totale ? Le corollaire étant est-ce-que la photohétérotrophie leur apporte un avantage dans cet environnement particulier ?

- Compte tenu de ces données, peut-on déterminer leur origine et prédire leur évolution dans un contexte d'augmentation de la lumière et du carbone terrigène du au réchauffement global ?

6.1.3. *Point technique*

L'abondance des B-PR ne pouvant être obtenue d'un point de vue global sans une évaluation préalable de la diversité présente, nous avons donc débuté ce travail par la construction de banques de clones sur les stations traitées lors de l'étude sur les BPAA afin de pouvoir comparer les 2 études et obtenir une vue cohérente de la communauté photohétérotrophe. Une portion du gène codant pour l'opsine (appelé par la suite PR) a été amplifiée en utilisant le couple d'amorces dessiné par Campbell *et al.* (2008) sur les données métagénomiques du GOS. En parallèle, pour les stations correspondantes, les ARN totaux ont été extraits et purifiés de toute trace d'ADN avant que les ARNm de PR soient rétrotranscrits, amplifiés et clonés. Dans les 2 cas, un nombre suffisant de clones a été séquencé pour obtenir une couverture de banque proche ou supérieure à 80 % de la diversité estimée. Les polypeptides codés par les séquences ADN et ADNc obtenues ont été alignés en utilisant un algorithme tenant compte de leur structure tertiaire en particulier les hélices- α (MAFFT E-

INS-I). Le pourcentage d'homologie définissant l'OTU pour la protéine PR (Figure 49) a été déterminé en utilisant 22 souches B-PR (appartenant aux *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Flavobacteria* et *Flexibacteraceae*) présentant à la fois une séquence entière de 16S ARNr et de PR disponibles sur GenBank en 2010. La matrice d'homologie des estimations de la divergence d'évolution entre les

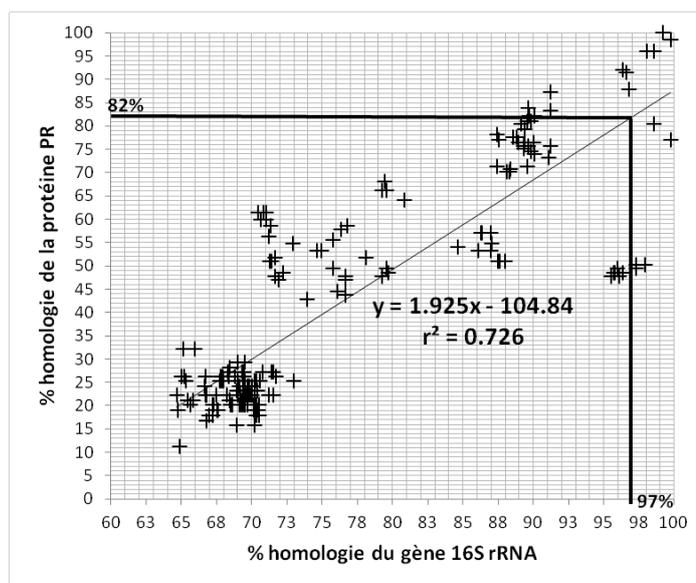


Figure 49. Détermination du pourcentage d'homologie définissant l'OTU pour la protéine PR.

séquences protéiques et nucléiques a été calculée pour la protéorhodopsine et le gène 16S ARNr, respectivement. Nous avons déterminé, en utilisant une régression linéaire et la valeur communément utilisée de 97% d'homologie de 16S pour définir une OTU (Stackebrandt et Goebel 1994), que le seuil définissant l'OTU pour la protéine PR est proche de 82%, ce qui est en accord avec la valeur utilisée (80%) par Campbell *et al.* (2008). Sur notre jeu de séquences PR, plus courtes, nous avons également contrôlé que cette valeur correspondait bien au point d'inflexion maximal de la courbe nombre d'OTUs en fonction du pourcentage d'homologie. Nous avons utilisé cette valeur pour classer les séquences que nous avons obtenues en OTUs. Compte tenu de la courte taille des fragments séquencés (~ 330 pb), donc de la protéine encodée (~ 110 aa) et de la forte variabilité des séquences protéiques entre les hélices- α , ces séquences ont été ajoutées par parcimonie à un arbre robuste préexistant généré par inférence bayésienne à partir de séquences protéiques entières et de bonne qualité de PR. Le pourcentage d'homologie protéique définissant l'OTU pour la PR étant faible et les algorithmes générant les OTUs d'une part et la phylogénie d'autre part étant différents, nous avons contrôlé la congruence des OTUs en construisant un arbre avec les séquences protéiques uniques. Seules 3 OTUs ont présenté des sous-clades phylogénétiques : l'OTU 3 (4 sous-clades), l'OTU 67 (2) et l'OTU 41 (2). En revanche ces sous-clades sont toujours inclus dans des groupes monophylétiques très soutenus.

A partir des mêmes boîtes de pétri d'isolement utilisées pour les BPAA, un nombre aléatoire d'isolats a été repiqué sur du milieu LNHM, mis en culture et purifié puis criblé par

PCR (mêmes amorces que pour la diversité moléculaire) pour détecter la présence de la PR. Les isolats positifs ont été regroupés sur la base de leur ARNr 16S par T-RFLP comme pour les BPAA. Les gènes d'ARN 16S et PR de représentants de chaque groupe T-RFLP ont été séquencés dans les deux sens (sens, anti-sens) par la méthode classique de Sanger. Les séquences PR ont été ajoutées à l'alignement obtenu pour la diversité moléculaire. L'alignement des séquences d'ARNr 16S obtenues et des séquences de référence identifiées par BLASTn comme étant les plus proches a été effectué en utilisant un algorithme tenant compte de la structure secondaire de l'ARNr (MAFFT Q-INS-I). Leur affiliation génétique a été inférée par approche bayésienne, maximum de parcimonie, maximum de vraisemblance et par neighbor-joining avec un nombre élevé de ré-échantillonnages (bootstrapping, 500 ou 1 000 répliques). Un arbre consensus fournissant une phylogénie robuste a été généré.

A partir de la diversité moléculaire et culturale, nous avons choisi des groupes d'intérêts à quantifier par PCRq. Les amorces de PCRq disponibles dans la littérature ont été testées *in silico* sur notre jeu de données pour déterminer leur couverture et leur spécificité. Deux couples d'amorces de PCRq issus de la littérature ont été utilisés. Elles ciblent la PR du groupe des SAR11 (Campbell *et al.* 2008) et celle du clade d'été de Cottrell et Kirchman (2009), correspondant au sous-clade 3a. Des amorces de PCRq ont été dessinées pour 6 autres groupes, soit dominants dans les banques de clones PR, soit correspondant à un isolat. Leur spécificité (y compris les possibilités de formation de dimères d'amorces) et leur température d'hybridation optimale ont été évaluées *in silico* par PCR virtuelle et expérimentalement par PCRq sur des dilutions successives et en gradient de température. La quantification de tous les groupes de PR a été effectuée en utilisant un standard absolu (dilution successive d'un plasmide linéaire contenant un amplicon spécifique à chaque couple d'amorces) et normalisée par la quantification conjointe de l'ARNr 16S et suivant le même protocole (Suzuki *et al.* 2000). En prenant le ratio 1 gène PR pour 1,9 gène d'ARNr 16S par cellule (Campbell *et al.* 2008), nous avons pu estimer leur proportions relatives dans la communauté bactérienne totale dans 73 échantillons de la mer de Beaufort (en triplicata pour chaque couple d'amorces) en surface et à différentes profondeurs ainsi que le long du transect couvrant du Pacifique Nord-Est à la mer de Beaufort (6 échantillons de surface en triplicata). Une analyse des corrélations entre d'une part les paramètres environnementaux mesurés par les autres participants de MALINA et les divers groupes quantifiés d'autre part, a permis d'explorer les relations qu'entretiennent ces groupes avec leur environnement biotique et abiotique. Ce choix a été motivé par des raisons comparables à celles mentionnées pour les BPAA.

6.2. Article 2: *Alphaproteobacteria* dominates the summer proteorhodopsin-containing community in the western Arctic Ocean

En soumission

Proteorhodopsin-containing bacteria are active and abundant in the Western Arctic Ocean

Dominique Boeuf^{1,2}, Raphaël Lami^{3,4}, Emelyne Cunnington^{1,2} & Christian Jeanthon^{1,2}

¹*UPMC, Univ Paris VI, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique, Roscoff, France*

²*CNRS, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique, Roscoff, France*

³*UPMC, Univ Paris VI, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-mer, France*

⁴*CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-mer, France*

Correspondence: C Jeanthon, UMR 7144, Station Biologique, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France ; E-mail: jeanthon@sb-roscoff.fr

Running title: Proteorhodopsins in the western Arctic Ocean

Subject Category: Microbial ecology and functional diversity of natural habitats

Keywords: proteorhodopsin, photoheterotroph, SAR11, Arctic Ocean, Mackenzie River

Abstract

Proteorhodopsins (PRs) are widespread prokaryotic integral membrane proteins that function as light-driven proton pumps and can provide energy for cellular metabolism. The abundance, diversity and activity of PR-containing bacteria are poorly known in polar oceans. The goals of this study were to explore the diversity of PR genes and to estimate their abundance in the southern Beaufort Sea. PR sequences generated from genomic DNA and from cDNA were mainly distributed in the *Gammaproteobacteria* (46%), the *Alphaproteobacteria* (43%) and the *Bacteroidetes* (7%). Substantial overlap between DNA and cDNA libraries indicated in situ PR transcription for a large fraction of PR-containing community. Sets of specific qPCR primers were designed to examine the abundance of six PR types. Depth profiles showed that PR-containing bacteria were abundant throughout the water column (until 80m depth), comprising up to 44% of total bacteria, although they varied greatly with location and depth. On average, they made up 15% of the bacterial community. *Alphaproteobacteria* dominated the PR community in all water masses of the Beaufort Sea with SAR11 as the major PR type. This study suggests that PR-based phototrophy is a significant and active process in the Arctic Ocean, probably having important ecological roles in this extreme environment.

Introduction

Proteorhodopsins (PRs) are retinal-binding integral membrane proteins that function as light-driven proton pumps. They can have several physiological functions, including ATP generation (Fuhrman *et al.* 2008) but their actual role in the environment is unclear. After its initial discovery on a large genomic fragment derived from an uncultured marine gammaproteobacterium of the SAR86 group (Béjà *et al.* 2000), PRs have been found in a diversity of bacterial groups notably in the cosmopolitan clade of *Alphaproteobacteria* SAR11 and its cultivated representative *Candidatus Pelagibacter ubique* (Giovannoni *et al.* 2005a). They have also been observed in the alphaproteobacterial SAR116 clade (Oh *et al.* 2010, Grote *et al.* 2011) the gammaproteobacterial clade SAR92 (Stingl *et al.* 2007a), in *Roseobacter* and *Bacteroidetes* species (Gómez-Consarnau *et al.* 2007, González *et al.* 2008, Riedel *et al.* 2010, Yoshizawa *et al.* 2012) and among others like in marine planktonic *Archaea* (Frigaard *et al.* 2006). These photoproteins are tuned to absorb the different spectral wavelengths of light found in the environment (Man *et al.* 2003, Sabehi *et al.* 2007). PR-containing bacteria have been detected in a wide variety of ocean regions (Béjà *et al.* 2001, Venter *et al.* 2004, Rusch *et al.* 2007, Sabehi *et al.* 2007, Campbell *et al.* 2008) and also in brackish, freshwater and sea ice ecosystems (Atamna-Ismaeel *et al.* 2008, Koh *et al.* 2010).

Although estimates vary greatly depending on the oceanic region and detection method, PR photosystems have been detected in a large percentage of ocean surface-dwelling prokaryotes, and were suggested to be horizontally transferred among phylogenetically divergent microbial taxa (Frigaard *et al.* 2006, McCarren et DeLong 2007). They accounted for up to 65% in the Sargasso Sea, 13% in the Mediterranean Sea and 35% in the North Sea, and ranged from 7 to 57% in the North Atlantic Ocean (Venter *et al.* 2004, Sabehi *et al.* 2005, Rusch *et al.* 2007, Campbell *et al.* 2008, Riedel *et al.* 2010). However, there are still few quantitative assessments of PR gene abundance in marine environments. Furthermore,

understanding PR distributions is still challenging because only a few PR-containing organisms have been isolated into pure culture.

The Arctic Ocean is a land-locked basin with a cold, moderately brackish upper mixed layer. These upper photic waters are separated from deeper waters by a strong halocline that is maintained by large river inputs and the annual formation and melting of sea ice (Aagaard *et al.* 1981). The physical isolation, perennially cold water temperatures, and extreme annual light cycle provide a unique marine habitat for microorganisms (Carmack *et al.* 2002). Although PR sequences have been detected in the Arctic (Cottrell *et al.* 2009) and the Southern Oceans (Béjà *et al.* 2000, Koh *et al.* 2010), our current knowledge of the abundance, distribution, and activity of PR-containing bacteria in polar marine waters is still limited. In the only study in the Arctic Ocean (Cottrell *et al.* 2009), the PR genes identified in summer and winter were phylogenetically distinct from those found in lower-latitude waters. Two PR groups of sequences were quantified and no consistent seasonal shifts in abundance between seasons were observed. The latter study provided information on a couple of coastal sites and did not examine, for example, the transition zones between offshore and large Arctic rivers that have a major influence on coastal ocean biogeochemistry.

The goals of this study were to learn more about diversity and activity of PR bacteria, to estimate PR gene abundance and to examine how the abundances of different PR groups vary with environmental parameters. Samples were collected in summer 2009 along a 3,000 km transect from the North East Pacific to the Arctic Ocean focusing on the Beaufort Sea and the Mackenzie shelf. Up to now, only a very small number of PR-containing bacteria have been isolated from arctic waters and the examination of the taxa actively expressing PR gene in Arctic waters has never been conducted. Here, we revealed the identity of organisms having the genetic potential for PR phototrophy (DNA) versus those actively expressing PR genes (mRNA). Furthermore, using quantitative PCR (qPCR) we examined the abundance of eight

types of PR genes obtained in clone libraries or in culture. We found that water masses of the Beaufort Sea water column harbor distinct PR communities dominated by alphaproteobacterial PR types whose abundance varies with environmental parameters.

Materials and methods

Sampling and oceanographic parameters

The MALINA cruise took place onboard the Canadian research icebreaker *CCGS Amundsen* during summer 2009 from Victoria (BC, Canada) to the Beaufort Sea (Leg 1b) and then throughout the Beaufort Sea (Leg 2b) (Fig. S1). Most of the stations sampled on the west–east transect in the Beaufort Sea (Leg 2b) were ice-free. However, surface waters of eastward offshore waters were still ice-covered. Surface seawater samples were collected with a clean bucket during Leg 1b and in the Mackenzie plume (stations 395, 398, 694, and 697) during Leg 2b. In the Beaufort Sea, seawater was collected from six depths using Niskin bottles mounted on a CTD (conductivity temperature depth probe) rosette. Ancillary data of temperature, salinity, pH, dissolved oxygen, colored dissolved organic matter, inorganic and organic nutrients, and chlorophyll *a* were kindly provided by D. Doxaran, P. Raimbault, N. Garcia, and J. Ras (Boeuf *et al.* 2013a).

Bacterioplankton biomass for DNA and total RNA extraction were collected onboard. Seawater samples were prefiltered through 47 mm diameter and 3 μm pore size polycarbonate filters (Cyclopore, Whatman, USA) before the final collection of bacterioplankton cells onto 0.22 μm -pore-size Sterivex cartridges (Millipore, USA) for DNA extraction or onto 27 mm diameter and 0.22 μm -pore-size Durapore filters (Millipore, USA) for RNA extraction. Sterivex cartridges were filled with 1.6 ml of lysis buffer (0.75 M sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 8), immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. To limit the degradation of mRNA, small volumes of seawater (~ 1 liter) were filtered as rapidly as

possible, immediately upon retrieval of the CTD. RNA filters were transferred in collection tubes containing 0.8 ml of RLT buffer (Qiagen, Hamburg, Germany) with 1 % of β -mercaptoethanol, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. The time from the start of filtration to storage was 15-20 min.

Isolation and identification of PR-containing bacteria

Seawater samples (50-100 μl) collected at the surface and at the deep chlorophyll maximum (DCM) were spread onto low nutrient heterotrophic medium (Cho et Giovannoni 2004) prepared using seawater collected at station 860 at the surface and the DCM, respectively. Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) was added to the medium at a final concentration of 100 nM (Stingl *et al.* 2007b). Culture plates were incubated for up to 2 months at 4°C into thermostatic cabinets illuminated by luminescent tubes at irradiance levels of $120 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (for surface samples) and $25 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (for DCM samples) in 10:14 light-dark cycle.

Bacterial DNA was extracted using the QuickExtract™ Bacterial DNA Extraction Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). PR genes were detected by PCR amplification with degenerate primers (Table S1) using conditions described by (Campbell *et al.* 2008). PR-containing isolates were screened by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) of 16S rRNA genes (Boeuf *et al.* 2013a). PR and 16S rRNA gene sequences of at least two randomly chosen strains from each T-RFLP group (if applicable) were amplified by PCR (Table S1). When necessary, PCR products were gel-purified using the DNA gel extraction kit (Millipore, Billerica, MA, USA) and sequenced with an ABI 3130 POP7 sequencer (Applied Biosystems).

16S rRNA gene sequences were compared to sequences in public databases with BLASTn (Altschul *et al.* 1997). The new sequences were aligned according the secondary

structure of the rRNA using the Q-INS-I strategy from MAFFT sequence alignment program version 6.5 (Kato *et al.* 2009). Phylogenetic trees were computed using Bayesian, neighbor-joining, and maximum likelihood inference approaches using MrBayes (Ronquist *et al.* 2003) and MEGA 5 softwares (Tamura *et al.* 2011), respectively.

Diversity analysis of PR genes and transcripts

DNA was extracted as previously described (Marie *et al.* 2010) and concentrated using 100 kDa Amicon Ultra centrifugal filter device (Millipore). Total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions with several modifications. Glass beads (50 μ l) were added to the samples after thawing on ice and the tubes were mixed vigorously for 10 min. Any trace of genomic DNA was removed using a Turbo DNA-free kit (Ambion, Life Technologies, Paisley, UK). DNA removal in RNA samples was confirmed by control 16S rRNA gene amplifications without the reverse transcription step. ThermoScript RT-PCR system (Invitrogen, Carlsbad, USA) was used for the reverse transcription of PR mRNA from total RNA samples. cDNA synthesis was performed at 55 °C using the PR1-aR primer as gene-specific primer. PR genes and transcript amplicons obtained as described above were cloned directly or after gel extraction using the TOPO4-TA cloning kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Recombinant clones were sequenced as described above.

The sequences were trimmed to remove any vector and primer sequences. DNA sequences were translated into amino acid sequences and aligned according to the tertiary structure of proteins using the E-INS-I strategy and BLOSUM62 substitution matrix from MAFFT (Kato *et al.* 2009). The resulting protein alignment was back-translated to nucleotide acid sequences using Geneious software (Drummond *et al.* 2012). A conservative value of 82% amino acid sequence similarity was chosen for clustering sequences into

Operational Taxonomic Units (OTUs) using MOTHUR (Schloss *et al.* 2009). Representative sequences (defined as the sequence with the minimum distance to all other sequences in the OTU) were obtained using MOTHUR. The coverage value (Mullins *et al.* 1995), the Shannon index, $H_{Shannon}$ (Shannon 2001) and the bias-corrected richness-estimator, S_{Chao1} (Chao *et al.* 2005) were calculated for each library.

A PR gene database containing about 2000 aligned sequences of cultured species and environmental sequences retrieved from GenBank was constructed using Geneious (Drummond *et al.* 2012). A phylogenetic tree was constructed with entire protein sequences by Bayesian inference using MrBayes 3.0 (Ronquist et Huelsenbeck 2003) with mixed models of amino acid substitution estimated by Markov chain Monte Carlo (MCMC) procedure. Four parallel MCMC chains of 1.5 million generations were run; trees were sampled every 100 generations. A consensus tree was constructed after the exclusion of 13,000 'burnin' trees. The PR gene database and the consensus tree were imported into ARB software (Ludwig *et al.* 2004). Representative sequences of each OTU and short PR gene environmental sequences were aligned as above and added to the consensus Bayesian tree using the ADD_BY_PARSIMONY algorithm implemented in ARB. Non-informative taxa were removed from the final tree.

Quantification of PR gene abundance

Eight PR-containing bacterial groups recovered in the libraries were targeted by qPCR. When primers specific for these clades were not available in literature, they were designed using ARB (Table S1). The 16S rRNA genes for all bacteria were quantified using primers (Table S1) and conditions described elsewhere (Suzuki *et al.* 2000). Plasmid clones from our PR gene and 16S rRNA libraries were used as positive controls and for standard curves (10-

fold dilution series) in the qPCR assays. Plasmid DNA was linearized with *Hind*III and quantified using the Picogreen assay (Invitrogen).

QPCR was performed in triplicate with 1 μ l of environmental DNA normalized to 100 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ or plasmid DNA solution in a total reaction volume of 10 μ l using the ABsolute QPCR SYBR Green/ROX Master Mix *kit* (Thermo Scientific). QPCR assays were performed using a Chromo4 Real-Time PCR Detection System and the Opticon Monitor software package (Bio-Rad) with the following thermal cycling conditions: 95°C for 15 min, 45 cycles of denaturation at 95°C for 45 s, primer annealing at the primer-specific temperature (Table S1) for 45 s with fluorescence measurements after this step, and polymerase extension at 72°C for 15 s. Melting curves were generated after each assay to check the specificity of the amplification by heating from 65 to 95°C at a rate of 0.1°C.s⁻¹ and taking fluorescence measurements every 5 sec. Only single peaks were observed in the dissociation curves for both the standards and samples, indicating specific amplification with each set of primers. Average amplification efficiencies were as follows: bacterial 16S rDNA = 103.7% (\pm 0.9), SAR11 16S rDNA of = 95.3% (\pm 0.36), SAR11-PR = 95.6% (\pm 1.16), summer clade (OTU3a-PR) = 98.3% (\pm 1.39), OTU3b-PR = 104.3% (\pm 2.81), OTU11-PR = 98.4% (\pm 0.98), OTU9-PR = 95.1% (\pm 2.03), OTU1-PR = 95.9% (\pm 0.84), OTU10-PR = 101% (\pm 3.05) and *Flavobacterium*-PR = 103.7%.

No inhibition was detected when a known quantity of standard was added to DNA extracts (data not shown). The estimates of PR gene abundance were normalized to 16S rRNA gene abundance in order to estimate the fraction of the bacterial community bearing each PR gene type (Campbell *et al.* 2008).

Nucleotide sequence accession numbers

The environmental PR gene sequences obtained in this study are available in GenBank database under the accession numbers JX863105 to JX863220 (DNA sequences) and JX863221 to JX863333 (cDNA sequences). The 16S rRNA and PR gene sequences of the isolates are available in GenBank database under the accession numbers JX863350 to JX863365 and JX863334 to JX863349, respectively.

Results

Diversity of environmental PR sequences

A wide diversity of PR variants was discovered in the ten samples selected along the transect covering the North Pacific Ocean to the Beaufort Sea. Of a total of 617 PR gene sequences analyzed, 306 were derived from DNA and 311 from cDNA. 72 distinct OTUs were identified after grouping the sequences at 82% amino acid sequence similarity. Coverage estimates (> 80%) and rarefaction curves (data not shown) indicated that most of the diversity was detected in the libraries from offshore and shelf stations (Table S2). S_{Chao1} values (estimated numbers of expected OTUs) generally agreed with the numbers of OTUs retrieved. In these libraries, the diversity of PR-containing bacteria was generally higher in surface than in deeper waters (Table S2). The highest diversity was observed in the Mackenzie mouth while the coverage index was low.

A phylogenetic tree was constructed for all 72 identified OTUs from this study and from previous studies of PR sequences (Fig. 1). The phylogenetic analysis revealed that 64 OTUs were tentatively assigned to either *Gamma*- (20 OTUs, ~ 46 % of the sequences) or *Alphaproteobacteria* (16 OTUs, ~ 43% of the sequences). Sequences affiliated with the *Bacteroidetes* accounted for an equivalent number of OTUs (18) but a lower proportion of sequences (~ 7%). Eight OTUs (1.5%) were related to *Betaproteobacteria* and one to *Deltaproteobacteria*. Eight OTUs could not be confidently assigned.

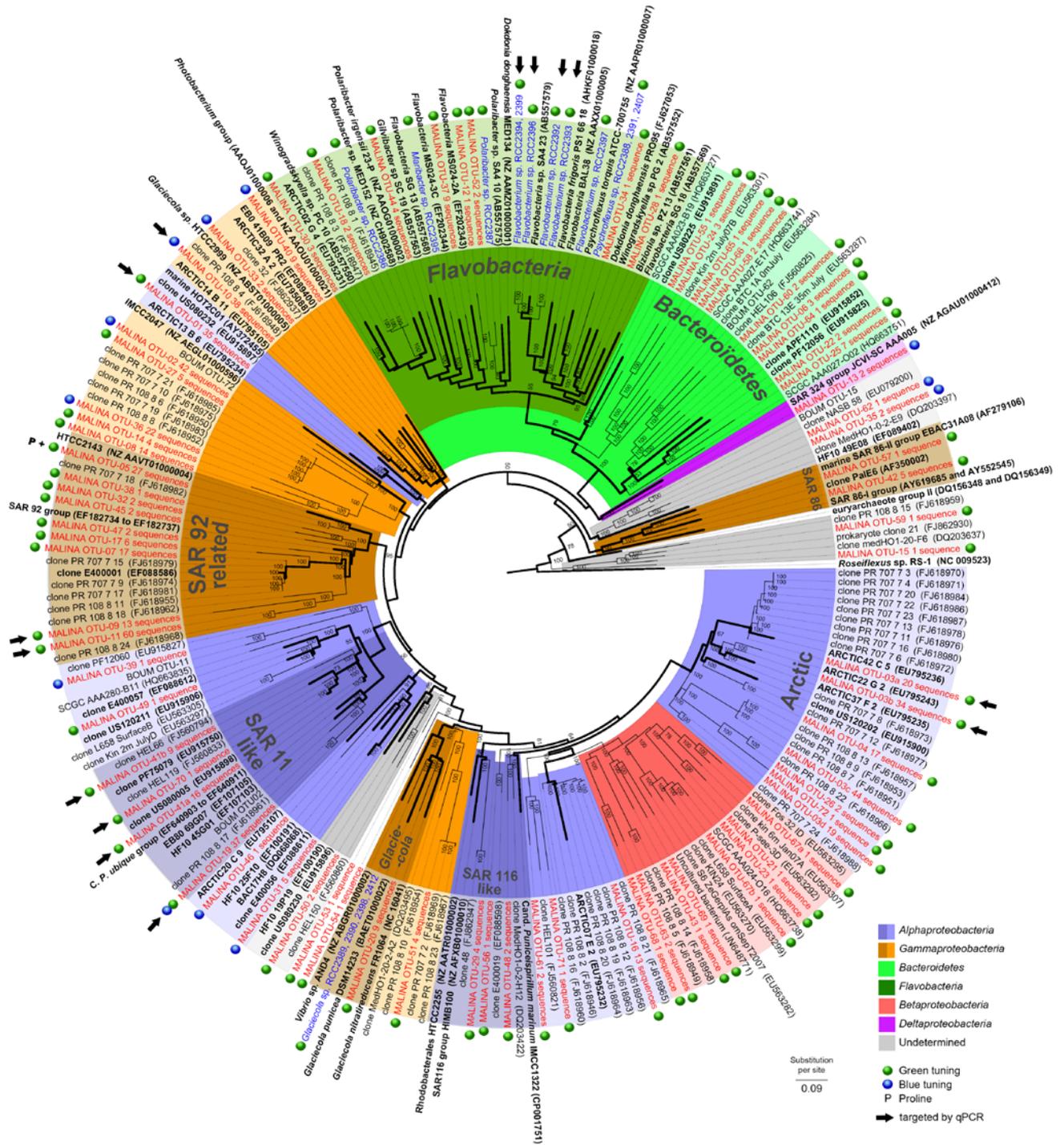


Fig. 1. Phylogenetic tree showing the relationships between PR gene sequences from MALINA isolates (in blue), environmental samples (in red) and relatives retrieved in GenBank (in black). Blue and green dots show the predicted absorption of blue or green light as inferred from the amino acid sequence. P indicates PR variants with proline at the position 105. Black arrows indicate OTUs targeted by qPCR assays. The tree is based on a bayesian tree to which short sequences were added by ARB_PARSIMONY. Initial bayesian tree is shown in bold lines. The numbers on nodes represent branch confidence values. The scale bar represents dissimilarity between amino acid positions.

About half of the alphaproteobacterial sequences (OTU3, 117 sequences) were most closely related to environmental clones from the Arctic Ocean (Cottrell et Kirchman 2009). This OTU that formed 4 clusters in our phylogenetic reconstruction and grouped exclusively with PR sequences from the Chukchi, Beaufort and Bering Seas (Cottrell et Kirchman 2009) was named « Arctic group ». OTU3a, one of these clusters, corresponded to an Arctic summer clade retrieved by Cottrell & Kirchman (2009). Sequences related to the SAR11 clade containing *P. ubique* (91-100% similarity) accounted for 10% of PR clones. A cluster of 35 sequences (OTU1 ; 5% of all PRs) was related (75% similarity) to the HOT2C01 PR (de la Torre *et al.* 2003). A few proteobacterial sequences grouped into the SAR116 clade containing cultured representatives « Candidatus *Puniceispirillum marinum* » and strain HIMB100 (Oh *et al.* 2010, Grote *et al.* 2011).

Although most gammaproteobacterial OTUs were most closely related to existing Arctic sequences or belonged to novel OTUs, large OTUs were related to cultivated PR-containing species. Nine OTUs including the largest one, OTU11 (60 sequences), contained sequences highly related to clones recovered from the Arctic Ocean (Cottrell et Kirchman 2009) and grouped with cultured representatives of the SAR92 group (Cho et Giovannoni 2004, Stingl *et al.* 2007a, Oh *et al.* 2010). OTU2 representing 42 sequences was significantly related (>78%) to the PR gene of strain IMCC2047 isolated from coastal surface waters of the Yellow Sea (Kang *et al.* 2011) and OTU10 (38 sequences) showed significant levels of similarity (>79%) to the PR gene of *Glaciecola* sp. HTCC2999 and. A few PR sequences (OTU20, 9 sequences) were almost identical to that of *Glaciecola psychrophila* isolated from Arctic sea ice (Zhang *et al.* 2006). Only a few clones were assigned to the SAR86 group, an abundant uncultivated marine lineage (Sabehi *et al.* 2004, Dupont *et al.* 2012).

About half of the *Bacteroidetes*-like OTUs belonged to the class *Flavobacteria* and were highly similar to cultured bacteria of the genera *Dokdonia* and *Polaribacter*. The other half clustered with sequences mostly retrieved from freshwater environments. Same diversity patterns have been observed for the total bacterial community along the Mackenzie – Beaufort sea transition by Galand *et al.* (2008a).

Activity and geographical distribution of PR-containing bacteria

Eighteen OTUs representing more than 72% of the sequences were found in both DNA and cDNA libraries. Sixteen percent of the sequences were only recovered in DNA libraries (34 OTUs) and 11% originated from cDNA (20 OTUs). cDNA clones without corresponding DNA clones (gammaproteobacterial OTU36) may represent bacteria that are uncommon but metabolically highly active and important for local PR phototrophy. The absence of matching clones in the cDNA libraries (gammaproteobacterial OTU2) implies that the bacteria represented by these sequences may have only low activity. Cluster analysis of the PR community composition separated the samples in three main groups (Fig. 2). One contained DNA and cDNA libraries from most surface samples and a second grouped most libraries of samples collected below the surface. The only exception was the cDNA library of sample 680_40m. The third cluster contained cDNA libraries of sample 170 whose diversity was low and mainly composed of dominant OTUs. OTU3 dominated in DNA and cDNA libraries from Chukchi and Beaufort Sea surface waters but was absent in North Pacific (Fig. 2). SAR11 PR sequences were poorly retrieved in DNA libraries but they were present in most RNA libraries from surface and deeper layers. Gammaproteobacterial sequences generally dominated in libraries from deeper layers and large OTUs prevailed. OTUs assigned to the *Betaproteobacteria* and *Bacteroidetes* were restricted to river-influenced stations.

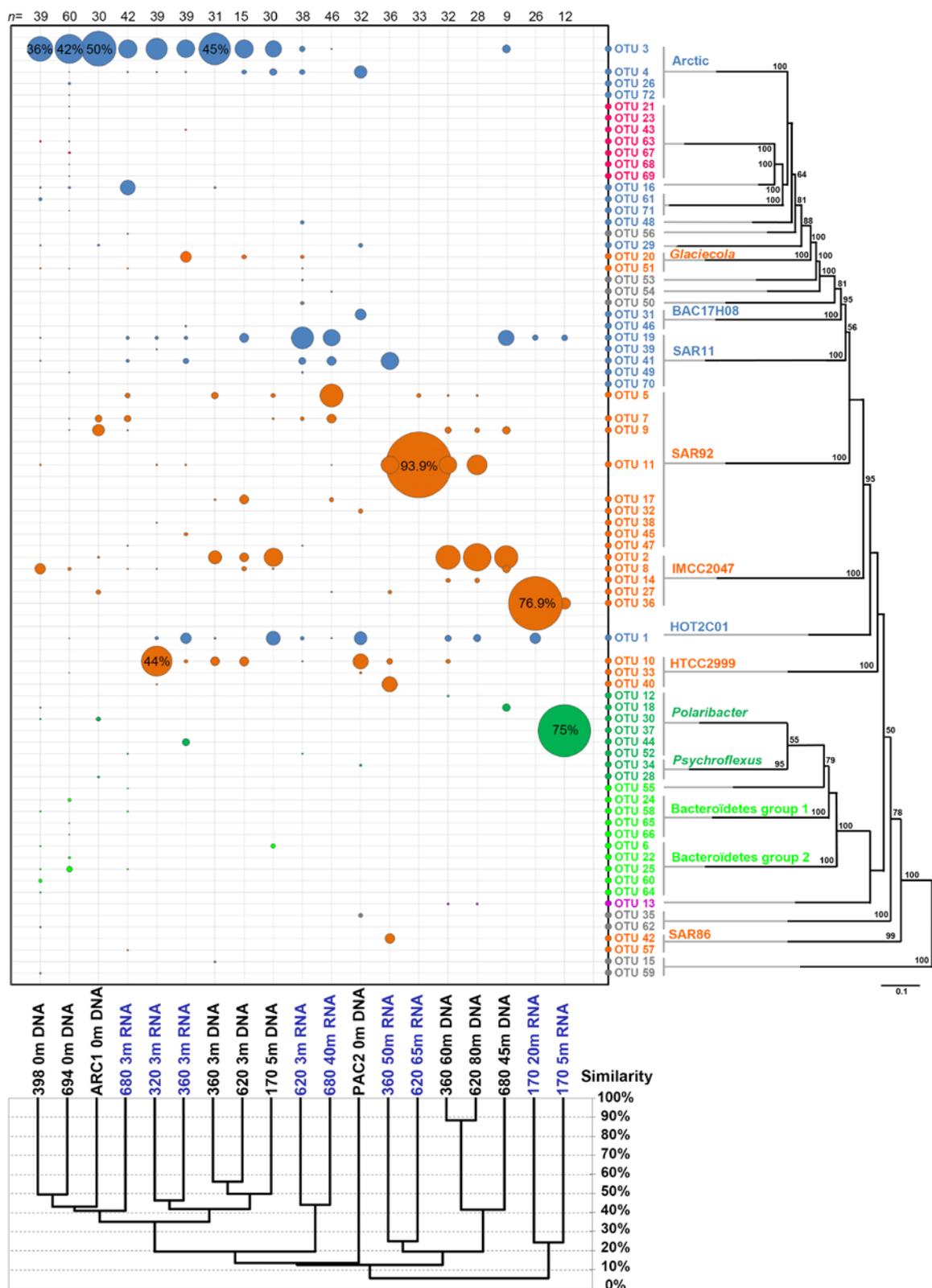


Fig. 2. Relative abundance of OTUs in clone libraries constructed from DNA (in black) or cDNA (in blue). The dendrogram (bottom) represents the similarity between the phylogenetic composition of PR gene libraries. Clustering is based on a distance matrix computed with Bray-Curtis similarity from the abundance of OTUs in clone libraries. The phylogenetic relationships between OTUs are shown in the phylogenetic tree (the scale bar represents the number of amino acid substitution per site). OTUs are colored according to phylogenetic affiliation. Numbers of clones (n) per library is indicated.

Although *Polaribacter*-related cDNA sequences prevailed in station 170, members of the *Bacteroidetes* formed generally a small fraction of the PR active community.

A large majority (81%) of the predicted PR proteins retrieved in this study contained leucine or methionine at position 105, suggesting that they are green-absorbing PRs (Fig. S3). Green-absorbing PRs were dominant in all surface samples. Among them, all PR sequences that carried a methionine at this position belonged to *Bacteroidetes*. They were present only in surface libraries and their relative abundance was higher in river-influenced stations. Relative abundances of blue-absorbing PRs, with a glutamine at position 105, increased in offshore surface stations of the North Pacific Ocean and the Beaufort Sea. They also increased with depth and dominated at depth at station 170 where an upwelling probably occurred.

Diversity of PR-containing isolates

To gain more insights into the phylogenetic affiliation of the PR genes obtained in this study, PR-containing bacteria were isolated from Beaufort Sea samples. Using the PR-1aF and PR-1aR primer set (Table S1), PR genes were detected in 25 of 470 isolates tested. Diverse PR-containing isolates were obtained from offshore and shelf waters of the Beaufort Sea. Based on T-RFLP analyses of 16S rRNA gene, they were distributed in 7 groups (Table 1). The major T-RFLP group (11 strains) was affiliated with the gammaproteobacterial genus *Glaciecola* and the other six with the family *Flavobacteriaceae*. Among *Flavobacteriaceae*, isolated strains belonged to the genera *Flavobacterium*, *Psychroflexus*, *Polaribacter* and *Maribacter* (Fig. 3). 16S rRNA genes of all the isolates were most closely related with those of strains or environmental clones retrieved from polar seawater or sea ice samples (Table 2). PR sequences of some isolates fell into OTUs retrieved in this study. *Glaciecola* isolates had PR amino acid sequences highly similar to that of OTU 20 (> 84% identity) (Fig. 1) whereas PR sequences of *Polaribacter* strains RCC2386 and RCC2387 were highly similar (> 88%

Table 1. Main features of T-RFLP groups determined among the 25 PR-containing isolates and affiliation of their representative strains.

T-RF size (bp)		Nb of strains	Representative strains	16S rRNA gene closest relative			PR closest relative				
FAM ^a	HEX ^b			Name	Accession number	Similarity (%)	Isolation site	Name	Accession number	Similarity (%)	Isolation site
84	112, 115, 127	7	RCC 2392 (RCC 2393, 2394, 2396, 2399)	strain ARK10272	AF468432	99.9	Arctic Ocean	<i>Flavobacterium</i> bacterium BAL38	ZP_01734914	83.7	Baltic Sea
83	112, 115, 127	2	RCC 2397	<i>Flavobacterium</i> sp. R-38477	FR772059	98.9	Antarctica	<i>Flavobacterium frigidis</i> PS1	ZP_09895557	77.6	Ross Sea
325	20, 121, 165, 181	2	RCC 2388 (RCC 2391)	<i>Psychroflexus</i> sp. gap-d-25	DQ530461	99.7	Antarctic sea ice	<i>Psychroflexus torquis</i> ATCC700755	ZP_01253360	86.2	Southern Ocean
87, 325	112, 115, 127	1	RCC 2386	<i>Polaribacter</i> sp. BSw20011	EU365593	100	Arctic Ocean	Clone PR_108_08_01	ACM79430	100	Arctic Ocean
87	112, 115, 127	1	RCC 2387	Fosmid ARCTIC40_B_04	EU795091	100	Arctic Ocean	Uncultured sea ice bacterium	ADB27806	82.2	Ross Sea
86, 89	77, 127	1	RCC 2395	Strain ARK10223	AF468428	100	Arctic Ocean	Clone 1812216	ABY66923	81.6	Indian Ocean
329	20, 120, 165	11	RCC 2389 (RCC 2390, 2398)	Clone DFCb33	HQ230172	100	Arctic snow	<i>Glaciecola nitratireducens</i> FR1064	YP_004870549	87.9	East China Sea

^aFAM, carboxyfluorescein; ^bHEX, hexachlorofluorescein; T-RF, terminal restriction fragment; RCC, Roscoff Culture Collection

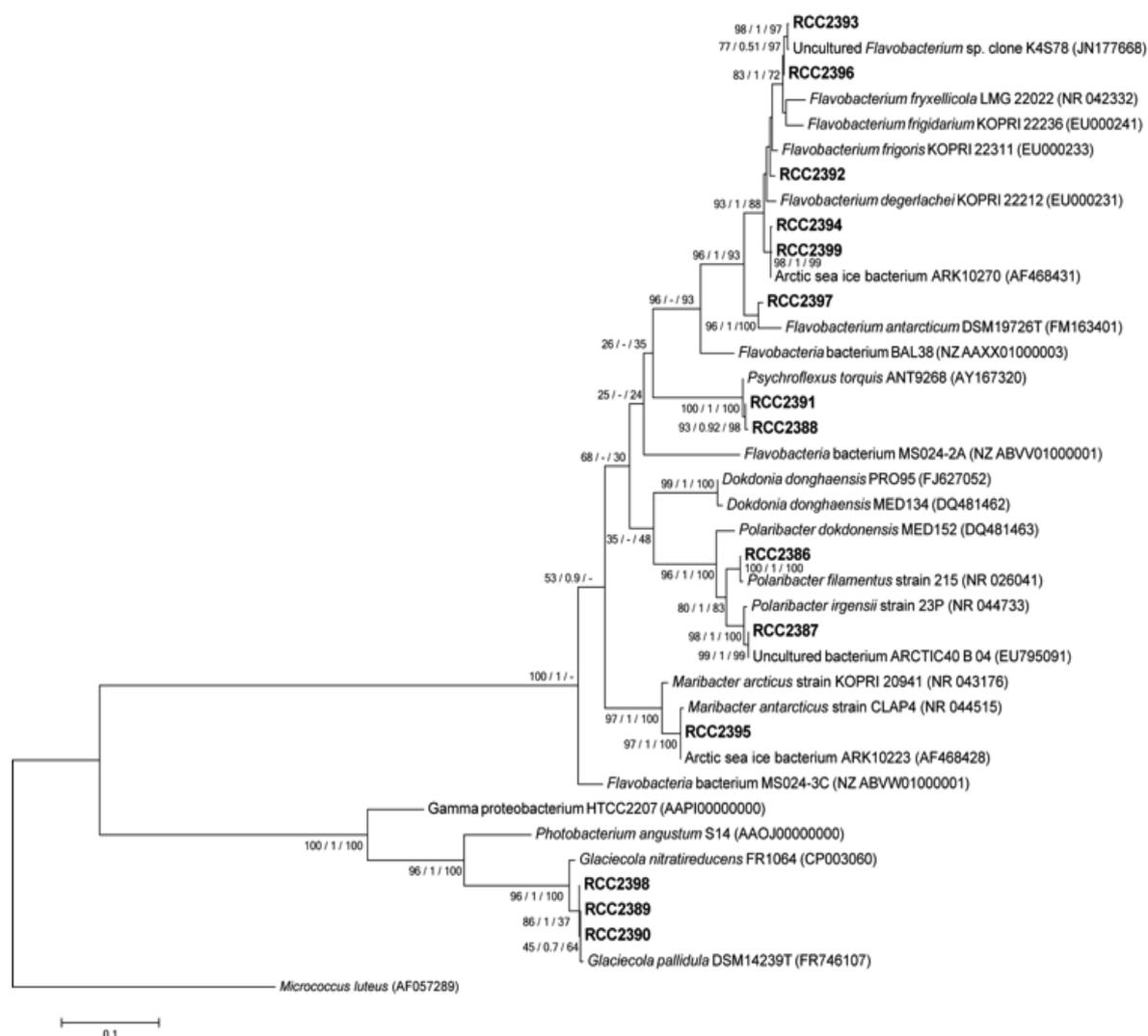


Fig. 3. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA sequences indicating the position of selected PR-containing strains isolated during the MALINA cruise. Numbers show nodal supports from maximum likelihood (100 resamplings), bayesian posterior probabilities (1.5 million generations), and neighbor-joining analyses (1000 resamplings), respectively. The scale bar represents dissimilarity percentage between nucleotide positions.

identity) to that of OTU52. Interestingly, strain RCC2386 and an environmental clone obtained from the Chukchi Sea (Cottrell et Kirchman 2009) has identical PR. Other isolates did not fall in any OTU obtained in this study.

Table 2. Relative abundances of PR sequence types (%) as quantified by qPCR (minimal value - maximal value) in water masses delineated in the Beaufort Sea.

Affiliation	Group targeted	Water samples categories				all samples (n=73)
		River plume surface (n= 4)	Shelf surface (n= 19)	Offshore surface (n= 9)	Other depths (n= 41)	
<i>Alphaproteobacteria</i>						
	SAR11	5.4 (2.2 - 9.2)	9.1 (0 - 29.4)	11.1 (1.6 - 21.0)	11.4 (0.5 - 35.3)	10.4 (0 - 35.3)
	Arctic clade OTU3a	3.4 (2.8 - 3.9)	2.9 (<0.1 - 9.8)	4.5 (0.5 - 18.9)	0.9 (0 - 4.7)	2.5 (0 - 18.9)
	Arctic clade OTU3b	0.8 (0.4 - 1.5)	0.7 (<0.1 - 2.1)	3.0 (0.7 - 5.2)	0.4 (<0.1 - 2.1)	0.8 (<0.1 - 5.2)
	HOT2C01-related OTU1	4.0 (1.5 - 6.1)	2.0 (0.2 - 6.9)	2.1 (0.8 - 3.0)	2.0 (0.2 - 9.6)	2.1 (0.2 - 9.6)
	Total	13.6 (6.8 - 17.5)	13.9 (0.6 - 37.9)	20.1 (6.7 - 38.3)	14.0 (1.0 - 43.9)	14.7 (0.6 - 43.9)
<i>Gammaproteobacteria</i>						
	SAR92 OTU9	0.1 (0.1 - 0.2)	0.2 (0 - 1.3)	0.2 (<0.1 - 0.6)	0.2 (<0.1 - 0.7)	0.2 (0 - 1.2)
	SAR92 OTU11	0.1 (<0.1 - 0.3)	0.2 (0 - 0.9)	<0.1 (<0.1 - 0.3)	0.5 (0 - 2.8)	0.4 (0 - 2.8)
	HTCC2999-related OTU10	0.3 (<0.1 - 0.7)	<0.1 (0 - 0.2)	0.2 (<0.1 - 0.4)	0.1 (0 - 0.5)	0.1 (0 - 0.7)
	Total	0.6 (0.2 - 1.0)	0.4 (<0.1 - 1.5)	0.5 (0.2 - 1.2)	0.8 (0.1 - 3.4)	0.6 (<0.1 - 3.4)
<i>Flavobacteria</i>						
	<i>Flavobacterium</i> sp.	<0.1 (0 - <0.1)	<0.1 (0 - <0.1)	0.1 (<0.1 - 0.2)	<0.1 (0 - <0.1)	<0.1 (0 - 0.2)
	Total	14.2 (7.0 - 18.0)	14.3 (0.9 - 39.1)	20.7 (7.2 - 39.4)	14.8 (1.1 - 44.7)	15.4 (0.9 - 44.7)

Proteorhodopsin gene copies were normalized to 1.9 16S rRNA gene copies

Abundance and distribution of main PR OTUs

Using the sequences of PR genes amplified from the Beaufort Sea, we designed qPCR primers to target six groups of PR genes (Table S1, Fig. 1): the alphaproteobacterial OTU3b and OTU1, the SAR92-related OTU9 and -11, the *Glaciicola*-related OTU10 and a cluster composed of four *Flavobacterium* isolates. Using primers sets designed by Campbell *et al.* (2008) and Cottrell and Kirchman (2009), we also investigated the abundance of SAR11 PR clade and subcluster OTU3a, respectively. Abundances of PR genes were normalized to the abundance of bacterial 16S rRNA genes assuming that one marine bacterium harbors only one PR gene copy but on average 1.9 copies of the 16S rRNA gene (Venter *et al.* 2004, Campbell *et al.* 2008). To estimate total abundances of PR-containing bacteria, we added together the abundance estimates of all eight tested microbial groups containing PR genes (Table 2). In the Beaufort Sea, the total PR relative abundances ranged from <1% to 45% with a mean contribution of about 15% of total bacteria. The mean contributions were highest in offshore waters and similar in other water types as defined in Boeuf *et al.* {, 2013 #671} using temperature and salinity profiles. Alphaproteobacterial PR groups dominated (>94% of the total PR groups) in all water types. Although weak variations in their mean relative abundance were observed between water categories, distinct biogeographical patterns occurred at the clade level. The SAR11 PR-containing bacteria prevailed in all water categories of the Beaufort Sea and their mean surface abundances doubled from the river plume to offshore waters. Highest surface contributions were recorded near the Amundsen Gulf (stations 110 and 130) and in the central Beaufort Sea (stations 320 and 360). In most shelf and offshore stations, SAR11 PR abundances increased with depth and peaked below or above the chlorophyll maximum. The highest SAR11-like PR abundances (> 30%) were obtained offshore (stations 540 and 760) at 50m depth. The second most abundant PR-containing group, OTU 3a, had higher contributions in surface waters and increased from the

river plume to offshore waters (up to 19%) with a mean contribution of 4.5%. The OTU3b PR type shared the same distribution pattern but was less abundant. Both latter clades decreased with depth. The OTU 1 related to the HOT2C01 group decreased from the river plume to offshore waters but increased with depth. Abundance of gammaproteobacterial groups were generally low ranging from < 0.1 to 3.4%. Highest contributions were obtained in shelf surface waters (OTU9) and DCM waters (OTU11).

General trends observed in surface waters of the Beaufort Sea were similar in samples along the North Pacific Ocean-Beaufort Sea transect (Table S3). However, a remarkable high relative abundance of OTU3a was obtained in a sample from the Chukchi Sea (ARC1), confirming its dominance in the corresponding clone library. *Flavobacterium* PR type was generally not detected in the Beaufort Sea but its highest abundances were recorded in offshore surface samples. Also almost undetected along the North Pacific Ocean-Beaufort Sea transect, this group reached 1.9% of total bacteria in a sample Chukchi Sea (ARC2).

Links between main OTUs and environmental parameters

In contrast to total prokaryote abundance, relative gene abundance of the sum of all PR-containing bacteria and of most PR types did not increased significantly with chlorophyll a or light (Table S4). Nitrate and silicate, which high concentrations is a signature of Pacific Summer Water (Tremblay *et al.* 2002), were negatively correlated with the relative gene abundance of most PR types, suggesting that oligotrophic conditions of the polar mixed layer shaped the distribution of these clusters. The other most notable exception was the significant positive correlations between the OTU11 abundance and these nutrients. In contrast to all other PR types, OTU11 abundance increased significantly with salinity, nutrients and chlorophyll *a* and decreased significantly with temperature. Four PR types (OTU3a, OTU3b, OTU1 and *Flavobacterium*) decreased significantly with depth. In contrast to the three other

types, OTU3a increased significantly with light, indicating its preference for epipelagic waters. An inverse relationship was found between relative abundance of *Flavobacterium* PR type and salinity, consistent with the dominance of *Flavobacteria* in bacterial communities of sea-ice and melting water (Staley et Gosink 1999, Brinkmeyer *et al.* 2003).

Discussion

PRs are globally abundant and highly expressed bacterial photoproteins in the photic zone of the ocean (Venter *et al.* 2004, Rusch *et al.* 2007, Frias-Lopez *et al.* 2008). However, they have been mostly examined in temperate and tropical ecosystems (Rusch *et al.* 2007, Campbell *et al.* 2008, Riedel *et al.* 2010) and relatively little is actually known regarding their abundance in the oceans. Moreover, few attempts have been performed to identify the prokaryotic fraction actively expressing PR genes *in situ*. In this study, we examine the diversity of PR-containing bacteria and transcripts along environmental gradients in the Arctic Ocean. We then estimated the abundance of main active PR groups and identified environmental factors driving their distribution.

Proteorhodopsin gene abundance and diversity

Previous studies reported high PR diversity in temperate and tropical environments (Sabehi *et al.* 2007, Lami *et al.* 2009, Riedel *et al.* 2010). Our estimates of PR diversity in the Beaufort Sea surface waters are similar to that reported in Delaware coastal waters (Lami *et al.* 2009). These results indicate low-temperature environments also harbor substantial genetic variability of PR photosystems. Half of the PRs retrieved in this study were closely related (> 82% amino acid similarity) to existing Arctic sequences or belong to novel OTUs, suggesting that they are restricted to Arctic waters. The other half matched with sequences from elsewhere, indicating that they are widely distributed in marine waters. This is in contrast to

the case of *pufM* genes, most being restricted to Arctic waters (Cottrell et Kirchman 2009, Boeuf *et al.* 2013a).

We chose to quantify the PR gene of sequences that represented isolates or large OTUs obtained in cDNA libraries. The total abundance of all the quantified PR genes was much lower than the estimates (65%) based on the GOS metagenome datasets (Venter *et al.* 2004, Rusch *et al.* 2007). Our numbers are inevitably incomplete because only a subset of PR genes could be amplified with the primers used. Therefore, they should be viewed as lower estimates of the actual contribution of PR bacteria to the total bacterial community. Our estimates are also lower than other qPCR analyses that found a PR gene in half of the bacteria in the Sargasso Sea, 23% in the North Atlantic (Campbell *et al.* 2008), and about 34% in the North Sea (Riedel *et al.* 2010). However, these data are not easily comparable because the coverage of qPCR primer sets are different between these studies. Nevertheless, they all estimated the relative abundance of SAR11 PR type by using the same primer set. Interestingly, we found that SAR11 PR estimates are similar in the Beaufort Sea and in the North Atlantic, and higher than in the North Sea, emphasizing the high contribution of this group to PR phototrophy in Arctic waters.

According to the quantitative abundance data, alphaproteobacterial PR genes accounted for 93% of the targeted PR community. PR genes most closely related to Candidatus *P. ubiquus* were the most abundant in the Beaufort Sea water column as well as in the Mackenzie-influenced stations. Earlier CARD-FISH experiments (Malmström *et al.* 2007, Alonso-Sáez *et al.* 2008) found that the SAR11 clade was present in large populations in Arctic waters (up to 30%), similarly to other marine environments (Morris *et al.* 2002). Recent studies using 454 pyrosequencing of 16S rRNA genes confirmed that the SAR11 clade predominate in diverse Arctic regions (Comeau *et al.* 2011, Bowman *et al.* 2012) and represent a consistent component in both summer and winter (Kirchman *et al.* 2010).

The third abundant PR group as quantified by qPCR (OTU1) is related to the HOT2C01 BAC clone generated from surface waters at the HOT station in the subtropical Central North Pacific Ocean (de la Torre *et al.* 2003). The relative abundance of another PR type closely related to HOT2C01 estimated by qPCR was highest in the western Sargasso Sea (22-33% of the total community) and decreased sharply in the North Atlantic until becoming undetectable above 60°N (Campbell *et al.*, 2008 ; Campbell, pers. comm.). We found that the proportions of OTU1 PR type remain from the North Pacific Ocean to the Beaufort Sea.

The libraries of PR genes and transcripts contained sequences related to known groups widely distributed in the oceans. However, it is apparent that OTU3, which was previously reported in coastal waters of the Chukchi and western Beaufort Seas (Cottrell et Kirchman 2009) seems restricted to high latitudes. Clones libraries and qPCR estimates indicate that OTU3 PR type is abundant in the epipelagic zone. It is remarkable that OTU3a subcluster constitutes proportions similar to those of the SAR11 PR type at several stations and outnumbered it in the productive waters of the Chukchi Sea, particularly in station ARC1. We previously showed that one phylotype of the *Roseobacter* group dominated in a *pufM* library from the same sample (Boeuf *et al.* 2013a). The simultaneous dominance of OTU3a PR type with *Roseobacter*-like bacteria suggests that both groups have same preferences to environmental and biological variables. The *Roseobacter* group is often found associated with algal blooms and is involved in processing plankton-derived organic matter (Moran *et al.* 2007). It is therefore likely that OTU3a PR type represents a bacterial group able to respond readily to phytoplankton bloom dynamics and can flourish in the Arctic when light is available. From our results, we can conclude that the subcluster 3a is a prominent and active component of the bacterioplankton in coastal Arctic waters.

Estimates of abundance based on PR gene frequency in the clone library were not consistent with their abundance as estimated by qPCR. Campbell *et al.* (2008) observed

deviations between the composition of alphaproteobacterial and flavobacterial PR amplicons and their qPCR estimates by using the same PCR primers. The most notable difference concerned *Gammaproteobacteria*-like OTUs 10 and 11 that could dominate in PR clone libraries while their quantitative estimates in the same samples were low. By inspecting the sequence templates of the PCR primer set in the limited number of strains whose genome is available yet, we found that preferential amplification of gammaproteobacterial sequences may explain these discrepancies although *Gammaproteobacteria* may be locally present in high proportions (Kirchman *et al.* 2010).

Proteorhodopsin gene expression

Reverse transcription polymerase chain reaction is not commonly used to study the expression of PR genes in the marine environment (Lami *et al.* 2009, Koh *et al.* 2010). Several studies have shown that numerically abundant organisms, including SAR11, are not necessarily the most active in marine environments (Alonso-Sáez *et al.* 2008, Campbell *et al.* 2008). The abundant alphaproteobacterial PR types were all presumably active at the time of sampling, suggesting that PR phototrophy is likely beneficial to them. Although we observed a substantial overlap between DNA and cDNA libraries, the relative abundance of PR types was sometimes different in the DNA and cDNA libraries, suggesting differential transcriptional activities among PR types. Given the large overlap between our DNA- and cDNA-derived libraries, we assume that further sequencing could potentially eliminate some of the observed differences in their composition. The overall conclusion is that a large fraction of the summer PR community is active in the euphotic waters of the Beaufort Sea.

The effects of light on PR expression may have a particular importance on the ecology of PR bacteria in high latitude environments characterized by continuous summer light, winter darkness and shading by seasonal ice cover. Laboratory experiments with growing

cultures and transcriptomic approaches with natural microbial populations have reported inconsistent observations, some suggesting constitutive PR expression (Giovannoni *et al.* 2005a, Riedel *et al.* 2010, Steindler *et al.* 2011), whereas others suggesting light regulation of PR expression (Gómez-Consarnau *et al.* 2007, Lami *et al.* 2009, Poretsky *et al.* 2009). Recently, Akram *et al.* (2013) showed that nutrient limitation had a strong effect in upregulating PR gene expression in vibrios. The latter study has important implications in the context of high-latitude environments. It could partly explain why PR-containing bacteria represent a consistent component in both summer and winter in the Arctic (Cottrell et Kirchman 2009), and are functional in the ice at low light intensities (Koh *et al.* 2010) as well as throughout the annual cycle in Antarctic waters (Williams *et al.* 2012a). Oligotrophic conditions as inducing factors of PR gene expression would be also consistent with the high proportions of active PR-bacteria we found in the Beaufort Sea.

Linking proteorhodopsin genes with environmental variables

The eight PR types whose abundance was examined here differed in their response to variable chlorophyll concentrations, nutrients, light, and salinity. The negative correlation between the abundance of SAR11-like PR bacteria and chlorophyll concentrations are consistent with earlier studies in diverse environments, including polar systems (Campbell *et al.* 2008, West *et al.* 2008, Ghiglione et Murray 2012, Williams *et al.* 2012b). Together with the inverse correlations between SAR11 PR abundance and POC and DON concentrations we found, this may mirror the oligotrophic strategy of SAR11 members. The Beaufort Sea was almost oligotrophic during the Malina cruise with low surface nitrate concentrations that limit heterotrophic bacterial growth (Ortega-Retuerta *et al.* 2012a). Nutrient-poor surface waters in the Beaufort Sea are the result of the strong vertical stratification caused by freshwater input from the Mackenzie River and sea ice melt water (Carmack et MacDonald 2002). It is

conceivable that energy gained by phototrophy may confer to these PR bacteria the capacity to better face the low-nutrient conditions. This hypothesis is supported by the observation that some PR bacteria survive energy starvation longer under light conditions (Gómez-Consarnau *et al.* 2010, Steindler *et al.* 2011).

In contrast to other PR types, relative abundance of OTU11 members was positively correlated with environmental parameters indicating that these organisms favored nutrient-rich waters and may be regulated by associations with phytoplankton. The strong positive correlations with energy availability in this group imply that these organisms may include many opportunistic, fast growing bacteria. This is in line with the fact that many members of the *Gammaproteobacteria*, and especially members of SAR92 cluster, have been described as copiotrophs (Glöckner *et al.* 1999).

The different responses of PR bacteria to environmental parameters mirror the high spatial variability in their abundance. In the Beaufort Sea, ice melt-induced stratification of the water column, terrestrial runoff, as well as localized and transient phytoplankton blooms and aggregation of particulate organic matter may contribute to seascape variability. Together, our results suggest that PR phototrophy may provides to oligotrophic and copiotrophic microorganisms thriving in adverse conditions a competitive advantage that help them to exploit this heterogeneity.

Conclusions

This diversity and qPCR analysis of PR sequence genes in marine waters of the Arctic Ocean generated novel insights into the composition and spatial distribution of PR-containing bacteria. The PR amplicons showed great spatial divergence in composition, and were frequently dominated by genes from taxonomically diverse organisms most of them being expressed at the time of sampling. Although the abundance of PR-containing bacteria is

highly variable between locations and depths, our results indicate that PR phototrophy may be a significant process contributing to the carbon cycle in the Arctic Ocean. The ecological mechanisms that underlie this variability and the energetic benefits of PR-based phototrophy in the world's oceans need to be elucidated.

Acknowledgements

This study was conducted as part of the Malina Scientific Program funded by ANR (Agence Nationale de la Recherche), INSU-CNRS (Institut National des Sciences de l'Univers – Centre National de la Recherche Scientifique), CNES (Centre National d'Etudes Spatiales) and ESA (European Space Agency). We thank all participants to the MALINA cruises for their help, especially M. Babin who coordinated the project, K. Lévesque for the logistics, and all *CCGS Amundsen* crew members. We warmly thank D. Doxaran, P. Raimbault, N. Garcia, and J. Ras for providing ancillary data. We are grateful to M. Perennou and G. Tanguy (Biogenouest Sequencing Platform-FR2424-Station Biologique) for help with sequencing. This work was supported by the ANR RHOME0 (ANR 11 BSV7 021 02), the European Union programs MicroB3 (UE-contract-287589) and MaCuMBA (FP7-KBBE-2012-6-311975). D. Boeuf was supported by a grant from the French Ministry of Higher Education and Research.

References

Aagaard K, Coachman L, Carmack E (1981). On the halocline of the Arctic Ocean. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers* **28**: 529-545.

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

Alonso-Sáez L, Sánchez O, Gasol JM, Balagué V, Pedrós-Alio C (2008). Winter-to-summer changes in the composition and single-cell activity of near-surface Arctic prokaryotes. *Environ Microbiol* **10**: 2444-2454.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W *et al* (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.

Atamna-Ismaeel N, Sabehi G, Sharon I, Witzel KP, Labrenz M, Jürgens K *et al* (2008). Widespread distribution of proteorhodopsins in freshwater and brackish ecosystems. *ISME J* **2**: 656-662.

Béjà O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP *et al* (2000). Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. *Science* **289**: 1902-1906.

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

Boeuf D, Cottrell MT, Kirchman D, Lebaron P, Jeanthon C (2013). Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean. *FEMS Microbiology Ecology* (*in press*).

Bowman JS, Rasmussen S, Blom N, Deming JW, Rysgaard S, Sicheritz-Ponten T (2012). Microbial community structure of Arctic multiyear sea ice and surface seawater by 454 sequencing of the 16S RNA gene. *ISME J* **6**: 11-20.

Brinkmeyer R, Knittel K, Jurgens J, Weyland H, Amann R, Helmke E (2003). Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6610.

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

Carmack EC, MacDonald RW (2002). Oceanography of the Canadian Shelf of the Beaufort Sea: a setting for marine life. *Arctic* **55**: 29-45.

Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen TJ (2005). A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol Lett* **8**: 148-159.

Cho JC, Giovannoni SJ (2004). Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 432-440.

Comeau AM, Li WKW, Tremblay JÉ, Carmack EC, Lovejoy C (2011). Arctic Ocean microbial community structure before and after the 2007 record sea ice minimum. *PLoS one* **6**: e27492.

Cottrell MT, Kirchman DL (2009). Photoheterotrophic microbes in the Arctic Ocean in summer and winter. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4958-4966.

de la Torre JR, Christianson LM, Bèjà O, Suzuki MT, Karl DM, Heidelberg J *et al* (2003). Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 12830-12835.

Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C *et al* (2012). Geneious v5.6. Available from <http://www.geneious.com>.

Dupont CL, Rusch DB, Yooseph S, Lombardo M-J, Alexander Richter R, Valas R *et al* (2012). Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage. *ISME J* **6**: 1186-1199.

Frias-Lopez J, Shi Y, Tyson GW, Coleman ML, Schuster SC, Chisholm SW *et al* (2008). Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 3805.

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

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

Galand PE, Lovejoy C, Pouliot J, Garneau ME, Vincent WF (2008). Microbial community diversity and heterotrophic production in a coastal Arctic ecosystem: A stamukhi lake and its source waters. *Limnol Oceanogr* **53**: 813-823.

Ghiglione J, Murray A (2012). Pronounced summer to winter differences and higher wintertime richness in coastal Antarctic marine bacterioplankton. *Environ Microbiol* **14**: 617-629.

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

Glöckner FO, Fuchs BM, Amann R (1999). Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3721-3726.

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

Gómez-Consarnau L, Akram N, Lindell K, Pedersen A, Neutze R, Milton DL *et al* (2010). Proteorhodopsin Phototrophy Promotes Survival of Marine Bacteria during Starvation. *PLoS Biol* **8**: e1000358.

González JM, Fernández-Gómez B, Fernández-Guerra A, Gómez-Consarnau L, Sánchez O, Coll-Lladó M *et al* (2008). Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine

bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (Flavobacteria). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 8724.

Grote J, Bayindirli C, Bergauer K, de Moraes PC, Chen H, D'Ambrosio L *et al* (2011). Draft genome sequence of strain HIMB100, a cultured representative of the SAR116 clade of marine *Alphaproteobacteria*. *Standards in genomic sciences* **5**: 269.

Kang I, Kang D, Oh H-M, Kim H, Kim H-J, Kang T-W *et al* (2011). Genome sequence of strain IMCC2047, a novel marine member of the Gammaproteobacteria. *J Bacteriol* **193**: 3688-3689.

Katoh K, Asimenos G, Toh H (2009). Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol Biol* **537**: 39-64.

Kirchman DL, Cottrell MT, Lovejoy C (2010). The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Environ Microbiol* **12**: 1132-1143.

Koh EY, Atamna-Ismaeel N, Martin A, Cowie ROM, Beja O, Davy SK *et al* (2010). Proteorhodopsin-bearing bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5918.

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

Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363-1371.

Malmström RR, Straza TRA, Cottrell MT, Kirchman DL (2007). Diversity, abundance, and biomass production of bacterial groups in the western Arctic Ocean. *Aquat Microb Ecol* **47**: 45-55.

Man D, Wang W, Sabehi G, Aravind L, Post AF, Massana R *et al* (2003). Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. *EMBO J* **22**: 1725-1731.

Marie D, Shi XL, Rigaut-Jalabert F, Vaulot D (2010). Use of flow cytometric sorting to better assess the diversity of small photosynthetic eukaryotes in the English Channel. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 165-178.

McCarren J, DeLong EF (2007). Proteorhodopsin photosystem gene clusters exhibit co-evolutionary trends and shared ancestry among diverse marine microbial phyla. *Environ Microbiol* **9**: 846-858.

Moran MA, Belas R, Schell MA, Gonzalez JM, Sun F, Sun S *et al* (2007). Ecological genomics of marine Roseobacters. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4559-4569.

Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA *et al* (2002). SAR 11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* **420**: 806-810.

Mullins TD, Britschgi TB, Krest RL, Giovannoni SJ (1995). Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol Oceanogr* **40**: 148-158.

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

Ortega-Retuerta E, Jeffrey W, Ghiglione J, Joux F (2012). Evidence of heterotrophic prokaryotic activity limitation by nitrogen in the Western Arctic Ocean during summer. *Polar Biol* **35**: 785-794.

Poretsky RS, Hewson I, Sun S, Allen AE, Zehr JP, Moran MA (2009). Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre. *Environ Microbiol* **11**: 1358-1375.

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

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.

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

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

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

Sabehi G, Kirkup BC, Rozenberg M, Stambler N, Polz MF, Beja O (2007). Adaptation and spectral tuning in divergent marine proteorhodopsins from the eastern Mediterranean and the Sargasso Seas. *ISME J* **1**: 48-55.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB *et al* (2009). Introducing Mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7537-7541.

Shannon CE (2001). A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review* **5**: 3-55.

Staley JT, Gosink JJ (1999). Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual reviews in Microbiology* **53**: 189-215.

Steindler L, Schwalbach MS, Smith DP, Chan F, Giovannoni SJ (2011). Energy Starved Candidatus *Pelagibacter Ubique* Substitutes Light-Mediated ATP Production for Endogenous Carbon Respiration. *PLoS one* **6**: e19725.

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

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

Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4605-4614.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.

Tremblay J-E, Gratton Y, Fauchot J, Price NM (2002). Climatic and oceanic forcing of new, net, and diatom production in the North Water. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **49**: 4927-4946.

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA *et al* (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.

West NJ, Obernosterer I, Zemb O, Lebaron P (2008). Major differences of bacterial diversity and activity inside and outside of a natural iron-fertilized phytoplankton bloom in the Southern Ocean. *Environ Microbiol* **10**: 738-756.

Williams TJ, Long E, Evans F, DeMaere MZ, Lauro FM, Raftery MJ *et al* (2012a). A metaproteomic assessment of winter and summer bacterioplankton from Antarctic Peninsula coastal surface waters. *ISME J* **6**: 1883-1900.

Williams TJ, Wilkins D, Long E, Evans F, DeMaere MZ, Raftery MJ *et al* (2012b). The role of planktonic *Flavobacteria* in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environ Microbiol*.

Yoshizawa S, Kawanabe A, Ito H, Kandori H, Kogure K (2012). Diversity and functional analysis of proteorhodopsin in marine *Flavobacteria*. *Environ Microbiol* **14**: 1240-1248.

Zhang D-C, Yu Y, Chen B, Wang H-X, Liu H-C, Dong X-Z *et al* (2006). *Glaciecola psychrophila* sp. nov., a novel psychrophilic bacterium isolated from the Arctic. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2867-2869.

Supplementary informations

Table S1. Summary of primers used in this study.

Experiment	Gene	Group	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Annealing temp (°C)	Amplicon length (bp)	Reference
t-RFLP	16S	<i>Bacteria</i>	27F 1492R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CGGTTACCTTGTTACGACTT	55	1465	(Lane 1991) (Weisburg <i>et al.</i> 1991)
PCR	16S	<i>Bacteria</i>	8F 1492R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CGGTTACCTTGTTACGACTT	55	1465	(Edwards <i>et al.</i> 1989) (Weisburg <i>et al.</i> 1991)
PCR	<i>PR</i>	PR-containing bacteria	PR-1aF PR-1aR	GATCGAGCGNTAYRTHGAYTGG* GATCGAGCRTADATNGCCCANCC	55	345	(Campbell <i>et al.</i> 2008) (Campbell <i>et al.</i> 2008)
qPCR	16S	<i>Bacteria</i>	BACT1369F PROK1492R	CGGTGAATACGTTTCYCGG GGWTACCTTGTTACGACTT	56	142	(Suzuki <i>et al.</i> 2000) (Suzuki <i>et al.</i> 2000)
qPCR	<i>PR</i>	SAR 11	125F 288R	THGGWGGATAYTTAGGWGAAGC CCCAACCWAYWGTWACRATCATTCT	59	155	(Campbell <i>et al.</i> 2008) (Campbell <i>et al.</i> 2008)
qPCR	<i>PR</i>	OTU 3a	PRS472F PRS567R	ATCGTAGGCATGGTAGGC CTTGACAGATTCTGGAGC	55	95	(Cottrell et Kirchman 2009) (Cottrell et Kirchman 2009)
qPCR	<i>PR</i>	OTU 3b	OTU3b-a14f OTU3b-b2r	CCTTCGTGCGATTACTGC CCAAGCGCTGATGTAGCC	57	112	This study This study
qPCR	<i>PR</i>	OTU 11	OTU11-f6 OTU11-r2	CTGTGCCGCTGCTAATGA TCCCAGATAATGAAGCCC	58	193	This study This study
qPCR	<i>PR</i>	OTU 9	OTU9-a1f OTU9-b14r	GGTGTGTTTTGGCGTTTG CTGCACATTGGCGTTTCC	62	189	This study This study
qPCR	<i>PR</i>	OTU 1	OTU1-a16f OTU1-b27r	GGAATGGCAGCTTGGTTA AAAGCAGTTTGTGCTGGG	48	98	This study This study
qPCR	<i>PR</i>	OTU 10	OTU10-f3 OTU10-r21	CCACTGCAGATTGTCGAG GATATAACAACCAACCGGC	56	180	This study This study
qPCR	<i>PR</i>	<i>Flavobacterium</i> sp.	Flavo-f6 Flavo-r2	GGGCTAAGCAGTCTTTGT TGTGTGCAGCAAGTGTGT	60	206	This study This study

* a typographical error exists in the original publication (R instead of bolded Y)

Table S2. Clone library comparison of seawater samples collected during the MALINA cruise in summer 2009.

Station	Depth (m)	Template type	Nb. of clones	Nb. of OTUs ^a	Coverage (%)	S _{Chao1} (LCI-UCI) ^b	H _{Shannon} (LCI-UCI)
PAC2	0m	DNA	32	9	94%	9.3 (9-14)	1.99 (1.75-2.22)
ARC1	0m	DNA	30	8	90%	9 (8-19)	1.58 (1.21-1.95)
170	3m	DNA	30	8	93%	8.3 (8-14)	1.83 (1.57-2.09)
	3m	cDNA	12	3	92%	3 (3-NA ^c)	0.72 (0.26-1.19)
	20m	cDNA	26	3	100%	3 (3-3)	0.69 (0.37-1)
320	3m	cDNA	39	10	85%	15 (11-39)	1.59 (1.24-1.95)
360	3m	DNA	31	8	87%	14 (9-46)	1.61 (1.27-1.95)
	3m	cDNA	39	12	90%	13.5 (12-24)	2.19 (1.93-2.45)
	50m	cDNA	36	6	100%	6 (6-6)	1.67 (1.5-1.84)
	50m	DNA	32	9	91%	10 (9-20)	1.83 (1.52-2.14)
398	0m	DNA	39	19	62%	54 (29-145)	2.37 (1.97-2.77)
620	3m	DNA	15	8	80%	8.6 (8-15)	1.97 (1.63-2.31)
	3m	cDNA	38	15	84%	17.5 (15-30)	2.35 (2.03-2.67)
	65m	cDNA	33	2	100%	2 (2-2)	0.23 (0-0.46)
	65m	DNA	28	7	93%	7.3 (7-13)	1.58 (1.26-1.9)
680	3m	cDNA	42	17	74%	35.3 (21-92)	2.36 (2.04-2.69)
	40m	cDNA	46	10	89%	20 (12-62)	1.83 (1.57-2.09)
	40m	DNA	9	6	56%	9 (6-29)	1.68 (1.21-2.15)
694	0m	DNA	60	24	73%	48 (31-105)	2.42 (2.05-2.78)

^a Operational taxonomic units (OTUs) were defined with MOTHUR assuming a 82% amino acid sequence similarity level.

^b LCI and UCI are the lower and upper bound of 95% confidence interval of the Chao1 and Shannon indexes, respectively.

^c NA, not applicable

Table S3. Relative abundances of PR sequence types (%) in the Beaufort Sea as quantified by qPCR (minimal value - maximal value) in surface seawater samples collected along the transect from Vancouver to Beaufort Sea. The estimates were normalized to 16S rRNA gene abundance.

Affiliation	Group targeted	Stations ^a					
		PAC1	PAC2	BER	ARC1	ARC2	BEA1
<i>Alphaproteobacteria</i>							
	SAR11	7.1	7.8	3.7	2.7	0.6	4.3
Arctic clade	OTU3a	-	2.4	0.4	36.7	3.8	1.2
Arctic clade	OTU3b	0.1	0.3	0.5	1.4	0.1	0.5
HOT2C01-related	OTU1	4.9	2.2	0.3	2.1	0.7	2.9
<i>Alphaproteobacteria</i>	Total	12.1	12.7	4.9	42.9	5.2	8.8
<i>Gammaproteobacteria</i>							
	SAR92	<0.1	0	0.4	0.7	<0.1	<0.1
	SAR92	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.14	<0.1
HTCC2999-related	OTU10	<0.1	0.1	<0.1	0.3	<0.1	0.11
<i>Gammaproteobacteria</i>	Total	<0.1	0.2	0.4	1.2	0.3	0.2
<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacterium</i> sp.	0	0	0	0	1.9	<0.1
	Total	12.2	12.8	5.3	44.1	7.4	9.1

^a Exact locations of the stations are shown in Fig. S1.

Table S4. Correlation between environmental parameters and abundance of total bacteria and PR-containing groups over the entire data set.

Variables	16S rDNA	all PR groups	<i>Alphaproteobacterial PR</i>			<i>Gammaproteobacterial PR^a</i>		<i>Flavobacterial PR</i>	
			SAR11	Arctic OTU 3b	group OTU 3a	HOT2C01 OTU 1	SAR92- OTU 11	HTCC2999 OTU 10	<i>Flavobacterium sp.</i>
Depth				- 0.452***	- 0.402***		- 0.235*		- 0.395**
Temperature					0.366**			- 0.242*	
Salinity								0.287*	- 0.302*
O ₂		0.348**	0.334**			0.246*			
cDOM		- 0.394**	- 0.378**	- 0.424***		- 0.239*		- 0.361**	- 0.274*
PAR	0.263*				0.266*				
NO ₃		- 0.406***	- 0.325**	- 0.364**	- 0.324**	- 0.316*	0.257*		- 0.241*
NH ₄	0.248*						0.323**		
PO ₄				- 0.319*	- 0.388**		0.266*		- 0.267*
Si(OH) ₄		- 0.456***	- 0.423***	- 0.361**	- 0.273*	- 0.286*	0.311*	- 0.233*	- 0.270*
POC	0.337**		- 0.280*		0.234*		0.304*		
DOC									
DON		- 0.286*	- 0.338**						
Total Chl _a	0.466***		- 0.253*				0.569***		

^aAbundance of OTU 9 did not correlate with any environmental parameter.

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$; Abbreviations: O₂: dissolved oxygen; cDOM: colored dissolved organic matter; PAR: photosynthetically active radiation; NO₃: nitrate; NH₄: ammonium; PO₄: phosphate; Si(OH)₄: silica; POC: particulate organic carbon; DOC: dissolved organic carbon; DON: dissolved organic nitrogen; total Chl_a: total chlorophyll *a*

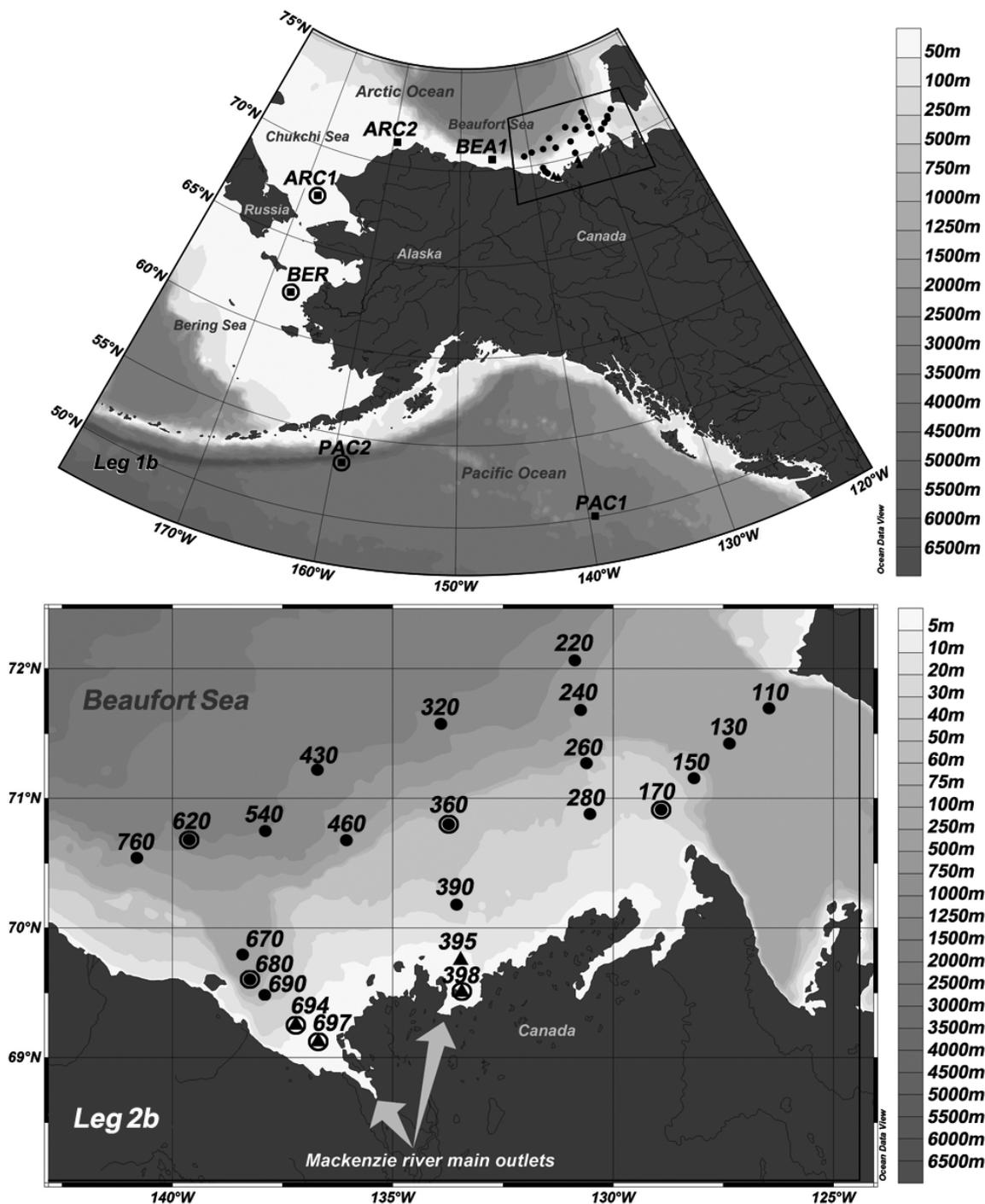


Fig. S1. Locations of stations sampled during legs 1b and 2b of MALINA cruise. Leg 1b stations (black squares) were sampled only at the surface; leg 2b stations were sampled at several depths (black dots) or only at the surface (black triangles). Circles indicate stations where PR gene libraries were constructed. Grey shades correspond to bottom depths.

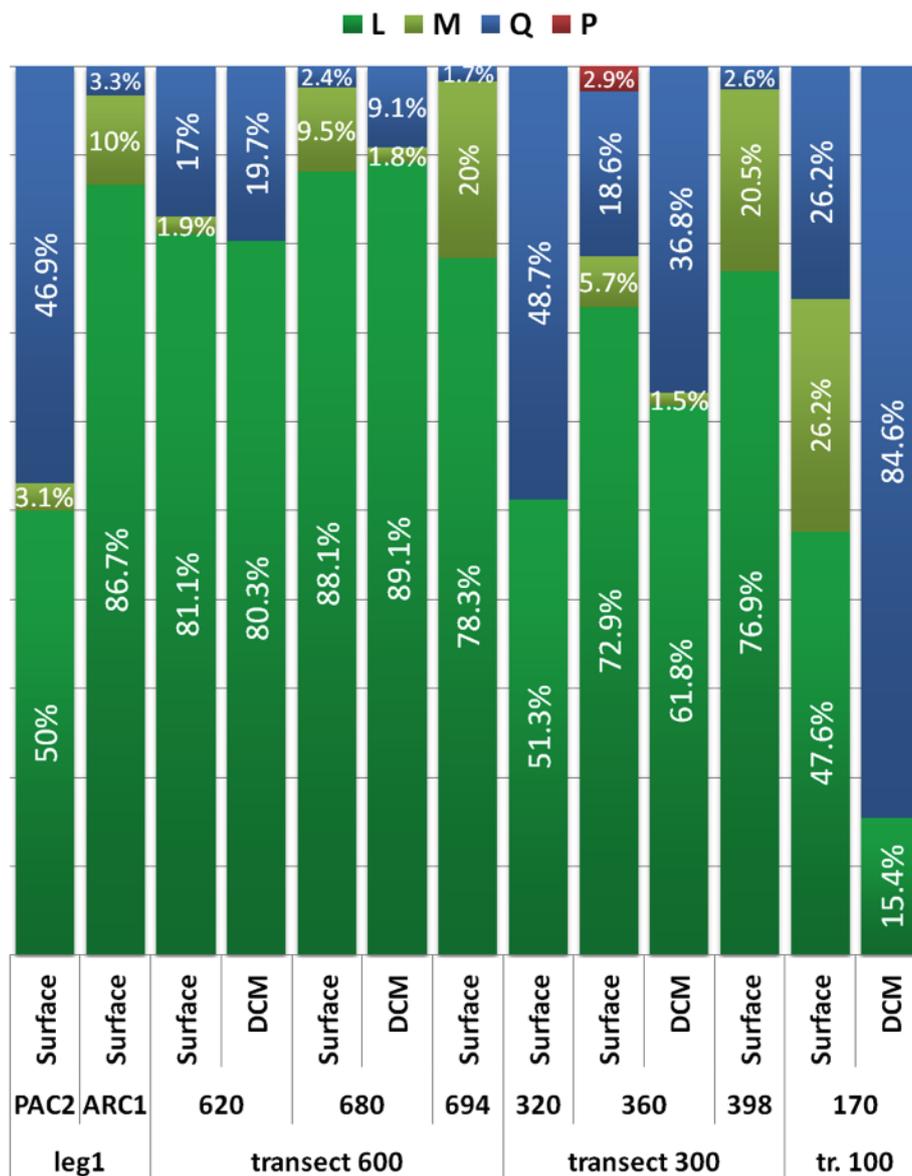


Fig. S2. Relative abundance of PR spectral variants in clone libraries. The numbers of clones (n) are indicated.

6.3. Epilogue

6.3.1. Résultats complémentaires

Mise en évidence d'une très forte disparité entre abondance dans les banques de clones et abondance absolue mesurée par PCRq

Notre étude est la première, à notre connaissance, à avoir quantifié par PCRq un nombre si important de clades de PR et tout particulièrement des clades appartenant aux *Gammaproteobacteria*. Nos banques de clones montrent une grande proportion de *Gammaproteobacteria* et en particulier d'un groupe proche des SAR92 qui totalise plus de 20% des séquences de PR obtenues. Toutefois, la quantification absolue par PCRq des 2 OTUs majoritaires de ce groupe (OTUs 9 et 11 représentant 71% des séquences de ce groupe) montre une contribution globale de 0,5 % de la communauté bactérienne totale. Ce constat est particulièrement frappant pour les groupes de Gammaproteobactéries mais il semble que ce soit également vrai pour le groupe d'*Alphaproteobacteria* B-PR appelé « Arctic ». En effet, les OTUs 3a et 3b, qui composent 40% du groupe « Arctic » soit près de 10% de la totalité des clones, ne représentent que 2,2% de la communauté bactérienne en PCRq. Une distorsion dans ce groupe était également déjà apparente dans l'étude de Cottrell et Kirchman (2009). Le groupe de PR SAR11-like n'évite pas cet écueil. En effet, peu présent dans les banques de clones construites à partir de l'ADN, il est pourtant trouvé très abondant en PCRq, dominant largement les communautés B-PR du plateau et au large. Dans les seules études qui se sont intéressées à la quantification absolue du gène de la PR (Figure 50 ; Campbell *et al.* (2008) et Riedel *et al.* (2010)) une telle distorsion entre abondance dans les banques de clones (Figure 50, b) et celle mesurée par PCRq (Figure 50, a) est visible, bien qu'elle soit moins marquée que dans notre étude. Ainsi, notre étude constitue une preuve évidente de la distorsion de la vue des prévalences par les banques de clones et souligne l'importance d'une quantification absolue dans l'évaluation de l'implication écologique d'un groupe bactérien. Il semble néanmoins que les tendances générales dans la biogéographie des groupes se dégagent dans les deux approches soient cohérentes aussi bien le long des gradients de surface que des profils de profondeur. L'exemple du groupe « Arctic » illustre bien ce propos avec des banques de clones et une quantification par PCRq qui montrent une régionalisation dans le plateau et une absence en profondeur. Les groupes de *Gammaproteobacteria* montrent également, par les deux techniques, une préférence pour les masses d'eaux plus profondes.

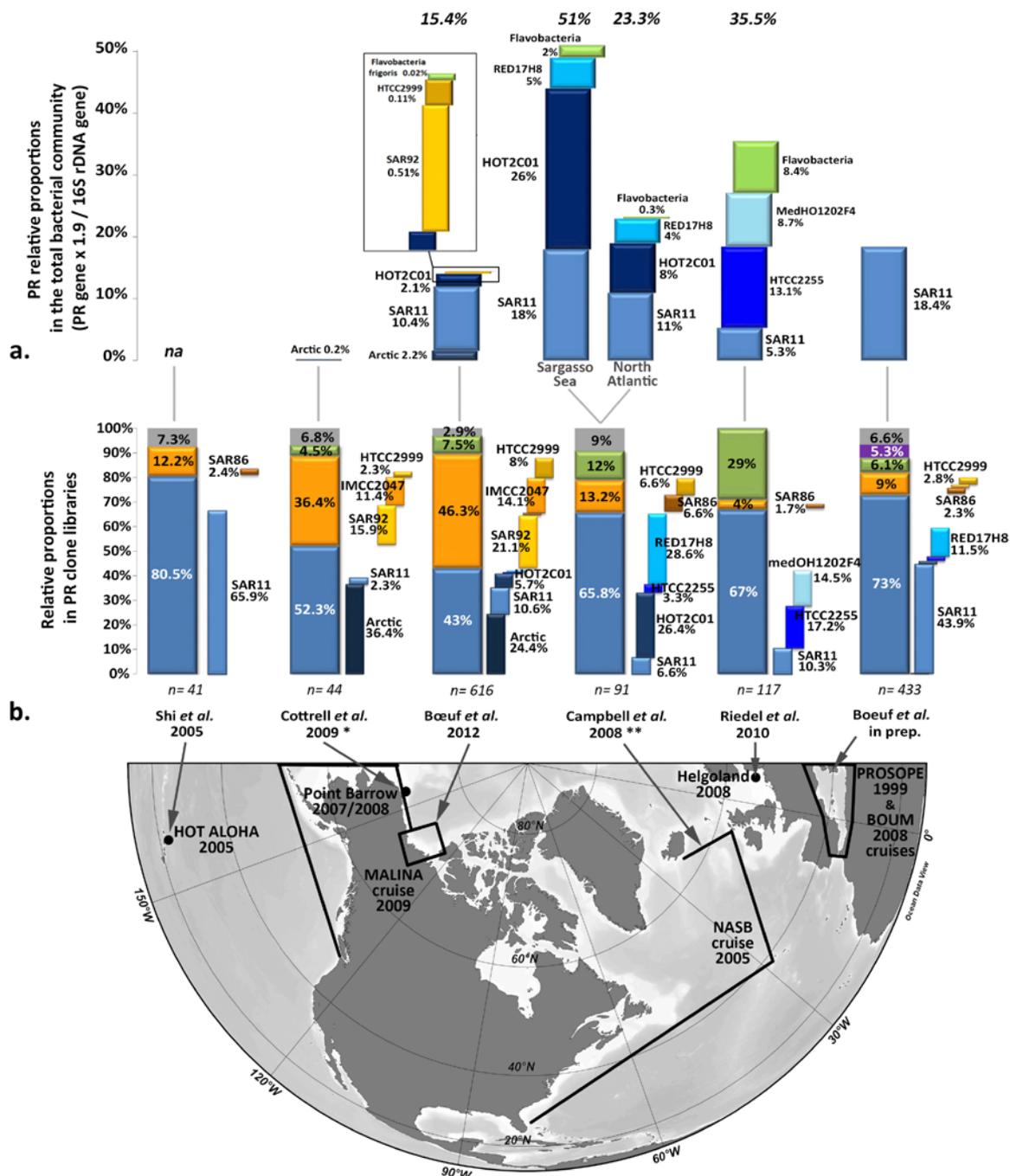


Figure 50. Abondances relatives des PRB dans l'hémisphère Nord. En variations de bleu, les groupes appartenant aux *Alphaproteobacteria*; en variations orange ceux appartenant aux *Gammaproteobacteria*; en vert ceux appartenant aux *Flavobacteria / Bacteroidetes*; en mauve ceux appartenant au groupe II des euryarchaea; en gris les groupes non affiliés. **a.** Proportions relatives des B-PR dans la communauté bactérienne totale obtenues par PCRq. Le nombre de copies de PR a été normalisé par celui de l'ARNr 16S et pondéré par 1,9. La contribution totale des B-PR quantifiée est indiquée au dessus. Le pourcentage de clones ciblés par la PCRq est d'environ 40% dans Boeuf *et al.* (2012) et Riedel *et al.* (2010), et de 70% dans Campbell *et al.* 2008. * Les quantifications obtenues dans Cottrell et Kirchman (2009) ont été normalisées par 1,9 pour être comparables aux autres jeux de données. **b.** Proportion relative de chaque taxon dans les bibliothèques de clones PR. Le nombre de clones séquencés est indiqué en dessous. * Compte tenu du grand nombre de groupes non affiliés dans cette étude (>20%), les clones ont été reclassés en accord avec notre phylogénie. ** Dans l'arbre phylogénétique de Campbell *et al.* (2008), la séquence appelée HTCC2255 apparaît 2 fois, en accord avec notre phylogénie, le groupe "*Alphaproteobacterium* HTCC2255 - NASB (6 clones)" a été réattribué à celui de la *Gammaproteobacteria* HTCC2999.

Le cas de la communauté des SAR11 et de la distribution de la PR en son sein

Les quantifications simultanées de l’abondance des gènes de l’ARNr 16S des bactéries totales, de l’ARNr 16S des SAR11 et de la PR des SAR11 permettent une analyse comparative de ce groupe dominant tant dans la communauté totale que dans la communauté B-PR le long d’une zone de transition. En accord avec leurs préférences oligotrophes, la contribution des SAR11 dans la communauté bactérienne totale (en bleu, Tableau IV et Figure 51) augmente en allant vers le large même si leur contribution (19%) n’est pas non plus négligeable dans les eaux riches

en carbone organique. En estimant à 1,9 le nombre moyen de copies d’ARNr 16S dans la communauté bactérienne totale (Campbell *et al.* 2008), les valeurs moyennes enregistrées au large sont proches de celles estimées par les méthodes de séquençage à haut débit c.-à-d. 31% au large dans le GOS (Biers *et al.* 2009), 40% dans le métagénome des Sargasses (Giovannoni et Stingl 2005), 37% dans l’ICoMM (Zinger *et al.* 2011), voir § 1.3.3). Elles sont toutefois nettement supérieures (environ le double) aux valeurs

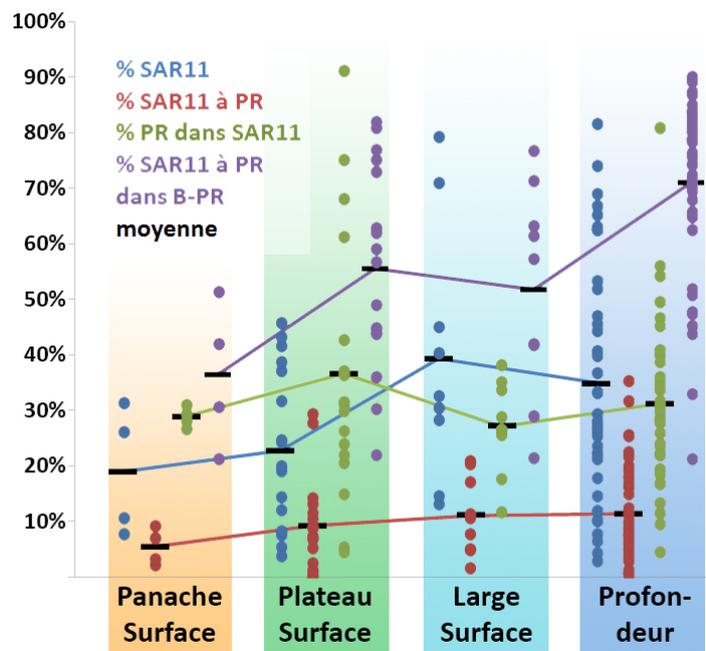


Figure 51. Vue graphique des contributions des SAR11 et des SAR11 à PR dans la communauté bactérienne, de la PR dans la communauté SAR11 et des SAR11 à PR dans la communauté B-PR en fonction des masses d’eau. Les points représentent les données, le tiret la moyenne et les droites les tendances.

Tableau IV. Contributions moyennes des SAR11 et des SAR11 à PR dans la communauté bactérienne, de la PR dans la communauté SAR11 et des SAR11 à PR dans la communauté B-PR en fonction des masses d’eau le long d’un fort gradient en carbone organique. Entre parenthèses, la valeur minimale et maximale.

	Masses d’eau				Total (n=71)
	Panache surface (n= 4)	Plateau surface (n= 17)	Large surface (n= 9)	Profondeur (n= 41)	
TOC (µM)	313,7 (199 - 462,5)	79 (66,2 - 135)	65,5 (60,6 - 112)	64,09 (52,6 - 101)	
% SAR11 ^a	18,9 (7,7 - 31,4)	22,7 (3,8 - 45,7)	39,4 (13,2 - 79,3)	34,9 (2,8 - 81,6)	31,7 (2,8 - 81,6)
% SAR11 à PR ^b	5,4 (2,2 - 9,2)	9,2 (0,2 - 29,4)	11,1 (1,6 - 21)	11,3 (0,4 - 35,3)	10,5 (0,2 - 35,3)
% PR dans SAR11 ^c	28,8 (26,7 - 31)	36,6 (4,4 - 91,1)	27,1 (11,7 - 38,2)	31,2 (4,4 - 80,9)	31,8 (4,4 - 91,1)
% SAR11 à PR dans B-PR ^d	36,4 (21,4 - 51,5)	55,6 (22,1 - 82)	51,7 (21,6 - 76,8)	71,1 (21,3 - 90,2)	63 (21,3 - 90,2)

^a SAR11-16S x 1,9/16S ; ^b SAR11-PR x 1,9/16S ; ^c SAR11-PR/SAR11-16S ; ^d SAR11-PR /totPR ; totPR : ensemble des gènes PR quantifiés

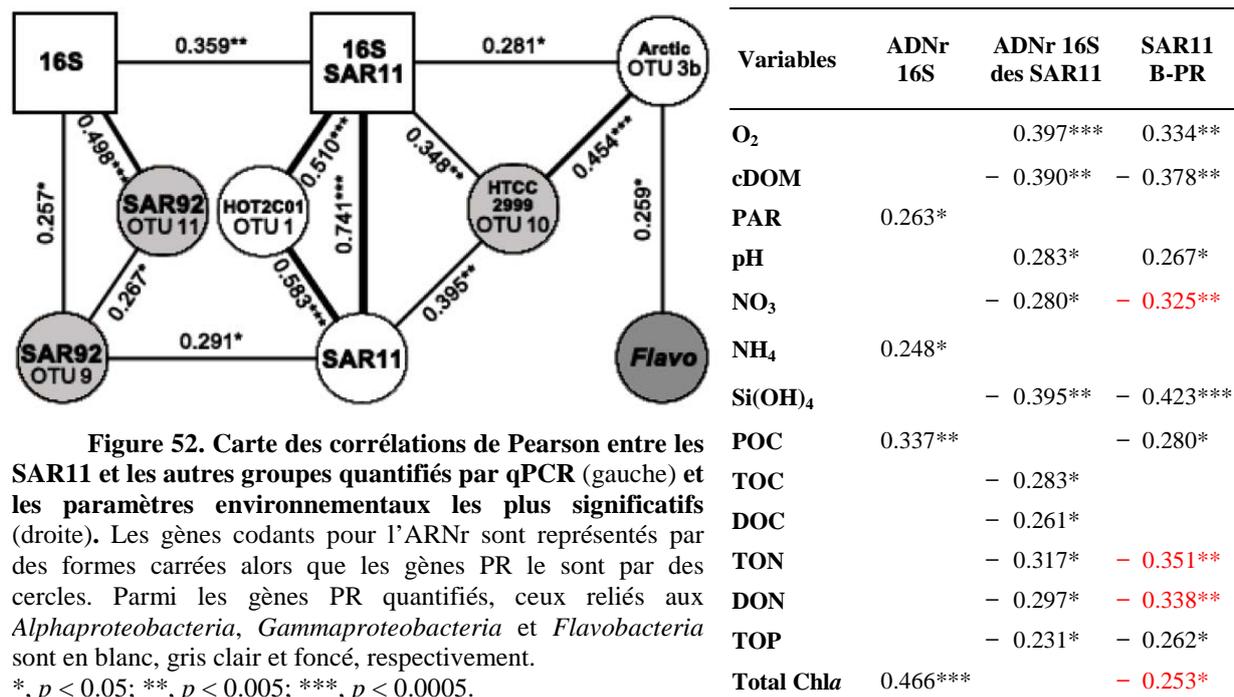


Figure 52. Carte des corrélations de Pearson entre les SAR11 et les autres groupes quantifiés par qPCR (gauche) et les paramètres environnementaux les plus significatifs (droite). Les gènes codants pour l'ARNr sont représentés par des formes carrées alors que les gènes PR le sont par des cercles. Parmi les gènes PR quantifiés, ceux reliés aux *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* et *Flavobacteria* sont en blanc, gris clair et foncé, respectivement. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$.

trouvées dans l'Atlantique Nord (des Sargasses à l'Islande) par Campbell *et al.* (2008) qui utilisaient la même technique et les mêmes amorces. Elles ne sont également pas en accord avec la moyenne de 14% trouvée dans le pyroséquençage mers des Tchouktches/Beaufort (Kirchman *et al.* 2010). En revanche, nos estimations sont proches de celles obtenues dans la fraction libre d'échantillons de la même campagne par pyroséquençage de la région V6 de l'ADNr 16S (Ortega-Retuerta *et al.* 2012c). En effet, ces auteurs ont estimé que les *Rickettsiales* (ordre auquel appartiennent les SAR11) constituaient 38,5% de la communauté bactérienne dans les eaux de surface au large et 20 % dans les eaux côtières. Les valeurs enregistrées présentent toutefois une grande variabilité (Figure 51) avec de faibles contributions (<10%) dans le plateau Est ou dans les eaux Pacifique sous-jacentes de la PML et de très fortes (>60%) au large entre 50 et 70m de profondeur avec un maximum de 81,6% de la communauté bactérienne (station 760 à 50m). En mer de Beaufort, la distribution des SAR11 est liée faiblement mais positivement à celle de la communauté totale (Figure 52, gauche) mais elle n'est pas contrainte par les mêmes facteurs environnementaux (Figure 52, droite). En effet, la distribution de la communauté totale semble très fortement liée à la communauté phytoplanctonique (Chl *a*) et au carbone organique particulaire provenant principalement du Mackenzie. Les SAR11 montrent au contraire des corrélations négatives avec les paramètres en lien avec le Mackenzie que ce soit la MO ou la MODc (marqueur de la couche néphéloïde, Matsuoka (2011)) ou avec la couche d'eau Pacifique sous-jacente de la

PML (dont les fortes teneurs en silicates sont un marqueur, Tremblay (2002)). Compte tenu des distributions observées, il semble que les SAR11 aient une prépondérance accrue dans la PML et en particulier à sa base dans les 50 à 70 m de profondeur au large. Ceci serait en accord avec une étude précédente conduite à travers tout l'océan arctique par Bano et Hollibaugh (2002) qui ont montré, par DGGE et banques de clones 16S, une présence constante du groupe SAR11 dans leurs échantillons de la PML.

La contribution des SAR11 à PR dans la communauté bactérienne totale suit la même tendance (en rouge, Tableau IV et Figure 51) mais en moindre mesure avec les moyennes les plus élevées (11%) au large sur toute la colonne d'eau. La valeur moyenne du large est en accord avec celle trouvée (11% [4% - 22%]) par Campbell *et al.* (2008) dans l'Atlantique Nord (les valeurs en mer des Sargasses sont plus élevées 18% [14% - 24%]). Dans la mer de Beaufort, les valeurs les plus élevées sont trouvées dans la PML vers 50m de profondeur. Les valeurs enregistrées en Arctique sont ponctuellement plus hautes que celles retrouvées dans l'Atlantique Nord avec un maximum de 35,3% de la communauté bactérienne. La communauté SAR11 et celle de SAR11 à PR sont fortement liées et les paramètres environnementaux contraignant leurs distributions sont globalement les mêmes bien que certains diffèrent (Figure 52). En effet, même si la distribution des SAR11 à PR est également inversement corrélée aux paramètres liés au Mackenzie ou au Pacifique, elle est en revanche opposée à la chlorophylle *a* et semble plus fortement opposé à l'azote organique et inorganique. Cette tendance est confirmée quand la contribution de la PR dans la communauté SAR11 est considérée (en vert, Tableau IV et Figure 51). Effectivement, si en moyenne 30% des SAR11 possèdent la PR quelque soit la masse d'eau considérée, la distribution du gène de la PR au sein de la communauté des SAR11 est très hétérogène spatialement (Figure 51). Ceci est particulièrement vrai en surface du plateau où les SAR11 à PR peuvent représenter de moins de 5% près de Cap Bathurst (Est) à plus de 90% des SAR11 dans le passage de l'Amundsen (extrême Est près de l'île Banks). Ces très hautes contributions suggèrent que la protéorhodopsine apporterait un avantage aux membres des SAR11 mais la distribution de la PR dans la communauté des SAR11 ne semble pas être liée à l'un des paramètres environnementaux mesurés pendant MALINA (aucune corrélation significative entre les paramètres environnementaux et la proportion de PR dans les SAR11). Compte tenu également de la biogéographie marquée des nombreux sous-clades SAR11 connue par ailleurs (Brown et Fuhrman 2005, Brown *et al.* 2012) ainsi que de la proximité géographiques des zones présentant d'extrêmement faibles et d'extrêmement fortes proportions de SAR11

portant la PR dans la communauté SAR11, cette distribution pourrait être plus lié à un aspect populationnel (un (ou des) sous-clades de SAR11 possédant la PR avec leur biogéographie propre) qu'à un contrôle par les paramètres environnementaux. Les SAR11 à PR représentent également une très forte composante de la communauté des bactéries à PR (en violet, Tableau IV et Figure 51). Leur proportion dans l'ensemble des groupes de B-PR quantifiés est comprise entre 21% et 90% et augmente vers le large (plus de 50% en moyenne) et avec la profondeur (plus de 70% en moyenne). Globalement elle compte pour environ 63% de la communauté à PR. La contribution des SAR11 à PR dans la communauté des B-PR augmente avec la salinité et le phosphate inorganique mais diminue

Variables	% SAR11 à PR dans B-PR
TEMP	-0.395 **
SAL	0.368 **
TIC	0.314 *
NH ₄	-0.283 *
PO ₄	0.358 **
POC	-0.397 **
PON	-0.283 *
POP	-0.256 *
TOC	-0.357 **
DOC	-0.310 *
TON	-0.322 **
DON	-0.258 *
TOP	-0.306 *
tChl <i>a</i>	-0.312 *

quand la température, le carbone organique (principalement particulaire) et l'azote organique augmentent (tableau ci-contre). Ceci pourrait être une évidence de l'apport privilégié de la PR aux SAR11 dans les processus de survie dans des eaux froides, salées et très limitées en ressources (oligotrophie) où les SAR11 à PR se développeraient de manière très compétitive probablement grâce à une synergie entre leur métabolisme particulier et l'apport de la PR.

Effets de la lumière et des concentrations en carbone sur la croissance des isolats B-PR arctiques

Pour tenter de comprendre quelles pourraient être les influences de la PR sur l'utilisation du carbone dans les conditions arctiques, nous avons suivi la croissance des souches isolées durant MALINA en les exposant à des cycles jour/nuit 16:8 dans des conditions lumineuses voisines de celles rencontrées dans la mer de Beaufort ($80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ou à l'obscurité complète. Pour contrôler le plus grand nombre de paramètres possibles et ne faire varier que la luminosité, nous avons utilisé un milieu synthétique préparé en une fois à partir d'eau milliQ dont la salinité a été ajustée avec du sel de mer (*Red Sea Salt*), les gammes de résistance à la salinité des souches ont été au préalable testées de 0 à 35 psu et la valeur commune de 25 a été retenue. Ce milieu synthétique a été enrichi avec du *Marine Broth 2216* dilué de façon à obtenir 24,2 mM de carbone disponible. Le milieu a été filtré sur $0,22 \mu\text{m}$ et autoclavé dans des bouteilles en verre préalablement lavées à l'acide. Les cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers avec un grand volume d'air disponible. Après plusieurs précultures dans les conditions d'expérimentation choisies (milieu, température, luminosité),

chaque souche testée, a été inoculée au 1/100 dans un volume de milieu réparti par la suite équitablement dans 2 erlenmeyers, l'un ayant été entouré de papier d'aluminium. Ceci avait pour but de démarrer avec un inoculum rigoureusement équivalent dans les 2 conditions de lumière. Les cultures ont été ensuite mises en agitation permanente à 150 rpm entre 4 et 5°C, sous contrôle permanent de la température (Figure 53). Un millilitre de culture a été prélevé par jour en conditions stériles puis fixé au glutaraldéhyde (0,25% final) pendant 30 min à température ambiante avant d'être congelé à l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'à analyse en cytométrie en flux (D. Marie).

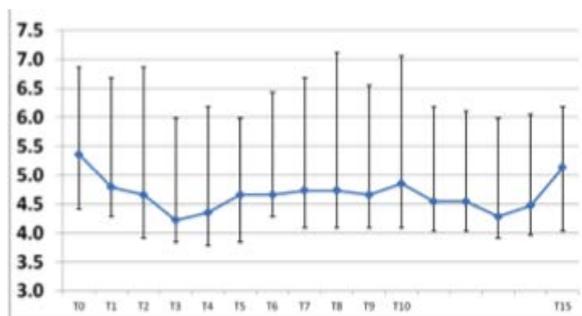


Figure 53. Montage expérimental de culture et suivi de la température moyenne durant l'expérience.

La croissance des huit souches de *Flavobacteriaceae* n'a pas été stimulée significativement par la lumière (Figure 54). Des résultats comparables ont été obtenus par Riedel *et al.* (2010) avec *Dokdonia* sp. PRO95, une *Flavobacteriaceae*, en utilisant la même concentration de carbone provenant également du *Marine Broth 2216*. De façon intéressante, les cultures ayant montré de légères différences de densités cellulaires (mais non significatives) en fin de phase exponentielle ou en phase stationnaire présentaient un niveau de coloration parfois très tranché (RCC 2387 et 2395) entre les conditions éclairées et à l'obscurité. La PR n'est probablement pas responsable de la coloration, cette différence visible traduit sans doute plus une expression des caroténoïdes en réponse à la lumière. Les caroténoïdes, de par leurs capacités à limiter la formation de ROS en absorbant le surplus de photons chez les organismes pratiquant la photosynthèse oxygénique ^{et/ou} à stabiliser la membrane par les nombreuses liaisons insaturées qu'ils possèdent, sont une réponse générique à un stress chez les bactéries (Armstrong 1997) en particulier chez les psychrophiles (Fong *et al.* 2001). Cependant la seule variable différente entre les deux conditions testées est la luminosité et cette dernière, assez basse, ne représente probablement pas un stress pour ces bactéries. Le rétinol étant le résultat d'un clivage central du β -carotène (coloré), la différence de coloration serait-elle le résultat d'une plus grande synthèse de ce

dernier afin d'augmenter le pool de rétinol ? Les gènes nécessaires à la synthèse du β -carotène (*crtEBIY*) et sa transformation en rétinol (*blh*) sont présents dans les génomes des B-PR appartenant aux *Flavobacteriaceae*, notamment chez *Polaribacter* sp. MED152 de laquelle RCC2387 est proche (González *et al.* 2008, Kwon *et al.* 2013). Cette hypothèse pourrait être en accord avec l'étude de Lami *et al.* (2009) qui a mis en évidence une forte sur-expression de la PR chez un clade de *Flavobacteriaceae* dans des mésocosmes en conditions illuminées.

Gómez-Consarnau *et al.* (2007) ont pu montrer un effet plus important de la lumière sur la croissance de *Dokdonia* sp. MED134 seulement avec des concentrations basses en carbone (en dessous de 1 mM). Nous avons réalisé un second suivi de croissance en utilisant des concentrations décroissantes en carbone organique disponible (242 ; 24,2 ; 2,42 ; 0,24 mM C et sans apport par le *MB2216*). Toutefois les réponses très hétérogènes obtenues ainsi que les phénotypes observés (comportement d'agrégation, adhésion et précipitation), suggèreraient que la limitation par le carbone n'est probablement pas la seule à influencer la différence de réponses en conditions éclairée et à l'obscurité pour les cultures de *Flavobacteriaceae* B-PR. Une étude très récente suggère que plus que la lumière, la limitation en nutriments induit l'expression différentielle de la PR chez *Vibrio* sp. AND4 (Akram *et al.* 2013). Des expériences plus poussées seront donc nécessaires pour comprendre quel est l'apport de la PR (et du β -carotène) dans l'utilisation de la MO, en fonction de la concentration des nutriments et de l'impact de l'intensité lumineuse sur cette dernière.

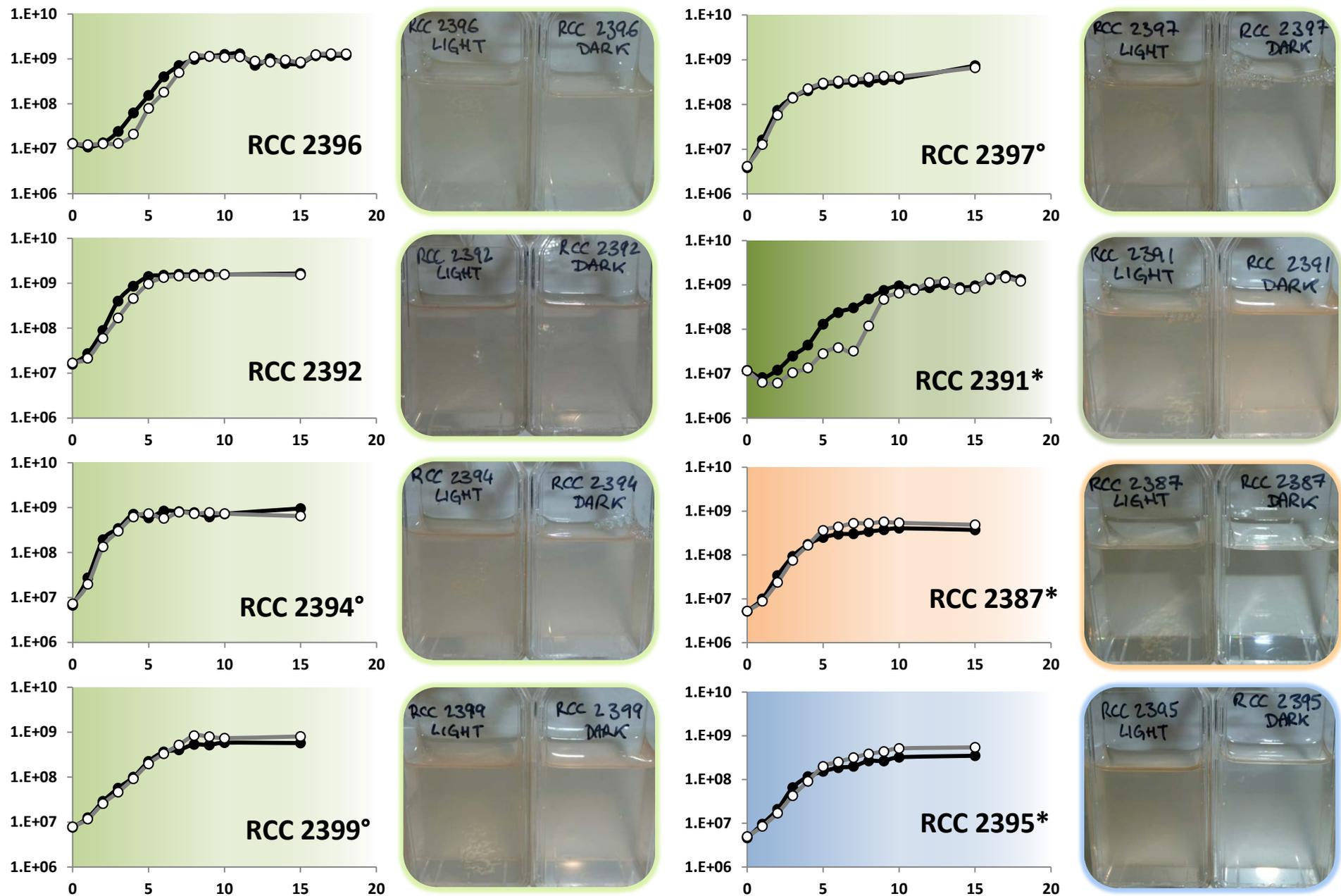


Figure 54. Courbes de croissance des isolats B-PR en conditions éclairées (cercle clair) et à l'obscurité permanente (cercle foncé). Abscisses : nombre de jour de croissance. Ordonnées : logarithme du nombre de cellules par ml. En vert clair : souches proches des *Flavobacterium*, vert foncé : des *Psychroflexus*, orange : des *Polaribacter*, bleu : des *Maribacter*. *: cultures dont la coloration entre lumière et obscurité à la fin de l'expérience présentaient de fortes différences ; °: des faibles différences.

Tableaux complémentaires d'information sur les OTUs retrouvées dans cette étude.

Tableau V. Affiliation phylogénétique et numéros d'accension des OTUs retrouvées dans les banques de clones PR et caractéristiques générales de leurs proches parents obtenus par BLASTp. Les variants verts et bleus de la PR sont représentés par les couleurs correspondantes ; L = Leucine, M = Methionine, Q = Glutamine and P = Proline.

OTU	Light tuning	type	nb of clones	Clone ID	Accession number	Phylogenetic affiliation	Closest relative in GenBank	Identity (%)	Habitat of closest relative	Accession number	
OTU-01	Q	both	35	130	JX863105	α -Proteobacteria	clone US080221	99%	Pacific Ocean	ACQ57522	
OTU-02	Q	DNA	42	078	JX863115	γ -Proteobacteria	gamma proteobacterium IMCC2047	77.80%	Korean Yellow sea	ZP_08649070	
OTU-03a	L	both	117	20	313	JX863122	α -Proteobacteria	clone PR_707_07_03	99%	Arctic Ocean	ACM79455
OTU-03b	L	both		34	163	JX863226	α -Proteobacteria	clone E400058	100%	Bering sea	ABO27736
OTU-03c	L	both		44	476	JX863136	α -Proteobacteria	clone PR_108_08_07	99%	Arctic Ocean	ACM79436
OTU-03d	L	both		19	413	JX863140	α -Proteobacteria	clone PR_707_07_24	99%	Arctic Ocean	ACM79473
OTU-04	L	both		17	344	JX863143	α -Proteobacteria	clone 11	100%	North Atlantic Ocean	ACO90115
OTU-05	L+P	both	27	325	JX863239	γ -Proteobacteria	clone PR_707_07_18	100%	Arctic Ocean	ACM79467	
OTU-06	M	DNA	3	382	JX863147	Bacteroidetes	clone GH-C-1B31	76%	Antarctic sea ice	ADB27772	
OTU-07	L	both	17	293	JX863242	γ -Proteobacteria	clone PR_108_08_11	100%	Arctic Ocean	ACM79440	
OTU-08	L	both	14	429	JX863149	γ -Proteobacteria	clone medHO1-20-C6	69%	Mediterranean sea	ABA90798	
OTU-09	L	both	13	478	JX863160	γ -Proteobacteria	clone PR_108_08_24	73.70%	Arctic Ocean	ACM79453	
OTU-10	Q	both	38	376	JX863163	γ -Proteobacteria	clone 03	100%	N. Atlantic Ocean	ACO90147	
OTU-11	L	both	60	150	JX863254	γ -Proteobacteria	clone PR_108_08_24	99%	Arctic Ocean	ACM79453	
OTU-12	M	DNA	1	079	JX863172	Flavobacteria	clone NASB_31	76%	Sargasso sea	ABU49455	
OTU-13	Q	DNA	2	164	JX863173	δ -Proteobacteria	clone S-S114a-0-B12	83.80%	Sargasso sea	ABA90938	
OTU-14	L	DNA	4	096	JX863175	γ -Proteobacteria	clone medHO1-20-C6	73.70%	Mediterranean sea	ABA90798	
OTU-15	L	DNA	1	107	JX863178	Undetermined	clone Dec08_aaa01c07_1m	63.50%	Kinneret Lake, Israel	AEF58091	
OTU-16	L	both	13	346	JX863264	α -Proteobacteria	clone PR_108_08_19	100%	Arctic Ocean	ACM79448	
OTU-17	L	both	6	294	JX863268	γ -Proteobacteria	clone PR_108_08_11	84.80%	Arctic Ocean	ACM79440	
OTU-18	M	DNA	2	421	JX863180	Flavobacteria	clone PR_108_08_01	100%	Arctic Ocean	ACM79430	

OTU-19	L+Q	both	37	315	JX863270	α -Proteobacteria	clone PR_108_08_17	99%	Arctic Ocean	ACM79446
OTU-20	L	both	9	279	JX863285	γ -Proteobacteria	clone GH-C-6B20	96%	Antarctic sea ice	ADB27798
OTU-21	L	DNA	1	242	JX863183	β -Proteobacteria	clone P-see-3D	98%	Plussee Lake, Germany	ACB55065
OTU-22	M	DNA	2	276	JX863184	Bacteroidetes	clone June09_Df03_10m	99%	Kinneret Lake, Israel	AEF57901
OTU-23	L	DNA	1	246	JX863185	β -Proteobacteria	clone Superior.CD1.PR.E1	99%	Superior Lake, USA	ACN42797
OTU-24	M	DNA	3	270	JX863186	Bacteroidetes	clone PS350-13	95.90%	Damariscotta Lake, USA	ABY61805
OTU-25	M	both	7	369	JX863286	Bacteroidetes	clone HO15-4	92%	China sea	ACQ57577
OTU-26	L	DNA	2	433	JX863189	α -Proteobacteria	clone PR_108_08_22	99%	Arctic Ocean	ACM79451
OTU-27	L	both	5	328	JX863288	γ -Proteobacteria	clone PR_108_08_06	99%	Arctic Ocean	ACM79435
OTU-28	M	DNA	1	303	JX863191	Flavobacteria	<i>Krokinobacter</i> sp. 4H-3-7-5	84.70%	Japan sea sediment	YP_004431469
OTU-29	L	DNA	4	384	JX863193	α -Proteobacteria	clone 40	100%	North Atlantic Ocean	ACO90174
OTU-30	M	DNA	3	325	JX863195	Flavobacteria	clone TNB_B_3M15	83.70%	Antarctic sea ice	ADB27803
OTU-31	Q	DNA	5	349	JX863196	α -Proteobacteria	clone E400012	100%	Bering sea	ABO27718
OTU-32	L	DNA	2	362	JX863198	γ -Proteobacteria	clone PR_108_08_24	71.70%	Arctic Ocean	ACM79453
OTU-33	Q	DNA	2	348	JX863199	γ -Proteobacteria	clone 32	100%	North Atlantic Ocean	ACO90169
OTU-34	M	DNA	1	366	JX863201	Flavobacteria	clone HEL59	74.40%	North sea	ACN22385
OTU-35	Q	DNA	2	379	JX863202	Undetermined	clone S-S114a-80-C1	97%	Sargasso sea	ABA90500
OTU-36	Q	RNA	22	008	JX863290	γ -Proteobacteria	clone S-S114a-80-E12	65.70%	Sargasso sea	ABA90514
OTU-37	M	RNA	9	080	JX863299	Flavobacteria	Flavobacteria bacterium MS024-2A	95%	Boothbay harbor, USA	ZP_03702117
OTU-38	L	RNA	1	107	JX863300	γ -Proteobacteria	clone PR_108_08_24	76.80%	Arctic Ocean	ACM79453
OTU-39	Q	RNA	1	115	JX863301	α -Proteobacteria	clone med-tb04-20m-h2	90.90%	Mediterranean sea	ABD85005
OTU-40	Q	RNA	9	154	JX863302	γ -Proteobacteria	clone med-tb04-0m-h2	82.80%	Mediterranean sea	ABD84912
OTU-41	L	both	25	358	JX863310	α -Proteobacteria	<i>C. Pelagibacter ubique</i> HTCC1062	100%	Sargasso sea	YP_266049
OTU-42	L	RNA	5	142	JX863311	γ -Proteobacteria	clone med-20m-c2	74.70%	Mediterranean sea	ABD84564
OTU-43	L	RNA	1	165	JX863313	β -Proteobacteria	clone Superior.CD1.PR.C1	85.60%	Superior Lake, USA	ACN42795
OTU-44	M	RNA	4	195	JX863315	Flavobacteria	<i>Dokdonia donghaensis</i> MED134	89.80%	Mediterranean Sea	ZP_01049273
OTU-45	L	RNA	2	200	JX863318	γ -Proteobacteria	clone TNB_B_65_30	94.90%	Antarctic sea ice	ADB27789
OTU-46	Q	RNA	1	188	JX863319	γ -Proteobacteria	clone s-s114a-0-2	65.30%	Sargasso sea	ABA90927

OTU-47	L	RNA	2	337	JX863320	γ -Proteobacteria	clone PR_108_08_18	85%	Arctic Ocean	ACM79447
OTU-48	L	RNA	2	257	JX863321	α -Proteobacteria	clone 12	96%	North Atlantic Ocean	ACO90154
OTU-49	L	RNA	1	260	JX863322	α -Proteobacteria	clone US120211	93.90%	Pacific Ocean	ACQ57539
OTU-50	L	RNA	2	266	JX863324	Undetermined	clone med-0m-c5	91.80%	Mediterranean sea	ABD84466
OTU-51	L	both	4	473	JX863203	γ -Proteobacteria	clone PR_108_08_23	100%	Arctic Ocean	ACM79452
OTU-52	M	RNA	2	342	JX863327	Flavobacteria	clone PR_108_08_01	87.80%	Arctic Ocean	ACM79430
OTU-53	L	RNA	1	272	JX863328	Undetermined	clone MedHO1-0-2-D4	89.90%	Mediterranean sea	ABA90571
OTU-54	L	RNA	1	318	JX863329	Undetermined	clone 04	98%	North Atlantic Ocean	ACO90110
OTU-55	M	RNA	1	334	JX863330	Bacteroidetes	clone US80225	75.80%	Pacific Ocean	ACQ57524
OTU-56	L	RNA	1	350	JX863331	Undetermined	clone E400019	98%	Bering sea	ABO27721
OTU-57	L	RNA	1	357	JX863332	γ -Proteobacteria	clone med-20m-b12	90.80%	Mediterranean sea	ABD84551
OTU-58	M	both	2	417	JX863204	Bacteroidetes	clone xd110	84.70%	China sea	ACQ57563
OTU-59	L	DNA	1	384	JX863205	Undetermined	clone 21	86.60%	North Atlantic Ocean	ACO90162
OTU-60	M	DNA	2	414	JX863207	Bacteroidetes	clone AT06036	79.80%	Atlantic Ocean	ABJ98286
OTU-61	L	DNA	2	403	JX863208	α -Proteobacteria	clone medHO1-0-F1	85.90%	Mediterranean sea	ABA90661
OTU-62	Q	DNA	1	405	JX863209	Undetermined	clone NASB_58	92.90%	Sargasso sea	ABU49514
OTU-63	L	DNA	2	427	JX863210	β -Proteobacteria	clone Erie.ST84.PR.F1	100%	Erie Lake, USA	ACN42833
OTU-64	M	DNA	1	422	JX863211	Bacteroidetes	clone 17	81.70%	North Atlantic Ocean	ACO90120
OTU-65	M	DNA	1	432	JX863212	Bacteroidetes	clone June09_Db11_5m	81.60%	Kinneret Lake, Israel	AEF58313
OTU-66	M	DNA	1	435	JX863213	Bacteroidetes	clone HO15-4	77%	China sea	ACQ57577
OTU-67a	L	DNA	1	436	JX863214	β -Proteobacteria	clone kin_6m_Jan07A	98%	Kinneret Lake, Israel	ACB55080
OTU-67b	L	DNA	1	467	JX863215	β -Proteobacteria	clone G_see_7B	99%	Grosser Ploner See Lake, Ge	ACB55106
OTU-68	L	DNA	1	452	JX863216	β -Proteobacteria	clone Superior.CD1.PR.A1	95.90%	Superior Lake, USA	ACN42793
OTU-69	L	DNA	1	453	JX863217	β -Proteobacteria	clone PS350-31	89.80%	Damariscotta Lake, USA	ABY61814
OTU-70	L	DNA	1	475	JX863218	α -Proteobacteria	clone E400005	100%	Bering sea	ABO27713
OTU-71	L	DNA	1	479	JX863219	α -Proteobacteria	clone medHO1-0-F1	90.90%	Mediterranean sea	ABA90661
OTU-72	L	DNA	1	480	JX863220	α -Proteobacteria	clone June09_De04_10m	89.90%	Kinneret Lake, Israel	AEF57899

Communauté présente vs. communauté active

La diversité bactérienne en Arctique a principalement été évaluée sur la base de l'ADN (pyroséquençage ou études classiques, voir § 3.3.2) ce qui a permis de déterminer quels sont les groupes bactériens présents mais ne donne pas d'indices forts sur l'activité de ces derniers ni sur l'expression de leurs potentialités génétiques dans ces eaux (mises à part les gènes ménagers, tout gène n'est pas forcément exprimé dans toutes les conditions environnementales rencontrées). Ceci est autant plus critique pour un système secondaire comme la phototrophie chez des organismes hétérotrophes. Pour évaluer si les bactéries présentes exprimaient leurs systèmes phototrophes, nous avons comparé les diversités issues de l'ADN et de l'ADNc. L'analyse globale des OTUs obtenues (Tableau V) par diagramme de Venn (Figure 55) montre que la plupart des OTUs regroupant le plus de séquences exprime activement la PR. Les OTUs constituées uniquement de séquences d'ARN, si ce n'est une distorsion due aux techniques employées, pourraient constituer des groupes de faible abondance mais actifs. Plus de la moitié du jeu de données est constitué d'OTUs actives et si seulement les OTUs contenant au moins 2 séquences sont considérés, près de 70% des OTUs sont actives.

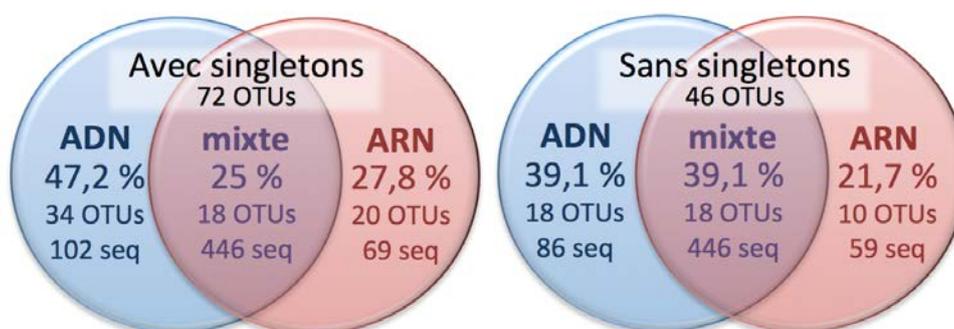


Figure 55. Diagramme de Venn des OTUs constituées de séquences d'ADN, d'ARN ou des deux avec ou sans les OTUs constituées d'une seule séquence (singletons).

6.3.2. *Evolutions possibles dans un contexte de réchauffement global*

Les relations entre les abondances des populations de B-PR et les paramètres biotiques et abiotiques recueillis par les autres participants de la campagne MALINA ont été analysées à l'aide d'outils statistiques. Il ressort que la communauté B-PR n'est pas corrélée aux mêmes paramètres que la communauté procaryotique totale suggérant que les B-PR ont une réponse

spécifique et probablement différente vis-à-vis de la matière organique. Les SAR11 à PR, dominant la communauté des B-PR, montrent de nettes préférences oligotrophes avec une distribution inféodée à la PML. Dans une optique de l'approfondissement de cette masse d'eau et de la limitation des échanges de nutriments provenant des couches inférieures ainsi que de l'augmentation de l'aire de l'océan hauturier libre de glace, la niche écologique de ces derniers pourrait s'étendre. Au contraire, d'autres groupes, dominants dans le plateau du Mackenzie comme un groupe visiblement endémique d'*Alphaproteobacteria* (« Arctic »), de même qu'un groupe de *Gammaproteobacteria* proche du groupe SAR92 montrent quant à eux des relations moins tranchées vis-à-vis du carbone organique ou inorganique et semblent lié à la production phytoplanctonique. Ces groupes pourraient donc augmenter d'importance dans un contexte d'augmentation des exports de carbone et de plus fréquents évènements d'efflorescence du phytoplancton. Compte tenu des capacités de survie accrue apportée par la PR à certaines bactéries (Gómez-Consarnau *et al.* 2010), il est imaginable que l'importance de la PR permette l'expansion des groupes la possédant dans les eaux nouvellement libres de glace.

DISCUSSION GÉNÉRALE

DISCUSSION GÉNÉRALE	236
<i>Des communautés contrastées, des distributions opposées</i>	<i>237</i>
<i>Une biogéographie marquée</i>	<i>238</i>
<i>La synergie entre température et salinité limite-t-elle les photosystèmes ?.....</i>	<i>241</i>
<i>Importance des solutés compatibles dans l'écologie des photohétérotrophes</i>	<i>243</i>
<i>Un apport différentiel de la photohétérotrophie, augmenter la résistance au large</i>	<i>244</i>
<i>Un apport différentiel de la photohétérotrophie, améliorer la nutrition en côtier ...</i>	<i>248</i>
<i>Un apport différentiel de la photohétérotrophie, le cas des efflorescences.....</i>	<i>251</i>
<i>Photohétérotrophie en Arctique et changement climatique</i>	<i>252</i>

Des communautés contrastées, des distributions opposées

Les deux volets de cette étude ont pu mettre en évidence des communautés photohétérotrophes très diversifiées dont la distribution est très divergente. La distribution des BPAA est très fortement influencée par les apports fluviaux alors que celle des B-PR montre à l'inverse une forte influence océanique. La luminosité disponible (PAR) ne semble structurer à elle seule ni les BPAA, ni les B-PR suggérant la dominance du métabolisme hétérotrophe chez les micro-organismes photohétérotrophes en mer de Beaufort. Alors que la distribution de la communauté bactérienne totale est influencée par la communauté phytoplanctonique (Chl *a*) et le COP, seule la communauté BPAA suit ces tendances. Toutefois, contrairement à la distribution de la communauté bactérienne totale, celle des BPAA est régie principalement par la matière organique (essentiellement particulaire). Celle des B-PR, dont les grands traits sont dessinés par la distribution du groupe SAR11, montre en revanche une nette opposition à la MO et n'est pas influencée positivement par un paramètre environnemental particulier. L'ensemble de ces observations et les travaux de Lauro *et al.* (2009) et Yooseph *et al.* (2010) suggèrent que la communauté photohétérotrophe en mer de Beaufort pourrait être caricaturalement séparée en copiotrophes et oligotrophes. Les BPAA dominantes auraient tendance à avoir un caractère copiotrophe et les B-PR dominantes un

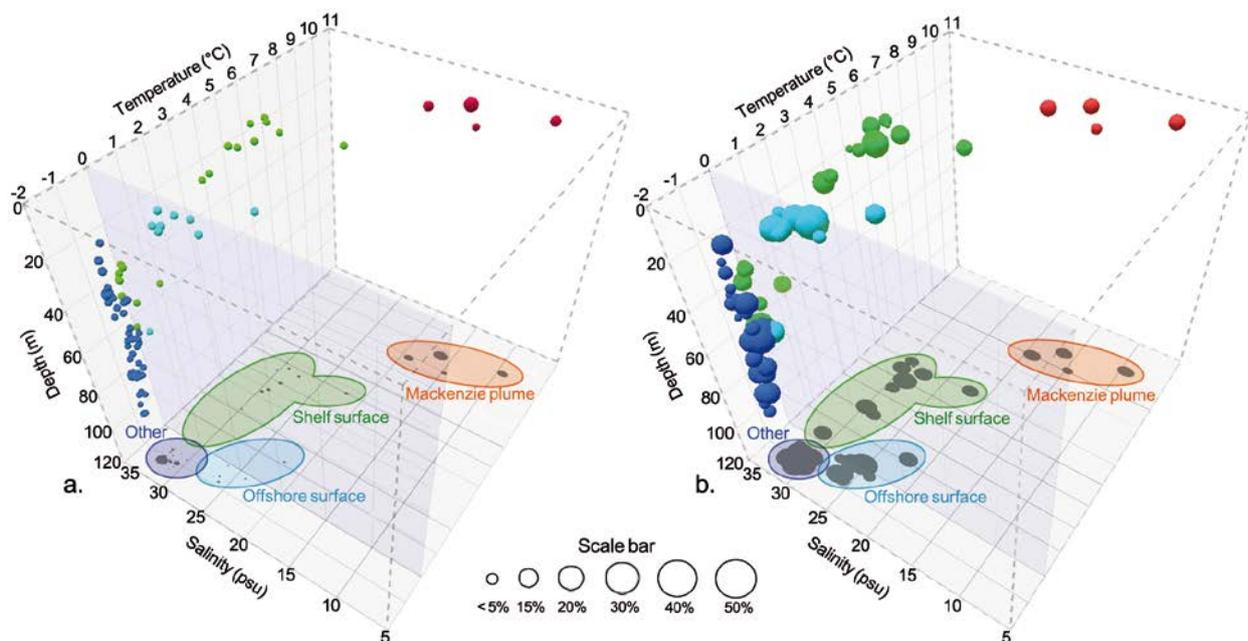


Figure 56. Abondances relatives dans le bactérioplancton de la communauté BPAA (a) et B-PR (b) en fonction des masses d'eau dans la mer de Beaufort. Les masses d'eau ont été discriminées en fonction de leurs paramètres de Température et Salinité. En orange, l'estuaire du Mackenzie (chaud et dessalé) ; les eaux de surface (>50m) du plateau continental en vert et au large en bleu clair ; en bleu foncé les eaux sous-jacentes que ce soit dans le plateau ou au large.

caractère oligotrophe. L'écologie des groupes phylogénétiques auxquels appartiennent les membres dominants de chaque communauté (*Betaproteobacteria* et *Rhodobacterales* pour les BPAA et SAR11 (α) et IMCC2047 (γ) pour les B-PR) semble en cohérence avec ces traits écologiques. Toutefois, cette vision très réductrice doit être pondérée car contrairement à la communauté BPAA dont l'abondance diminue fortement de l'estuaire au large, la communauté B-PR (la totalité des membres quantifiés) montre une présence moyenne importante dans le plateau continental ou au large mais également dans l'estuaire (~15 % du bactérioplancton) (Figure 56) et des membres de cette communauté montrent des préférences pour les environnements plus riches. De même, les *Rhodobacterales* forment un groupe dont l'écologie est très variable (Christie-Oleza *et al.* 2012) et les représentants BPAA de ce groupe sont suspectés d'être des généralistes capables également d'être compétitifs dans les zones oligotrophes (Wagner-Döbler et Biebl 2006).

Une biogéographie marquée

En mer de Beaufort, la communauté B-PR (72 OTUs ; diversité moyenne de Shannon⁶⁷ de 1,9) est plus diversifiée que la communauté BPAA (43 OTUs ; diversité moyenne de Shannon de 1,3) et ses membres montrent un net changement d'abondance en fonction de la zone considérée (Figure 57). Les SAR11 B-PR (clairement oligotrophes) montrent une nette répartition océanique alors que d'autres groupes, moins abondants ont des répartitions à tendance plus côtières comme le groupe arctique (OTU 3) et à HOT2C01 ou encore les *Gammaproteobacteria* proches des SAR92. Les populations de BPAA montrent également une biogéographie marquée avec des *Betaproteobacteria* dominantes dans l'océan côtier et les *Rhodobacterales* (dont la majorité pratique la tactique *feast and famine*) au large. Des familles de BPAA aux métabolismes particuliers comme les *Rhizobiales* et les *Sphingomonadales* sont également présentes, plus en profondeur. Toutefois, en comparant les diversités obtenues chez les BPAA et B-PR avec la communauté bactérienne totale arctique (Figure 58), des traits intrigants ressortent. En effet, alors qu'il a été montré qu'une variante de la PR, l'actinorhodopsine, est présente chez de nombreuses *Actinobacteria* en milieu lacustre ou estuarien (Sharma *et al.* 2008, 2009), et que ce groupe bactérien est trouvé en proportion non négligeable dans toute la mer de Beaufort (Figure 58), aucune AR n'ont pu être détectées

⁶⁷ En ne prenant en compte que les 8 banques d'ADN communes aux deux communautés.

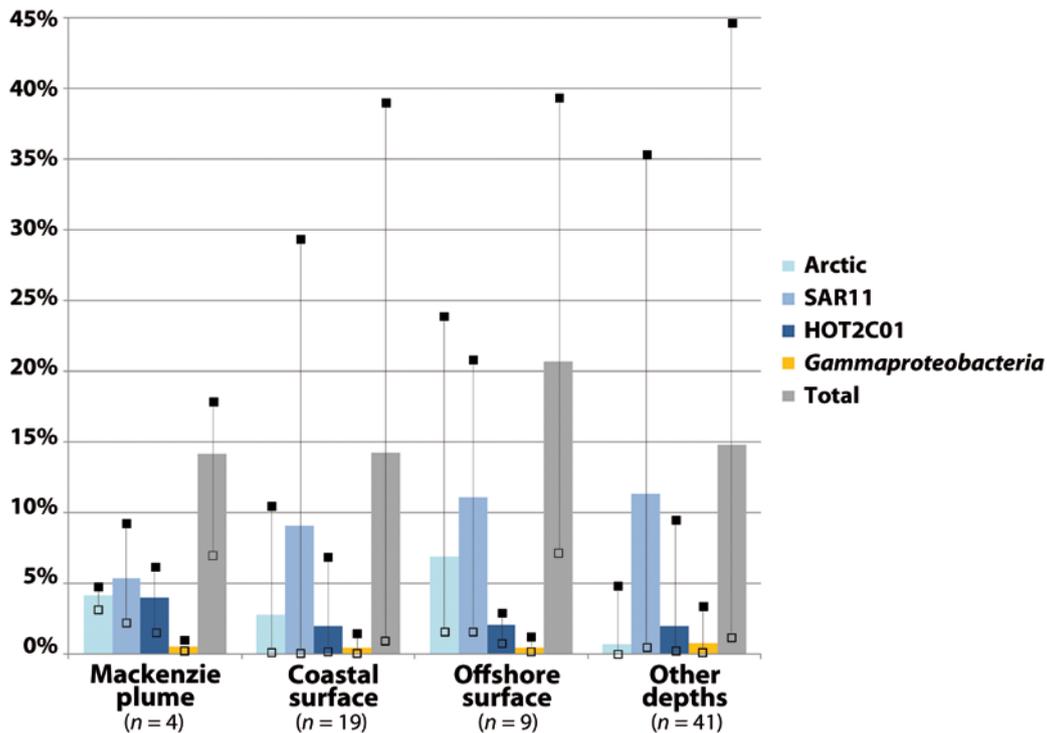


Figure 57. Abondances relatives moyennes des groupes B-PR majoritaires dans le bactérioplancton quantifiées par qPCR en fonction des masses d'eau. En variation de bleu les groupes d'*Alphaproteobacteria*. Les carrés remplis représentent les valeurs les plus hautes mesurées ; les vides, les plus basses.

dans notre étude, même en utilisant des amorces spécifiques. De surcroît, peu de clades à signature purement dulçaquicole ont pu être détectés dans notre étude (uniquement des singletons dont la distribution était limitée à la proche embouchure), il semble donc que la communauté B-PR arctique soit peu influencée par les apports de populations allochtones fluviales contrairement aux BPAA. D'autres disparités apparaissent en comparant la communauté photohétérotrophe arctique de celles trouvées à plus basses latitudes. En effet, alors que les membres appartenant aux *Gammaproteobacteria* sont importants dans les communautés BPAA en milieu oligotrophe (Hu *et al.* 2006, Lehours *et al.* 2010), le phylogroupe *pu/M* majoritaire de cette classe (K) n'a été retrouvé dans notre étude que dans le Pacifique Nord et disparaît au-delà de la mer de Béring. Ce trait en particulier est très intrigant. Pourquoi les groupes de BPAA retrouvés à plus basses latitudes dans des eaux oligotrophes, ne sont-ils pas présents en Arctique alors que la classe à laquelle ils appartiennent, les *Gammaproteobacteria*, représentent une classe importante (~30% de la communauté) dans les eaux des mers de Beaufort et des Tchouktches (Kirchman *et al.* 2010) et constituent une grande partie de la diversité chez les B-PR ?

Dans une même perspective, pourquoi des groupes majeurs dans d'autres océans comme les picocyanobactéries ne sont-ils pas présents dans l'Océan Arctique ? En effet, lors de

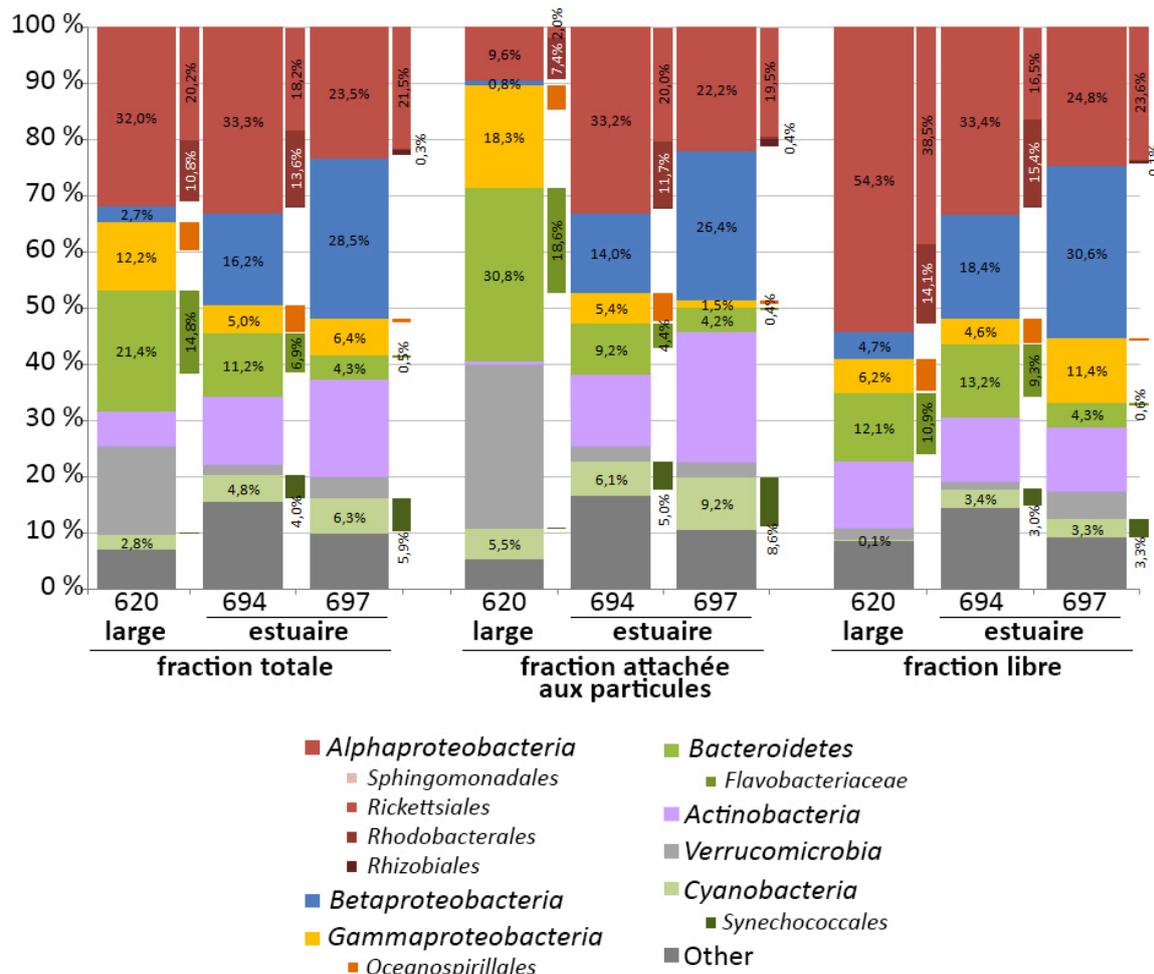


Figure 58. Abondance de la communauté bactérienne totale libre et attachée aux particules (> 3 μm) obtenue par pyroséquençage de la région V6 du 16S (400 bp). La « fraction totale » représente la somme de la fraction libre et de la fraction attachée mais n'est pas une filtration supplémentaire. D'après Ortega-Retuerta *et al.* (2012c).

MALINA, les données de cytométrie (D. Marie, *pers.comm.*), d'HPLC (Chlorophylle *a* et *b*, Zéaxanthine ; M. Ras, *pers.comm.*) ainsi que de pyroséquençage (Ortega-Retuerta *et al.* 2012c) montrent que les *Synechococcales* sont restreintes à la proximité des embouchures du Mackenzie. Ces résultats sont en accord avec ceux de Waleron *et al.* (2007) qui ont exploré spécifiquement les *Cyanobacteria* dans le même système lors de la campagne CASES. Ces auteurs ont montré de plus fortes abondances en picocyanobactéries dans l'embouchure du Mackenzie avec une diminution très forte dans le plateau mais également leur persistance en très faible densité au large. Les clades de *Synechococcus* trouvés à plus basses latitudes dans le Pacifique ou en Atlantique ne persistent pas en Arctique (Zwirgmaier *et al.* 2008, Huang *et al.* 2012) et seuls des clades montrant des préférences d'eaux saumâtres (Chen *et al.* 2006) semblent présents. Les tendances observées dans les communautés de BPAA montrent une étonnante similarité avec ces résultats. Les données concernant l'abondance ou la diversité des BPAA en milieu dulçaquicole arctique sont aujourd'hui

inexistantes, toutefois les observations faites dans notre étude suggèrent que les BPAA d'eaux douces / saumâtres peuvent représenter une fraction importante tant numériquement qu'en termes de diversité, au moins dans le fleuve Mackenzie. Cette hypothèse est renforcé par d'autres études conduites dans des estuaires se trouvant à moyennes latitudes comme l'embouchure du fleuve Delaware, la baie de Chesapeake (Waidner et Kirchman 2007) ou des systèmes saumâtres comme la mer Baltique (Salka *et al.* 2008) où les proportions de BPAA sont importantes dans les zones dessalées. L'ensemble de ces observations communes soulèvent une question cruciale : pourquoi les bactéries phototrophes possédant un photosystème (PSI et II pour les picocyanobactéries et PufLMH pour les BPAA) sont peu présentes dans les eaux arctiques du large et limitées à la proximité des côtes alors que les bactéries possédant des systèmes phototrophes plus simples, comme les B-PR, ne semblent pas affectées ?

La synergie entre température et salinité limite-t-elle les photosystèmes ?

En Arctique, alors que les picocyanobactéries coccales sont quasi-absentes en mer, elles représentent en revanche un membre très important du picophytoplancton en milieu dulçaquicole pouvant atteindre de très fortes abondances (Vincent *et al.* 2000). Bien que les eaux marines arctiques soient en permanence froides, contrairement aux eaux douces pouvant être de quelques degrés plus chaudes en fonction de la saison, il semblerait que plus que la température, une combinaison des effets de paramètres physico-chimiques pourrait expliquer la limitation de ces organismes. Allakhverdiev *et al.* (2002) ont démontré les effets synergiques du stress lumineux, augmentant le photodommage de la sous-unité D1, et du stress salin, limitant les mécanismes

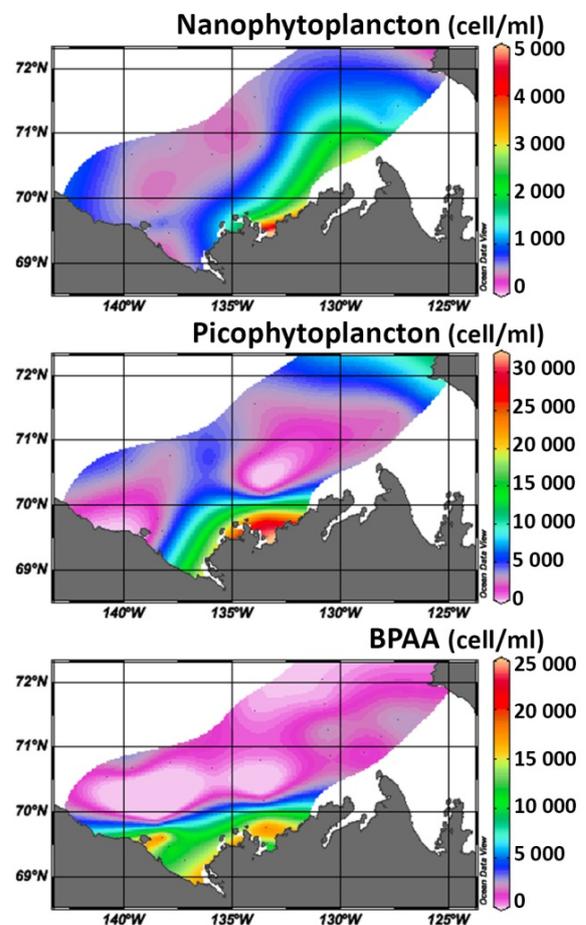


Figure 59. Interpolation des abondances des communautés Nanophytoplankton, Picophytoplankton et BPAA en surface lors de MALINA.

de réparation de la même sous-unité (inhibition de la protéolyse de D1 et sa synthèse *de novo*). Ils entraîneraient une inactivation du PSII chez la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803, plus rapide que lorsque chaque paramètre est considéré individuellement. En mer de Beaufort, il semble qu'une synergie des effets de la salinité et des températures basses puisse limiter le fonctionnement des photosystèmes et par là, la distribution des picocyanobactéries et des BPAA. Nous avons montré que ces deux paramètres physiques influençaient significativement la distribution des BPAA dans ce système. Toutefois, quand les autres membres du phytoplancton sont pris en compte, une action directe et uniquement sur le fonctionnement des photosystèmes semble peu probable. En effet, Balzano *et al.* (2012b) ont mis en évidence, lors de MALINA, une communauté eucaryote nanophytoplanctonique diversifiée composée principalement de diatomées (principalement des *Chaetoceros*) et une communauté picophytoplanctonique presque exclusivement composée d'un clade endémique de *Micromonas pusilla*. D'après l'analyse des distributions de ces communautés par cytométrie en flux (Figure 59), il semblerait que plus la taille des organismes possédant des photosystèmes est importante, plus leur distribution s'étend dans le plateau et plus les communautés eucaryotes sont diversifiées. En corolaire, plus les organismes photosynthétiques sont petits, plus ils semblent être limités par les conditions environnementales sans qu'il soit possible toutefois d'établir un lien direct clair entre taille et distribution. De plus, de nombreuses études reportent la présence en grande quantité d'eucaryotes unicellulaires photosynthétiques (comme les diatomés) à travers tout l'Arctique (voir § 3.3.2). Les bases structurelles comme les traits écologiques permettant d'expliquer la différence de répartition entre organismes photosynthétiques procaryotes et eucaryotes sont encore méconnues et très peu explorées expérimentalement. Les photosystèmes et systèmes de réparation entre eucaryotes et procaryotes photosynthétiques étant très conservés, d'autres structures et processus que ces derniers doivent être impliqués pour expliquer cette différence de distribution. Très variable dans sa composition entre procaryote et eucaryote, la membrane est l'un des compartiments cellulaires des plus fortement affectés par le froid et potentiellement la salinité et qui a un impact direct sur le système phototrophe. En effet, le photosystème est compris dans la membrane cellulaire chez les BPAA, dans une membrane spécialisée (thylacoïde) chez les picocyanobactéries, dans un organite cytoplasmique (chloroplaste) protégé par 2 membranes (cellulaire et chloroplastique) chez les picoeucaryotes auxquelles s'ajoute souvent une paroi rigide (thèque) chez les nanoeucaryotes (de silice, de carbonate de calcium ou de cellulose). Le nombre et la composition des diverses membranes

pourraient jouer un rôle dans la résistance aux basses températures et aux variations de salinité ainsi que sur le fonctionnement des photosystèmes. En effet, la fluidité de la membrane est essentielle chez les photoautotrophes. Elle influence l'efficacité de la photosynthèse à basses températures qui repose sur le repliement et la disposition corrects des différentes sous-unités des complexes protéiques associées à la membrane formant la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques. La fluidité est particulièrement cruciale pour le transport intramembranaire des électrons *via* notamment le pool de quinones ainsi que pour la diffusion des gaz (comme le CO₂ ou l'O₂). Elle peut également intervenir dans la récupération du PSII suite à la photoinhibition subit à chaque cycle photonique, un processus très limitant pour la photosynthèse en conditions froides. En effet, la photoinhibition du PSII est amplifiée en conditions stressantes comme des variations de température par la limitation des cycles de réparation de la protéine clé D1 dont l'assemblage est dépendant du degré de désaturation des acides gras (Takahashi et Murata 2008).

Importance des solutés compatibles dans l'écologie des photohétérotrophes

Les capacités des organismes à générer ^{et/ou} à récupérer de l'environnement des solutés compatibles (comme les cryoprotectants) jouent sans doute également un rôle. Chez les eucaryotes, probablement de par leurs génomes plus importants, la gamme de solutés compatibles pouvant être synthétisées ainsi que les voies d'incorporation de ces derniers sont plus variées (Welsh 2000). Il semble cependant que les plus efficaces et polyvalents des solutés compatibles que sont le tréhalose et la glycine bêtaïne soient synthétisés ou incorporés par les bactéries comme certaines cyanobactéries (Welsh 2000) dont des *Synechococcus* marines (recherche de transporteurs ou de synthases spécifiques à la glycine bêtaïne et tréhalose dans la base Cyanorak ; <http://www.sb-roscoff.fr/cyanorak/>). Les eucaryotes photosynthétiques, qu'ils appartiennent aux communautés pélagiques (phytoplancton) ou attachées (fixées à la glace de mer) peuvent produire en abondance du diméthylsulfoniopropionate (DMSP) comme soluté compatible. Cette substance est produite en abondance particulièrement chez les espèces formant des efflorescences comme les *Haptophyceae* ou les *Dinophyceae* et pourrait jouer le rôle d'osmorégulateur mais également de répulsif de brouteur. Elle est libérée dans le milieu en grande quantité en particulier dans la phase de déclin des efflorescences. Une fois libre, le DMSP peut servir aux autres membres de la communauté microbienne pélagique comme soluté compatible (cryo- ou osmo-protectant) mais il peut également représenter une source importante d'énergie et de carbone

(mais également de soufre), tout comme d'autres solutés compatibles comme la glycine bêtaïne (GBT), analogue azoté du DMSP (pouvant représenter une ressource en azote). Cette dualité de fonction du DMSP et de la GBT peut revêtir une grande importance particulièrement pour le bactérioplancton arctique qui subit, notamment au large, des conditions drastiques de température et de pauvreté en nutriments (oligotrophie). Cela peut expliquer en partie la diversité et la distribution des groupes de photohétérotrophes. En effet, les *Rhodobacterales*, constituant la moitié de la diversité de BPAA dans notre étude, sont un groupe connus pour leur capacité à assimiler le DMSP et pour leur importance dans le cycle du soufre (Malmström *et al.* 2004b, Moran *et al.* 2007) et des DMSP lyases sont observées notamment chez les genres *Loktanella* et *Sulfitobacter* (Curson *et al.* 2008), genres auxquelles appartiennent toutes les souches BPAA isolées dans notre étude. De même des membres des SAR11 et des *Synechococcus* ont été identifiés comme des participants cruciaux de l'incorporation de DMSP dans l'Atlantique Nord (Malmström *et al.* 2004a, 2005). Très récemment, le séquençage de Candidatus *Pelagibacter* sp. IMCC9063, une SAR11 isolée dans l'océan arctique norvégien, a révélé que cette souche, possédait une PR ainsi qu'un système de transporteur de glycine bêtaïne comme beaucoup de *Pelagibacter* trouvés à plus basses latitudes (Oh *et al.* 2011a). Bien que l'incorporation de ces solutés compatibles soit moins coûteuse que leur synthèse *de novo*, la photohétérotrophie pourrait tout de même intervenir dans le transport actif (demandant donc de l'ATP) de ces composés et représenter un avantage pour les organismes la pratiquant dans un environnement où l'économie d'énergie est cruciale tout comme la présence intracellulaire de solutés compatibles.

Un apport différentiel de la photohétérotrophie, augmenter la résistance au large

Les *Rhodobacterales* BPAA et les SAR11 B-PR sont dominantes au large de la mer de Beaufort. Toutefois, la quantification absolue ne laisse que peu de doute sur la faible abondance des *Rhodobacterales* BPAA au large. De même, si on estime l'abondance absolue des SAR11 B-PR (Figure 60), il apparaît qu'elles y sont en plus faible abondance que dans le plateau continental. Tous les groupes de B-PR dont nous avons mesuré l'abondance par PCRq suivent la même tendance. De plus, nous avons montré d'une part que la PR est activement exprimée au large et d'autre part que la diversité des bactéries possédant la PR est grande en Arctique. Ces résultats suggèrent que la photohétérotrophie apporte un réel avantage pour la survie et le maintien des populations dans les eaux froides (<0°C), salées (~30 psu) et oligotrophes du large. Comme suggéré par Fuhrman *et al.* (2008) et Giovannoni *et al.*

(2005a), le rôle de la PR dans les environnements oligotrophes permettrait d'augmenter le succès écologique à long terme des groupes la possédant en augmentant la durée de survie pendant les périodes de carence. Dans notre cas, ce concept pourrait également s'étendre aux *Rhodobacterales* BPAA, groupe pratiquant le *feast and famine*, pour lesquelles l'apport de la photohétérotrophie rallongerait la durée de résistance aux carences en attendant les apports importants de MO (et possiblement de DMSP) que fournissent les efflorescences algales printanières ou estivales. Le fait que malgré l'effort conséquent d'isolement, les genres *Sulfitobacter* et *Loktanella* dominent exclusivement les cultures réalisées sur un milieu contenant de faibles concentrations en carbone mais enrichi en DMSP pourrait aller dans le sens de l'hypothèse précédente, tout comme le fait que nous n'avons réussi à isoler des BPAA qu'en surface des stations du large.

Cependant, l'avantage apporté par la photohétérotrophie aux groupes du large ne leur permet pas d'augmenter leur nombre de manière très conséquente, en d'autres termes, l'avantage apporté par la photohétérotrophie au large n'est probablement pas assez important pour rendre les bactéries la pratiquant nettement plus compétitives (phénomène possiblement responsable de la difficulté à mettre en évidence le bénéfice écologique de la PR). Napolitano *et al.* (2005) ont montré que le niveau d'ATP contenu dans les psychrophiles est plus élevé que dans les méso- et thermophiles. Ces auteurs avancent que cela pourrait constituer une stratégie compensatoire pour maintenir les processus biochimiques à basse température (déplacement thermodynamique des réactions) et dans notre cas, contribuer à la survie dans les conditions rudes du large. Dans cette étude, cette balance plus favorable entre production et consommation d'ATP serait basée sur une adaptation des protéines clés dans le métabolisme des adénylates comme l'ATP synthase ou l'AMP phosphatase/désaminase. Selon les structures proposées au paragraphe 2.1.3, la photohétérotrophie pourrait fortement contribuer à ce pool d'ATP et son action, plus qu'apporter un réel avantage immédiat de

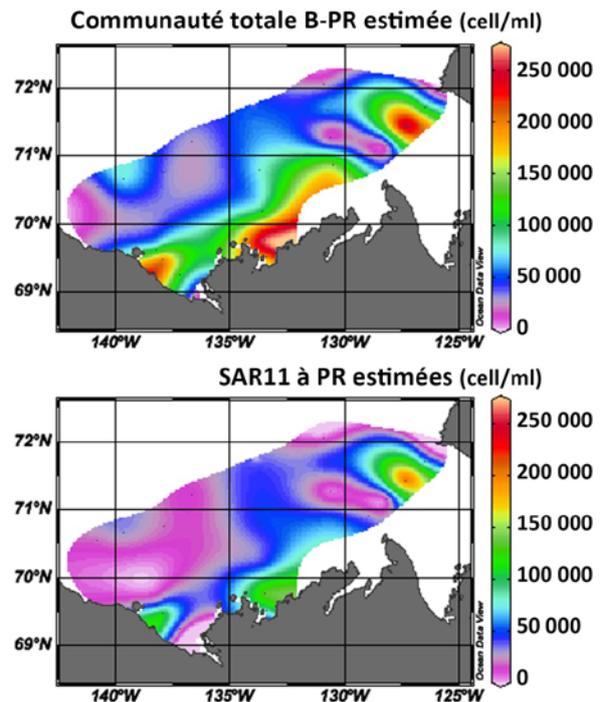


Figure 60. Estimation du nombre de bactéries possédant la PR (haut) et de SAR11 B-PR (bas). L'estimation est basée sur les pourcentages obtenus par qPCR (PR x 1,9 / 16S) et la quantification du nombre de bactéries par cytométrie en flux afin d'être comparable à la Figure 59.

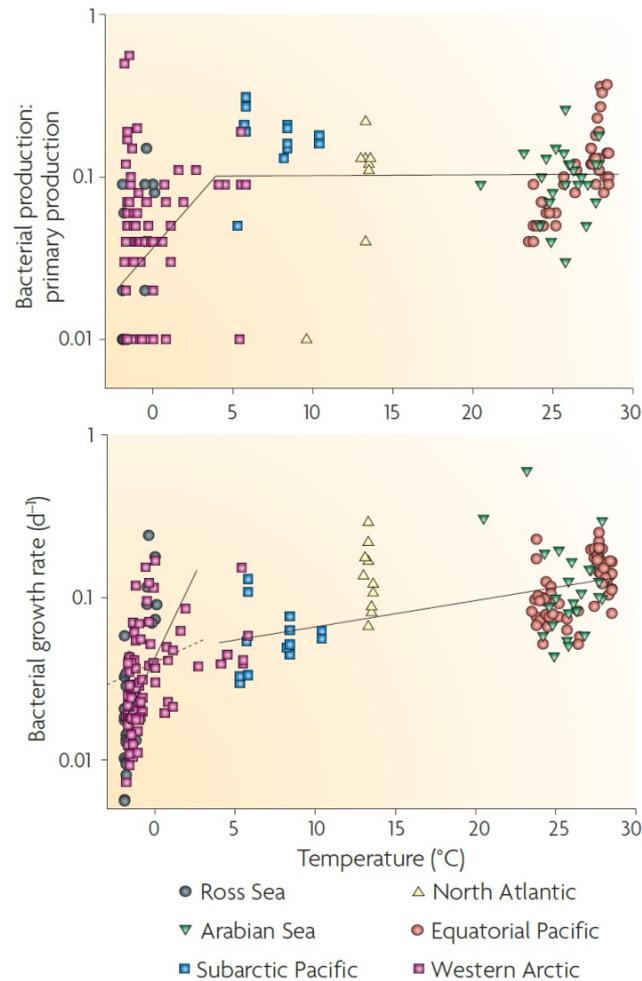


Figure 61. Effet de la température sur le ratio production bactérienne sur production primaire (haut) et sur le taux de croissance bactérienne (bas). D'après Kirchman *et al.* (2009).

croissance, ferait part à la lutte contre le froid et par là à une potentielle extension temporelle et/ou géographique de la niche écologique réalisée des photohétérotrophes. Ce processus pourrait être d'autant plus pertinent si les considérations de Kirchman *et al.* (2009) sont prises en compte. Ces derniers ont mesuré les taux de croissance bactérienne et le ratio production bactérienne/ production primaire de diverses régions océaniques de l'équateur aux pôles arctique et antarctique. Ils montrent que (i) la proportion de production primaire utilisée pour la production bactérienne croît fortement entre $-1,8^{\circ}\text{C}$ et $\sim 4^{\circ}\text{C}$ et peut atteindre, malgré de nombreuses faibles valeurs, de très hautes valeurs ponctuelles (Figure 62, haut) et (ii) le taux de croissance bactérienne est en moyenne 3 fois plus faible mais augmente 10 fois plus rapidement en dessous de $\sim 4^{\circ}\text{C}$ qu'au-dessus (Figure 62, bas). La distribution du bactérioplancton de surface évaluée en cytométrie en flux à l'issue de la campagne MALINA semble effectivement montrer une séparation entre hautes et basses densités de part et d'autre

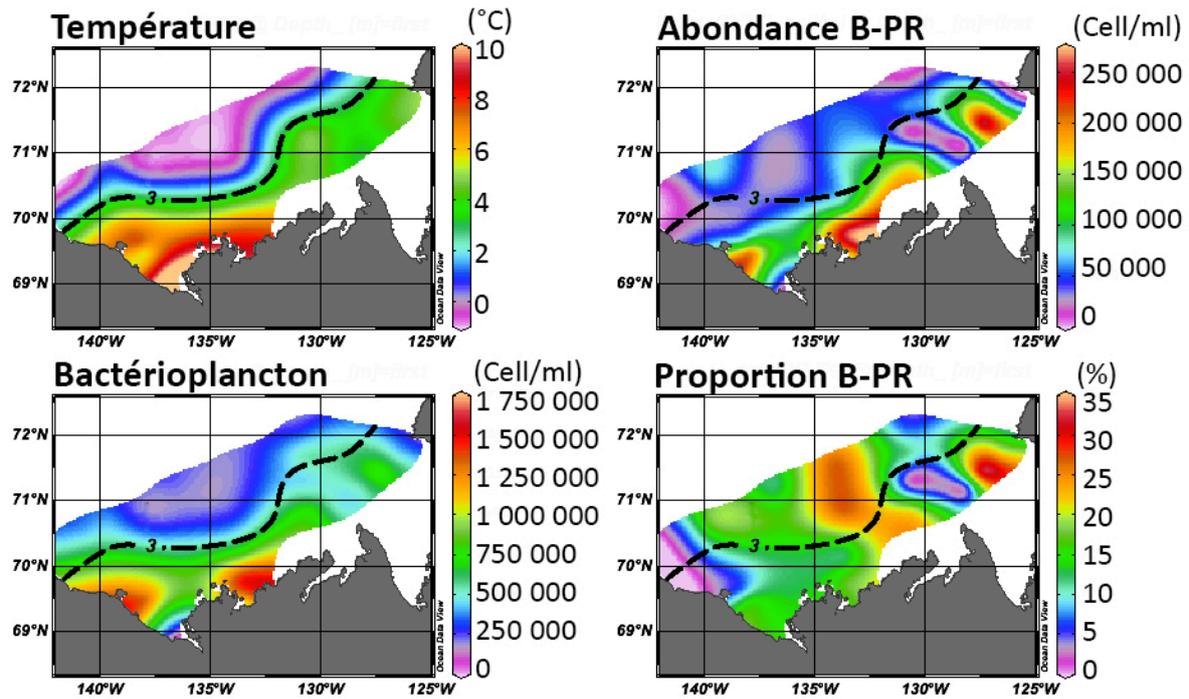


Figure 62. Distribution du bactérioplancton et des B-PR ainsi que la proportion des B-PR dans le bactérioplancton en fonction de l'isotherme 3°C.

de l'isotherme 3°C (Figure 62, bas gauche). L'abondance des B-PR montre également cette tendance avec toutefois plus de variabilité (Figure 62, haut droite). Il est probable que les faibles abondances au large révèlent des stratégies de vie différentes de celles du plateau ou de l'estuaire. Les populations du large sont probablement limitées par de faibles taux de croissance et une faible production. Dans ce cadre, la plus forte proportion de PR dans la communauté bactérienne du large (Figure 62, bas droite) souligne potentiellement l'importance de la PR dans une vie « au ralenti » en apportant une forme d'énergie réduisant les besoins énergétiques, et par voie de conséquence les besoins en carbone.

Le fait que parmi les photohétérotrophes seules les B-PR montrent cette tendance pourrait trouver des éléments de réponse d'une part dans la structure de la PR mais également d'un point de vue énergétique. La simplicité et la structure même de la PR pourrait jouer un rôle dans la persistance dans les eaux froides des B-PR. En effet, un trait commun aux bactéries psychrophiles est la production d'enzymes fonctionnant de façon optimale dans le froid et même si les bases moléculaires ne sont pas encore bien comprises, il semblerait que ce soit en partie lié à la structure protéique (Madigan *et al.* 2010a). De nombreuses enzymes actives dans le froids présentent, dans leurs structures secondaires, une plus grande proportion d'hélices- α et moins de feuillets- β que les enzymes inactives au froid. Comme les feuillets- β

ont tendance à être plus rigides que les hélices- α , la plus grande proportion de ces dernières allouerait une plus grande flexibilité aux protéines leur permettant de catalyser les réactions à basse température. Or, contrairement au photosystème des BPAA, la protéorhodopsine est constituée d'une seule protéine transmembranaire composée uniquement d'hélices- α (voir § 2.1.3) pouvant lui permettre un fonctionnement intrinsèque à plus basse température que les photosystèmes. D'un point de vue énergétique, même si la PR apporte moins d'énergie par photon reçu que le photosystème des BPAA (1 seul proton transloqué par photon contre 3), le coût de synthèse d'une unité de PR est largement plus faible que celui d'une unité de photosystème (sans les quinones et le cytochrome) chez les BPAA (Kirchman et Hanson 2012). Ce dernier a été estimé à $\sim 8,2 \cdot 10^{-19}$ kJ en prenant en compte le coût d'une synthèse *de novo* du rétinol alors que ce dernier peut être récupéré dans l'environnement baissant encore le coût soit au minimum 10 fois plus faible que pour la synthèse du photosystème des BPAA avec $\sim 83 \cdot 10^{-19}$ kJ. Ce calcul ne tient pas non plus compte de l'éventuel coût de maintenance du photosystème chez les BPAA en réponse au photodommage du photosystème comme cela est observé dans l'appareil de photosynthèse oxygénique, phénomène probablement beaucoup moins délétère pour la PR étant donné que la transduction de l'énergie lumineuse s'effectue par un simple jeu de changement de conformation *cis-trans* d'une insaturation le long du rétinol. D'autre part, la régulation de la PR doit probablement être plus facile tant dans son activité que dans le nombre d'unités phototrophes qu'arbore la cellule, puisqu'elle est composée d'une protéine et d'un pigment simple contrairement au photosystème des BPAA constitué de 3 sous-unités principales, de multiples antennes collectrices de lumière et de nombreux pigments plus complexes dont le principal est basé sur un hème, coûteux en azote et en magnésium (voir § 2.1.3). En été arctique, la lumière n'est pas un facteur limitant en surface et dans un contexte de limitation du métabolisme par l'environnement (physique ou nutritif), la PR représente un système phototrophe à faible coût de synthèse et de maintenance constituant sans doute un avantage notamment pour la compétition sur le long terme.

Un apport différentiel de la photohétérotrophie, améliorer la nutrition en côtier

A contrario, la phototrophie pratiquée par les BPAA permet potentiellement la production d'une plus grande quantité d'énergie par photon et la probabilité pour un photon de frapper la structure phototrophe est plus grande (surface exposée très faible pour la PR en comparaison de la surface plus importante du PSU et des antennes chez les BPAA). La quantité d'énergie générée est conceptuellement plus importante que chez les B-PR mais

nécessite également plus d'énergie pour la synthèse et le maintien en fonctionnement. De plus, les BPAA semblent être des organismes hautement actifs présentant des tailles de cellules plus importantes (Sieracki *et al.* 2006) et de forts taux de croissance (Koblížek *et al.* 2007). La plupart des BPAA et les bactéries pourpres non-sulfureuses ont un métabolisme très versatile en termes de sources carbonées. Les BPAA sont suspectées par plusieurs auteurs d'avoir la capacité d'utiliser une grande quantité de la MO disponible et ce quelque soit la qualité de cette dernière, de la MOD labile, réfractaire ou la MOP (Waidner et Kirchman 2007, Koblížek 2011, Salka *et al.* 2011). Les études sur la distribution des BPAA ont montré, comme la nôtre, une préférence des BPAA pour les environnements riches, en particulier l'océan côtier et les estuaires. L'apport énergétique de la photohétérotrophie pourrait jouer un rôle important pour les organismes en les rendant plus compétitifs dans ce type de milieux en permettant une réduction des coûts de l'utilisation de certains processus particulièrement demandeurs comme le transport actif de substrats et de nutriments, la production d'endo- et ecto-enzymes impliquées notamment dans la dégradation de molécules organiques complexes, et la motilité de la cellule. Salka *et al.* (2008, 2011) ont mis en évidence de fortes contributions des *Betaproteobacteria* et des *Alphaproteobacteria* dans les communautés de BPAA en milieu lacustre et dans la mer saumâtre qu'est la Baltique. Ces auteurs avancent plusieurs hypothèses qui peuvent être mises en parallèle avec notre étude compte tenu de la ressemblance dans leurs patrons de diversité : (i) le vaste cluster *pufM* proche des *Betaproteobacteria* (*Rhodofera*-like, correspondant au phylogroupe I de Yutin *et al.* (2007)) semblerait préférer les habitats riches en composés organiques labiles et en nutriments inorganiques alors que (ii) la photohétérotrophie dans les groupes d'*Alphaproteobacteria* proches des genres *Methylobacterium* et *Sphingomonas* fournirait une énergie supplémentaire utile dans les processus métaboliques très demandeurs en énergie en particulier la dégradation de la matière organique récalcitrante comme les acides humiques et les composés aromatiques. La matière organique provenant de la fonte du pergélisol et drainée par les grands fleuves arctiques est réfractaire car le pergélisol séquestre le carbone pendant de très longues périodes (Guo *et al.* 2007). La matière organique transportée par le Mackenzie est réfractaire pour près de 30% pour le Mackenzie et jusqu'à 80% pour la très proche rivière Sagavanirktok. Il est probable que la phototrophie puisse effectivement permettre un apport d'énergie intéressant pour permettre la dégradation de ces composés en source de carbone biodisponible notamment par la réduction du coût de synthèse d'enzymes de dégradation. Ce processus pourrait d'une part être particulièrement important dans la couche néphéloïde

benthique (BNL), riche en composés réfractaires, qui constituent une niche tout-à-fait particulière dans laquelle les *Methylobacterium* et *Sphingomonas* BPAA seraient très compétitives. D'autre part il pourrait compléter le processus de photodégradation de la matière humique prenant place dans le Mackenzie et rendant biodisponible cette matière organique réfractaire (Vallières *et al.* 2008). Tous deux pourraient être importants pour la productivité de l'écosystème côtier compte tenu des relatives faibles abondances de MOD biodisponible dans le plateau du Mackenzie (Shen *et al.* 2012). Une action, moins demandeuse en énergie, facilitant l'incorporation des nutriments par la photohétérotrophie pourrait être complémentaire. Elle pourrait notamment expliquer, en partie, la distribution de groupe de photohétérotrophes côtiers comme les OTUs principales des BPAA (OTU 6) et des B-PR (OTU 3 a et b).

L'OTU 6 de BPAA présente cependant une distribution singulière puisqu'elle domine largement la communauté en côtier mais est retrouvée au large, encore active. Comptes tenus de sa probable origine fluviale, l'expression de son photosystème, comme cause ou conséquence, pourrait rentrer en compte dans sa persistance au large. En effet, il a été montré chez des consœurs BPAA, la production plus importante de pigments caroténoïdes (connus pour leur rôle dans la réponse à un stress) mais également de BChl *a* quand les conditions de croissance ne sont pas optimales pour la souche considérée comme une diminution de salinité chez des souches BPAA typiquement marines comme *Erythrobacter longus* (Sato *et al.* 1989) ou *Citromicrobium bathyomarinum* (Rathgeber *et al.* 2004). Il est envisageable qu'une augmentation de salinité représente un stress pour cette OTU provenant d'eaux *a minima* saumâtres. La synthèse de la BChl *a* pourrait être une réponse à ce stress, il est toutefois difficile de distinguer si cette dernière est accessoire et fait partie d'un mécanisme de résistance impliquant les caroténoïdes ou si elle révèle un réel avantage de la photohétérotrophie dans des conditions de stress comme le propose Rathgeber *et al.* (2004). Le fait que les gènes codant pour la synthèse de la bactériochlorophylle et de la grande majorité des pigments caroténoïdes (ainsi que le centre réactionnel) soient organisés en super-opéron co-exprimé et co-régulé (Liotenberg *et al.* 2008, Zheng *et al.* 2011) supporte la première hypothèse puisque les caroténoïdes représentent une réponse courante dans la protection contre les stress oxydatif, salin et lumineux. De plus, chez les bactéries pourpres non-sulfureuses, un tel super-opéron est également présent et il est suspecté de jouer un rôle prépondérant dans l'adaptation des cellules aux changements environnementales d'oxygène en assurant une réponse physiologique rapide (Overmann et Garcia-Pichel 2006). La seconde

hypothèse en revanche est concordante avec la vue développée dans la section précédente mais également avec l'étude de Mikkat *et al.* (1997) montrant que la photohétérotrophie serait une réponse au stress salin. En effet, quand la salinité augmente, les osmoprotectants (tréhalose, glucosylglycérol et sucrose) sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie en addition de l'activité photosynthétique chez *Synechocystis* sp. PCC6803, une cyanobactérie dulçaquicole halotolérante. La photohétérotrophie pourrait alors expliquer les abondances comparables dans le fleuve et l'estuaire de *Cyanobacteria Chroococcales*, très proches des *Synechococcus*, et la persistance en très faibles abondances sur le plateau observée par Waleron *et al.* (2007) et Vallières *et al.* (2008).

Un apport différentiel de la photohétérotrophie, le cas des efflorescences

Lors de la campagne MALINA, des indices de conditions d'efflorescence ou post-efflorescence ont été rencontrés tout d'abord dans le sud de la mer des Tchouktches passé le détroit de Béring (ARC1) et en moindre mesure à l'extrême Est du plateau du Mackenzie (station 170). En mer des Tchouktches, de fortes abondances relatives de BPAA (~15%) ont été relevées et la banque de clones correspondante indiquait une dominance absolue de BPAA appartenant aux *Rhodobacterales*. En parallèle, l'OTU 3 des B-PR dominante dans les banques de clones y atteint également une abondance relative record (plus de 38% du bactérioplancton). En revanche, à l'Est du plateau du Mackenzie, où un événement d'*upwelling* a probablement eu lieu peu avant l'échantillonnage (conditions de post-efflorescence), les groupes de photohétérotrophes qui dominent sont très différents. Les banques de clones révèlent une dominance de l'OTU 6 des BPAA (*Betaproteobacteria*) mais également d'OTUs B-PR proches des *Polaribacter* (*Flavobacteriaceae*) en surface. Sous la surface, c'est un groupe de *Gammaproteobacteria* (OTU 36) retrouvé qu'en Arctique et dont la plus proche relation est la souche IMCC2047 qui domine. Au total, en mer des Tchouktches (ARC1), au minimum 60% de la communauté bactérienne lors de cet événement d'efflorescence pratique une forme de photohétérotrophie ce qui traduit une probable implication de cette dernière dans la réponse rapide à une augmentation fugace des nutriments. Conceptuellement, cet avantage pourrait intervenir à 3 niveaux, sur la croissance elle-même, sur la nutrition en accord avec la précédente section et éventuellement dans les processus coûteux de dynamiques d'adhésion aux particules (y compris les microalgues) et de mobilité. En effet, la génération d'une PMF en utilisant l'énergie lumineuse en place de l'énergie dégagée par la consommation de carbone dans la chaîne respiratoire pourrait

permettre de réattribuer cette ressource à d'autres processus cruciaux pendant ces très courtes périodes de forte compétition.

Photohétérotrophie en Arctique et changement climatique

La biogéographie et la diversité des groupes de photohétérotrophes que nous avons mis en évidence révèlent une probable utilisation différentielle de l'énergie apportée par la photohétérotrophie et suggèrent des réponses probablement différentes aux changements climatiques actuellement en cours en Arctique (voir § 3.2.3). Tout d'abord, l'importance des processus hétérotrophes a été mise en évidence en Arctique (Cota *et al.* 1996, Kirchman *et al.* 2009) mais également durant la campagne MALINA (Ortega-Retuerta *et al.* 2012b), et son accroissement est prédictible dans un scénario de changements climatiques. La capacité des photohétérotrophes à exploiter l'énergie lumineuse en plus de leur hétérotrophie peut faire de ces organismes des membres clés dans la communauté bactérienne à l'importance accrue dans un contexte d'accroissement de la longueur des périodes et de l'étendue des surfaces libres de glace. De plus, l'augmentation prédite des apports terrigènes, renforcée par l'accroissement de la zone libre de glace, les photohétérotrophes à tendance copiotrophe, utilisant l'énergie supplémentaire générée pour accroître leur capacité nutritive (tant en termes de quantité que de diversité des sources) pourraient voir leur abondance relative augmenter et leur aire de répartition s'accroître. Ce phénomène est amplifié par les modifications concomitantes des paramètres physiques critiques (comme la salinité, la température et l'exposition au rayonnement solaire) pour le bactérioplancton de l'océan de surface comme par exemple l'extension prévisible de la couche dessalée de surface étendant la niche écologique réalisée des espèces de plus grande tolérance aux variations de salinité (OTU 6 BPAA). Les faibles abondances et les traits écologiques des groupes de BPAA du plateau du Mackenzie laissent supposer que cette communauté (en particulier les *Rhodobacterales*) pourrait répondre très rapidement aux changements du milieu et devenir un groupe fonctionnel important dans le futur, comme il a été proposé pour les *Synechococcus* en Arctique par Huang *et al.* (2012). Ceci peut être particulièrement vrai si, comme il est suspecté par Arrigo *et al.* (2012), l'occurrence des efflorescences massives de phytoplancton en bordure et sous la calotte glaciaire augmente avec la diminution de l'épaisseur et de l'étendue de cette dernière.

D'autre part, une plus grande quantité d'eau douce déversée entraînerait l'augmentation de la stratification des masses d'eaux par le renforcement et l'approfondissement de

l'halocline qui tendrait à limiter les échanges de nutriments des eaux plus riches sous-jacentes vers la couche supérieure s'appauvrissant. Dans cette optique d'oligotrophie croissante, la photohétérotrophie permettant d'augmenter la survie est suspectée d'augmenter en importance. La modification de l'hydrologie Arctique pourrait également avoir de fortes implications sur la circulation des courants marins (voir § 3.2.3), or il a été montré en Arctique que les diversités de nombreux compartiments de la communauté microbienne étaient inféodées aux masses d'eaux (Galand *et al.* 2010, Lovejoy et Potvin 2011, Ghiglione *et al.* 2012) et notre étude a montré qu'il semble que ce soit également le cas pour les communautés photohétérotrophes. Outre la vulnérabilité accrue des communautés aux changements de leur environnement, ceci peut avoir de profondes implications sur les fonctions réalisées par la communauté microbienne et par là sur les cycles biogéochimiques dont le plus critique est celui du carbone. En effet, la balance absorption / émission de CO₂ global de l'Arctique est actuellement en faveur de l'absorption en très grande partie grâce à la pompe physique, chimique et de solubilité (dû à une plus grande absorption de CO₂ par les eaux froides et à la formation d'eaux denses) faisant de l'Arctique un puits de CO₂ à hauteur de 5 à 14% de la prise nette mondiale (Bates et Mathis 2009). Toutefois, en plus de diminuer le pompage physico-chimique dans son intensité et dans l'étendue des zones où il s'exerce, les augmentations de la température des eaux de surface et des rejets fluviaux chargés en matière organique pourraient renforcer les processus hétérotrophes. Ceci pourrait modifier en profondeur le bilan net du CO₂ par une émission biologique accrue. Par ses caractéristiques, les processus photohétérotrophes pourraient voir leur importance accrue (Figure 63) étant donné les évolutions environnementales attendues.

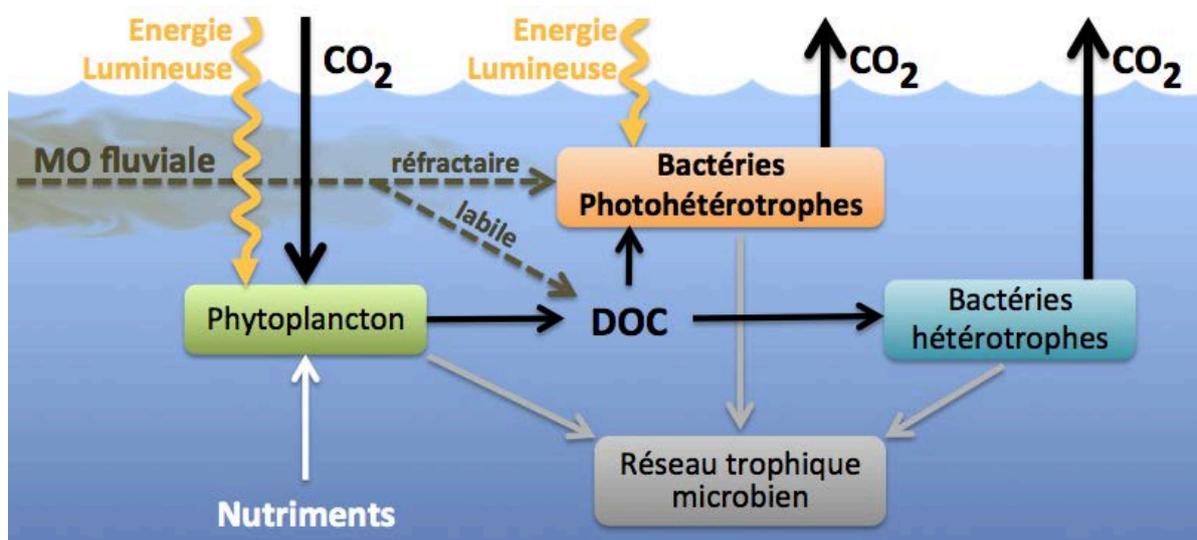


Figure 63. Place des bactéries photohétérotrophes dans la balance absorption/émission de CO₂

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Durant cette dernière décennie la vue dichotomique classique d'un monde vivant soit végétal, autotrophe, soit animal, hétérotrophe, a été bouleversée avec la découverte de l'importance tant numérique qu'écologique des processus photohétérotrophes dans le monde microbien. Outre la découverte de la photohétérotrophie elle-même connue chez de nombreux organismes depuis longtemps, le virage s'est réellement amorcé, avec la mise en lumière de la diversité et de l'importance numérique des prokaryotes photohétérotrophes dans l'océan mondial par Kolber *et al.* (2001) pour les BPAA et pour les B-PR, Bèjà *et al.* (2001) mais surtout les premières études de métagénomiques de Venter *et al.* (2004) et Rusch *et al.* (2007). Ces découvertes ont transformé la considération de ce mode métabolique d'anecdotique à prépondérant dans les systèmes marins. Toutefois leur implication écologique et leur place dans les modèles trophodynamiques restent encore à évaluer, principalement pour les B-PR. De nombreux écosystèmes restent encore peu voire pas échantillonnés, ce qui pose un frein à la compréhension de leur écologie et de leur potentiel rôle dans les écosystèmes et les cycles biogéochimiques. L'Arctique, avec sa place centrale dans l'hydrologie et la régulation climatique au niveau mondial, en fait partie. La sensibilité de cette région aux changements climatiques en cours et les conditions drastiques qui y règnent en font une région d'étude particulièrement intéressante pour comprendre la place de ces bactéries dans l'utilisation du carbone et de l'énergie lumineuse. Notre étude portait sur le plateau du fleuve Mackenzie, le plus grand fleuve arctique Nord-américain drainant plus d'un tiers du Grand Nord canadien, territoires couverts en très grande majorité de pergélisol, stockant d'énormes quantités de carbone et particulièrement sensibles au réchauffement climatique.

Notre étude, inscrite dans la campagne internationale MALINA, est la première à caractériser à si haute résolution les populations photohétérotrophes dans l'océan arctique Ouest. Nous avons pu mettre en évidence dans ce système la présence des deux communautés de bactéries photohétérotrophes présentant les mêmes distributions et des contributions aussi importantes qu'à plus basses latitudes. Les deux communautés photohétérotrophes ont montré des distributions propres, divergentes de celles de la communauté bactérienne totale ou du phytoplancton. La communauté des BPAA a montré une forte dépendance aux apports

fluviaux avec les plus fortes contributions dans l'embouchure du fleuve et dans la couche néphéloïde de fond et une diminution de la population suivant la diminution du carbone organique jusqu'à de très faibles abondances dans les conditions oligotrophes du large. Au contraire, la communauté des B-PR a montré une opposition tranchée à la distribution des nutriments avec les plus faibles contributions dans les eaux liées au Mackenzie ou dans la couche sous-jacente Pacifique et les plus fortes à la base de la PML. L'analyse de la diversité de ces communautés a révélé la présence de familles communément retrouvées dans les autres océans mais à niveau taxinomique plus fin, à l'échelle de l'OTU, la très grande majorité des groupes présents sont nouveaux ou retrouvés qu'en Arctique révélant un probable endémisme fort. La diversité des BPAA est marquée par un fort contraste entre la communauté du large et dans les côtes, avec une dominance au large des *Rhodobacterales* dont nous avons réussi à isoler les principaux membres et dans les eaux influencées par les apports fluviaux, d'une grande majorité d'OTUs éloignées génétiquement de groupes connus et dont les plus proches représentant appartiennent aux *Betaproteobacteria*. La plus importante des OTUs BPAA appartient à ces dernières et a montré une répartition jusque dans les eaux salées du large dans lesquelles elle est encore active. Nous n'avons pas réussi à en isoler des membres, ce qui aurait pu permettre la caractérisation de leur capacité métabolique. Comptes tenu de sa forte abondance, de sa large distribution en mer de Beaufort et du fait que des clones similaires sont trouvés à plus basses latitudes, étudier la distribution de clade dans les zones côtières arctiques et dans la couche désalée de surface en Centre Arctique peut représenter un intérêt dans la compréhension des *Betaproteobacteria* marines encore méconnue. De même, réussir à isoler des représentants de cette OTU photohétérotrophe et plus largement, réussir à cultiver des membres des grands groupes bactériens incultivés, comme les *Betaproteobacteria*, afin de mieux comprendre leur écologie reste un challenge car les méthodes de culture actuelles ne le permettent pas. Dans cette optique et compte tenu de l'importance croissante que l'effort d'isolement représente à l'âge des « omics » (voir Giovannoni et Stingl (2007)) a débuté en août 2012 le projet Européen MACUMBA auquel nous contribuons (*Marine Microorganisms: Cultivation Methods for Improving their Biotechnological Applications* ; http://cordis.europa.eu/search/index.cfm?fuseaction=proj.document&PJ_RCN=13027421).

Comme dans d'autres systèmes, les variants spectraux verts (Leucine, Méthionine, Valine ou Adénine à la position 105) de la PR dominant dans les zones côtières plus turbides dans lesquelles le rouge et le bleu sont absorbés par les particules en suspension. En opposition, les variants spectraux bleus (acide Glutamique à la position 105) dominent en

profondeur ou dans les zones oligotrophes. La diversité des B-PR est quant à elle beaucoup plus importante que celle des BPAA et montre une codominance des *Alphaproteobacteria* et des *Gammaproteobacteria*. Toutefois la quantification des principaux groupes d'OTUs a révélé que les *Alphaproteobacteria* étaient largement dominantes dans ce système, principalement la communauté SAR11 mais également un groupe retrouvé qu'en arctique et lié lointainement aux SAR116. Nous n'avons malheureusement pas réussi à isoler des représentants de ce dernier groupe puisque seules des souches appartenant soit aux *Flavobacteriaceae* soit aux *Alteromonadaceae* (*Glaciecola* sp.) ont été isolées. Des expérimentations en conditions d'éclairement et de quantité de carbone contrôlés n'ont pas permis de mettre en évidence un apport de la PR à la croissance de ces souches. Les précédentes études qui s'y sont intéressées montrant des résultats contradictoires (Giovannoni *et al.* 2005a, Gómez-Consarnau *et al.* 2007, 2010, Riedel *et al.* 2010), le rôle écologique de la PR reste encore mal compris. En prenant en compte l'ubiquité et l'abondance de la PR, tenter d'y répondre représente une des plus intéressantes perspectives pour notre compréhension des relations entre lumière et utilisation du carbone dans l'océan mondial. Pour se faire, des expériences de culture en milieu contrôlé et en cultures continues, en partie sur les souches isolées pendant MALINA, ont été entreprises dans le cadre du projet RHOME0 (*proteoRHODopsin-containing prokaryotes in Marine EnvirOnments*; http://lomic.obs-banyuls.fr/en/microbial_biodiversity_and_biotechnology_team/anr_rhomeo.html). De plus, lors de MALINA, comme c'est souvent le cas pour les campagnes multidisciplinaires couvrant de vastes zones géographiques, le nombre et le type d'expérimentations possibles sont limités. C'est notamment le cas pour des expérimentations de physiologie *in situ* qui auraient pu contribuer à la compréhension de l'apport de la phototrophie aux populations bactériennes locales dans les conditions environnementales qu'elles rencontrent ou encore à une comparaison entre communauté d'été (maximum d'éclairement) et d'hiver (obscurité totale). Dans une même idée, des données sur la dynamique saisonnière des bactéries photohétérotrophes ou sur les paramètres environnementaux régissant l'expression des structures phototrophes sont encore manquantes pour appréhender toutes les facettes des implications de la photohétérotrophie dans les cycles biogéochimiques. Concernant les B-PR, cet aspect sera appréhendé par PCRq sur l'ARNm PR (RT-PCRq) sur 2 séries temporelles pluriannuelles côtières (ASTAN à Roscoff, Manche et MOLA à Banyuls-sur-Mer, Méditerranée) dans le cadre du projet RHOME0 ainsi que sur les expériences de cultures en milieu contrôlé précédemment évoquées.

La compréhension du rôle écologique de la PR est un challenge d'autant plus stimulant qu'une grande diversité d'homologues proches a été découverte ces dernières années grâce au séquençage de génomes et métagénomes (Sharma *et al.* 2009, Oh *et al.* 2011b, Yutin et Koonin 2012, Kwon *et al.* 2013). De plus, les découvertes récentes de bactéries contenant à la fois la PR et l'enzyme RuBisCO capable de fixer le CO₂ (Kang *et al.* 2011) mais aussi de courtes antennes de caroténoïdes liées à un homologue de la PR qui constituerait le plus petit photosystème (Balashov *et al.* 2005) ouvrent de nouvelles voies sur les potentielles capacités de la phototrophie basée sur les rhodopsines. La présence d'un homologue à la PR dans le matériel génétique de virus (Yutin et Koonin 2012) ainsi que l'abondance de virus infectant les bactéries les plus abondantes de l'océan mondial, les SAR11 (Zhao *et al.* 2013), posent également de nouvelles bases sur les hypothèses de la dispersion et de l'avantage écologique de ce mode phototrophe dans les communautés procaryotiques. Cela soulève également des questions sur la perception que nous avons des forces évolutives qui structurent les populations bactériennes. Des isollements de virus contenant les cassettes géniques permettant la synthèse de l'appareil phototrophe et l'étude de la dynamique virus-bactérie photohétérotrophe, possible dans le cadre du projet MACUMBA, pourraient permettre d'apporter des éléments de réponses sur les forces évolutives et la transmission de fonction au sein du monde microbien.

D'un point de vue appliqué, l'étude de la famille protéique des rhodopsines a déjà permis la mise en place de procédés biotechnologiques générant de l'énergie *in vitro* (Wendell *et al.* 2010), ou du biocarburant (biohydrogène) *in vivo* (Kim *et al.* 2012), à partir d'une construction protéique simple. Ces exemples montrent que des applications biotechnologiques, représentant un des axes de recherche de MACUMBA, sont possibles mais sont directement dépendantes de notre connaissance sur la diversité et le fonctionnement de ces protéines.

READER DIGEST

Article 3: Diversity of Arctic Pelagic Prokaryotes with an Emphasis on Photoheterotrophic Bacteria: A Review.

Soumis à *Biogeosciences* (IF 3,859)

Diversity of Arctic Pelagic Prokaryotes with an Emphasis on Photoheterotrophic Bacteria: A Review

Dominique Boeuf^{1,2}, Florian Humily^{1,2} & Christian Jeanthon^{1,2}

¹ CNRS, UMR 7144, *Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique, 29680 Roscoff, France*

² UPMC Univ Paris VI, UMR 7144, *Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique, 29680 Roscoff, France*

For correspondence. Email: jeanthon@sb-roscoff.fr. Tel. (+33) 298 292 563; Fax (+33) 298 292 324.

Abstract

The Arctic Ocean is a complex natural system characterized by several sets of climatic, hydrographic, sedimentary, and biological features that make it unique among the Earth's oceans. The most distinctive features of the Arctic Ocean system are the perennial ice cover over most of the ocean, the relative importance of the continental shelves and shelf processes, and the complex interaction of water masses of various origins including the Atlantic, Pacific, and riverine sources. Heterotrophic bacteria are crucial components of marine food webs and have key roles in controlling carbon fluxes in the oceans. Although it was previously thought that these organisms relied on the organic carbon in seawater for all of their energy needs, several recent discoveries now suggest that pelagic bacteria can depart from a strictly heterotrophic lifestyle by obtaining energy through unconventional mechanisms that are linked to the penetration of sunlight into surface waters. These photoheterotrophic mechanisms may play a significant role in the energy budget in the euphotic zone of marine environments. We can suspect that this role could be of greater importance in the Arctic Ocean where environmental changes triggered by climate change could favor the photoheterotrophic lifestyle. In this review, we discuss recent advances in our knowledge of the ecology of photoheterotrophic bacteria in the Arctic Ocean gained in the framework of the Malina cruise.

1. Introduction

The Arctic Ocean is the smallest of the five major oceans with 2.8% of the Earth's total surface (Pidwirny 2006); it is almost completely surrounded by lands and can be viewed as the Arctic Mediterranean Sea (Coachman et Aagaard 1974). However, the Arctic Ocean and its marginal seas (the Chukchi, East Siberian, Laptev, Kara, Barents, White, Greenland, and Beaufort; some oceanographers also include the Bering and Norwegian Seas) are the least known basins and bodies of water of the world's oceans owing to their remoteness, hostile weather, and perennial or seasonal ice cover. The Arctic Ocean has the most extensive shelves of any ocean basin, covering about 50% of its total area. Relative to other ocean basins, rivers play a disproportionately important role in the Arctic Ocean, which contains only about 1% of the world's ocean volume yet receives approximately 10% of the global terrigenous DOC load (Aagaard *et al.* 1985, Shiklomanov 1998, Opsahl *et al.* 1999). The DOC concentrations in coastal Arctic waters are twice higher than those in the Atlantic and Pacific Oceans (Cauwet et Sidorov 1996) highlighting the tight coupling of the Arctic Ocean with terrestrial catchments (Meon et Amon 2004). The Arctic Ocean is also freshened by inputs of relatively low-salinity Pacific waters delivered through the Bering Strait and net precipitation over the ocean surface (Serreze *et al.* 2006). Sea ice dynamics also play a pivotal role in the salinity regime, adding salt to the underlying water during ice formation and releasing fresh water during ice thaw. As a consequence, estuarine gradients are a defining feature not only near-shore, but throughout this landlocked ocean. Due to this large influx of freshwater, the Arctic Ocean is well stratified with a distinctive surface layer of reduced salinity, the polar mixed layer, and density stratification inhibits vertical mixing with warmer, saline Atlantic waters below 200 m, allowing sea ice to form (Aagaard et Coachman 1975). Inorganic nutrient concentrations exhibit strong regional gradients from high nutrient regimes (e.g., the Chukchi Sea shelf) to oligotrophic conditions (e.g., in the Beaufort Gyre and the Beaufort Sea).

The climate of the Arctic marine environment is characterized by extreme seasonality in solar radiation, ice cover and atmospheric temperature and, to a lesser extent, water temperature (Carmack *et al.* 2006, Carmack et Wassmann 2006). The winter season in the Arctic is characterised by little or no sun light, of which only a fraction is able to penetrate the thick sea ice and snow layers to the water column below. This mainly affects photosynthetic organisms like phytoplankton, which require sunlight for carbon fixation. Most pronounced changes for the marine environment occur during the spring, when melting sea ice and rapidly increasing day length allow greater penetration of light to the water column, which together with strong stratification, are followed by increased photosynthetic activity. Despite their low temperatures, arctic waters support a highly productive ice-free season (Garneau *et al.* 2008), and bacterial activity has been found to be as high as in lower latitudes (Wheeler *et al.* 1996). Overall, however, the composition, physiology and function of prokaryotic heterotrophs in the marine Arctic are poorly understood, both in terms of spatial variations as well as temporal dynamics (Amon 2004, Loeng *et al.* 2005).

In this article, we first present an updated overview of the diversity of pelagic prokaryotes and their influences on biochemistry and upper food webs in the Arctic Ocean. Then, we focus on our current knowledge of the photoheterotrophic bacterial populations. In the light of recent studies that have been conducted during the Malina cruise, we also discuss the possible changes that could occur in the diversity of photoheterotrophic bacteria in coastal environments of the Beaufort Sea.

2. Diversity of heterotrophic prokaryotes

Despite the permanently low temperatures, substantial microbial activity is found in summertime Arctic waters as a result of the large inputs of nutrients and organic matter released by coastal run-off and produced by seawater and sea ice primary production (Wheeler *et al.* 1996, 1997). Early studies of the prokaryotic diversity were conducted in nearshore waters of the western Beaufort Sea and were based on observations of cultivable bacteria (Kaneko *et al.* 1977). Succession of cultivable bacterial phenotypes was demonstrated according to season and geography and in response to algal blooms. These pioneering studies demonstrated that bacterial isolates tend to differ significantly from those found in other marine environments. This observed potential for high genetic diversity was further confirmed by 16S rRNA gene-based molecular analyses of subsurface arctic prokaryotic communities. Early studies have analysed spatial (Ferrari et Hollibaugh 1999) and temporal (Bano et Hollibaugh 2002) changes of prokaryotic assemblage composition in Arctic waters by means of clone libraries and/or denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Clone libraries of 16S rRNA genes from the Central Arctic (Bano et Hollibaugh 2002), Western Arctic (Malmström *et al.* 2007), Greenland Sea (Zaballos *et al.* 2006, Pommier *et al.* 2007), Baffin Bay (Pommier *et al.* 2007), Laptev Sea (Kellogg et Deming 2009) and Franklin Bay (Collins *et al.* 2010) have shown that bacterial assemblages are a mixture of uniquely polar and cosmopolitan phylotypes. These assemblages are often dominated by *Alphaproteobacteria* (mainly of the SAR11 group) and *Gammaproteobacteria*. However, Malmström *et al.* (2007) reported high numbers of gammaproteobacterial (53% of the clones) and *Bacteroidetes* (29% of clones) sequences in a clone library constructed with a sample from the Chukchi Sea (Western Arctic). *Gammaproteobacteria* and *Bacteroidetes* were also the dominant groups in surface waters of Baffin Bay and Greenland Sea (Pommier *et al.* 2007). On the other hand, the large contribution of pelagic *Archaea* to prokaryotic

assemblages seems to be a characteristic feature of polar regions (DeLong *et al.* 1994). In the Western Arctic, Galand *et al.* (2008b) found that archaeal assemblages were dominated by *Euryarchaea* in particle-rich riverine or coastal waters, and by *Crenarchaea* in marine waters of the Beaufort Sea. Bano *et al.* (2004) found depth-related differences rather than seasonal differences in the composition of the archaeal assemblages in the Central Arctic. *Crenarchaea* were found to dominate in early spring, but more proportionate fractions of *Crenarchaea* and *Euryarchaea* were found in summer and autumn (Bano *et al.* 2004).

Most recently, massively parallel tag sequencing techniques have revealed that, like other oceans, the Arctic contains a remarkably diverse range of microbes (Fig. 1). These studies yielded much higher diversity estimates at all taxonomic levels than found by previous studies in the Arctic Ocean, but rarefaction analyses still suggested undersampling. Although in one coastal study a greater abundance of *Gammaproteobacteria* was observed (Kirchman *et al.* 2010), *Alphaproteobacteria* typically dominate Arctic surface waters, followed by *Gammaproteobacteria* and by *Bacteroidetes* that were also very abundant. *Verrucomicrobia* and *Actinobacteria* are also widely recognized as abundant Arctic seawater clades. The pyrosequencing analyses also confirmed the scarcity of marine cyanobacteria in Arctic marine waters (Waleron *et al.* 2007), although significant proportions were obtained in the attached fraction associated to the Mackenzie plume (Ortega-Retuerta *et al.* 2012c). In the latter study, significant differences between particle-attached and free-living bacterial communities were observed in the open sea, but both fractions showed a similar structure in coastal and river samples. The influence of river inputs on bacterial community structure was also shown in previous studies in the Arctic (Galand *et al.* 2006, Garneau *et al.* 2006, Kellogg et Deming 2009) and in a global comparison of bacterial diversity including Arctic samples (Ghiglione *et al.* 2012). Pyrosequencing studies also support the view that Crenarchaeota are more diverse

and abundant than Euryarcheota in the deeper waters compared with the surface waters (Galand *et al.* 2009b).

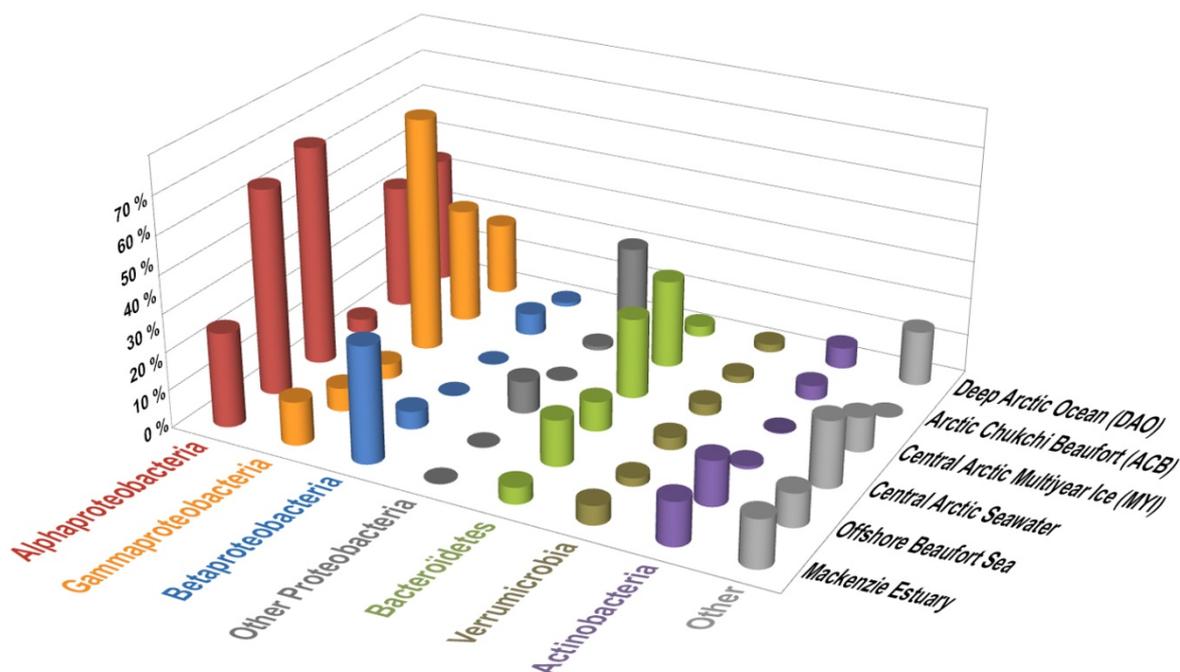


Fig. 1. Relative abundance of major phyla identified in pyrosequencing studies of the Deep Arctic Ocean (Galand *et al.* 2010); the Arctic Chukchi Beaufort (Kirchman *et al.* 2010), the Central Arctic Multi-year Ice and the Central Arctic seawater (Bowman *et al.* 2012), the offshore Beaufort Sea and the Mackenzie estuary (Ortega-Retuerta *et al.* 2012c).

These diversity studies have been complemented by quantification of archaeal and bacterial phylogenetic groups by means of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Wells et Deming 2003, Garneau *et al.* 2006, Elifantz *et al.* 2007, Kirchman *et al.* 2007). In these studies, relatively low proportions of *Archaea* were found in surface waters while high proportions of *Alphaproteobacteria* (Garneau *et al.* 2006, Elifantz *et al.* 2007) or *Bacteroidetes* (Wells et Deming 2003, Elifantz *et al.* 2007) were found in different western Arctic regions. In the Chukchi sea, SAR11 was the dominant group (contributing more than 20% of cell counts) and the SAR86 group (*Gammaproteobacteria*) and the *Roseobacter* RCA cluster contributed around 8% and 10% of cell counts, respectively (Malmström *et al.* 2007).

3. Diversity of photoheterotrophic bacteria

Photoheterotrophs are microorganisms that use light as an energy source while exploiting organic compounds as their carbon and energy source. In the marine environment, these microorganisms are currently divided into three groups. The first group includes photoautotrophic cyanobacteria such as *Prochlorococcus* and *Synechococcus* species that have been suggested to act as facultative photoheterotrophs in oligotrophic environments. A second group is composed of aerobic anoxygenic phototrophic (AAP) bacteria. These organisms are obligate aerobes using dissolved organic matter as a source of organic carbon for their metabolism and growth. They harvest light using bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) – based pigments and reaction centers in addition to respiration. The third is composed of diverse bacterial groups that use bacterial rhodopsin as light-driven proton pump.

3.1. Cyanobacteria

Picocyanobacteria have the capacity to harvest light energy mainly by chlorophyll *a* pigment in photosystems I and II and fix CO₂ using the Calvin–Benson cycle. *Synechococcus* spp. and *Prochlorococcus* spp. are prominent constituents of the marine biosphere that account for a significant percentage of the biomass and oceanic primary production (Li 1994). *Prochlorococcus* and marine *Synechococcus* depend on light for most of their energy production and CO₂ for carbon acquisition. However, they have also been shown to take up diverse organic substrates such as amino acids, nucleosides, oligopeptides, urea, sulfur compounds or cyanate (Palenik *et al.* 2003, Malmström *et al.* 2005, Zubkov et Tarran 2005, Béjà et Suzuki 2008) and use them to produce cellular biomass.

3.1.1. Abundance in the Arctic Ocean

Polar regions represent singular ecosystems for cyanobacteria. Although cyanobacteria predominate in brackish or freshwater environments reaching abundances among the highest reported in natural environment (Powell *et al.* 2005), their abundance are typically low in marine polar waters (Li 2009). In both polar oceans, picocyanobacteria follow a general trend of decreasing concentrations and relative abundance with increasing latitudes and strong inverse correlations between cells densities and temperature have been reported (Murphy et Haugen 1985, Marchant *et al.* 1987, Rosenbergl 1993). *Prochlorococcus*, the most abundant photosynthetic organism in the ocean, is widely distributed in subtropical and tropical waters from 40° S to 48° N (Partensky *et al.* 1999b, Johnson *et al.* 2006) Due to its temperature sensivity, its concentrations decline rapidly beyond this band (Marchant *et al.* 1987). Despite the report of its presence in a sub-Arctic region at latitude 61°N (Buck *et al.* 1996) and at southern latitudes of the sub-Antarctic (Marchant *et al.* 1987), *Prochlorococcus* is considered as virtually absent in the polar oceans (Baldwin *et al.* 2005, Zwirgmaier *et al.* 2008, Cottrell et Kirchman 2009, Li 2009, Lin *et al.* 2012). *Synechococcus* is more ubiquitous and virtually inhabits all marine and freshwater environments (Partensky *et al.* 1999a). In the Arctic Ocean, *Synechococcus* has been found in many marine cold environments such as the Chukcki Sea (Cottrell et Kirchman 2009, Huang *et al.* 2012), the Beaufort Sea (Cottrell et Kirchman 2009), off Iceland (Michelou *et al.* 2007) and near the Greenland and the Barents Sea (Cottrell *et al.* 2008, Zwirgmaier *et al.* 2008). Epifluorescence microscopy studies have also reported variable abundances of PE-rich cyanobacteria in Resolute Passage (Robineau *et al.* 1999). The highest cell numbers ($> 10^3$ cells ml⁻¹) were measured between Greenland and Barents Sea during the late summer (Zwirgmaier *et al.* 2008), in marine waters of lower salinities in Resolute Passage (Robineau *et al.* 1999) and in Mackenzie river and estuary as well as in coastal sites of Franklin Bay and Admundsen Gulf (Waleron *et al.* 2007). However,

Synechococcus abundances measured in the Arctic Ocean are generally lower. In two coastal sites from the Chukchi and Beaufort Seas, densities never exceed more than 100 cells mL⁻¹ (Cottrell et Kirchman 2009) and their concentrations decreased by an order of magnitude in offshore sites near Arctic pack ice (Robineau *et al.* 1999). Low cyanobacterial abundance (less than 24 cells mL⁻¹) were also measured in the East Greenland Current (Gradinger et Lenz 1989). During the Malina cruise in summer 2009, *Synechococcus* was completely lacking in Arctic waters of the Chukchi and Beaufort Seas (Balzano *et al.* 2012b) as observed previously (Li 1998). Extremes in day length and seasonal ice cover might be expected to result in unique impacts of photoheterotrophic microbes on carbon cycling in high-latitude waters. Interestingly cyanobacterial abundance did not vary significantly between summer and winter, probably due to heterotrophic activity during the dark period (Cottrell et Kirchman 2009). The origin of picocyanobacteria in the Arctic marine environment is controversial. Several authors argue for a strong contribution of allochthonous inputs like rivers or transport by advection from surrounding oceans (Gradinger et Lenz 1989, Vincent *et al.* 2000, Waleron *et al.* 2007) while others hypothesize for brackish communities autochthonous to the Arctic Ocean and adapted to cold environments (Cottrell et Kirchman 2009, Huang *et al.* 2012).

3.1.2. Diversity in the Arctic Ocean

Marine *Synechococcus* exhibits a high genetic diversity, and this genus has been subdivided into three main subclusters, 5.1, 5.2 and 5.3. Among numerous clades unveiled by different gene markers (more than 20 based on 16S-23S internally transcribed spacer), clades I, II, III and IV are dominant on a global scale (Zwirgmaier *et al.* 2008, Ahlgren et Rocap 2012). These lineages show different geographic niche exploitation. Clades I and IV dominate in nutrient-rich coastal waters at high latitudes, while clade II is widely distributed in subtropical and tropical oceanic waters (Zwirgmaier *et al.* 2008, Huang *et al.* 2012).

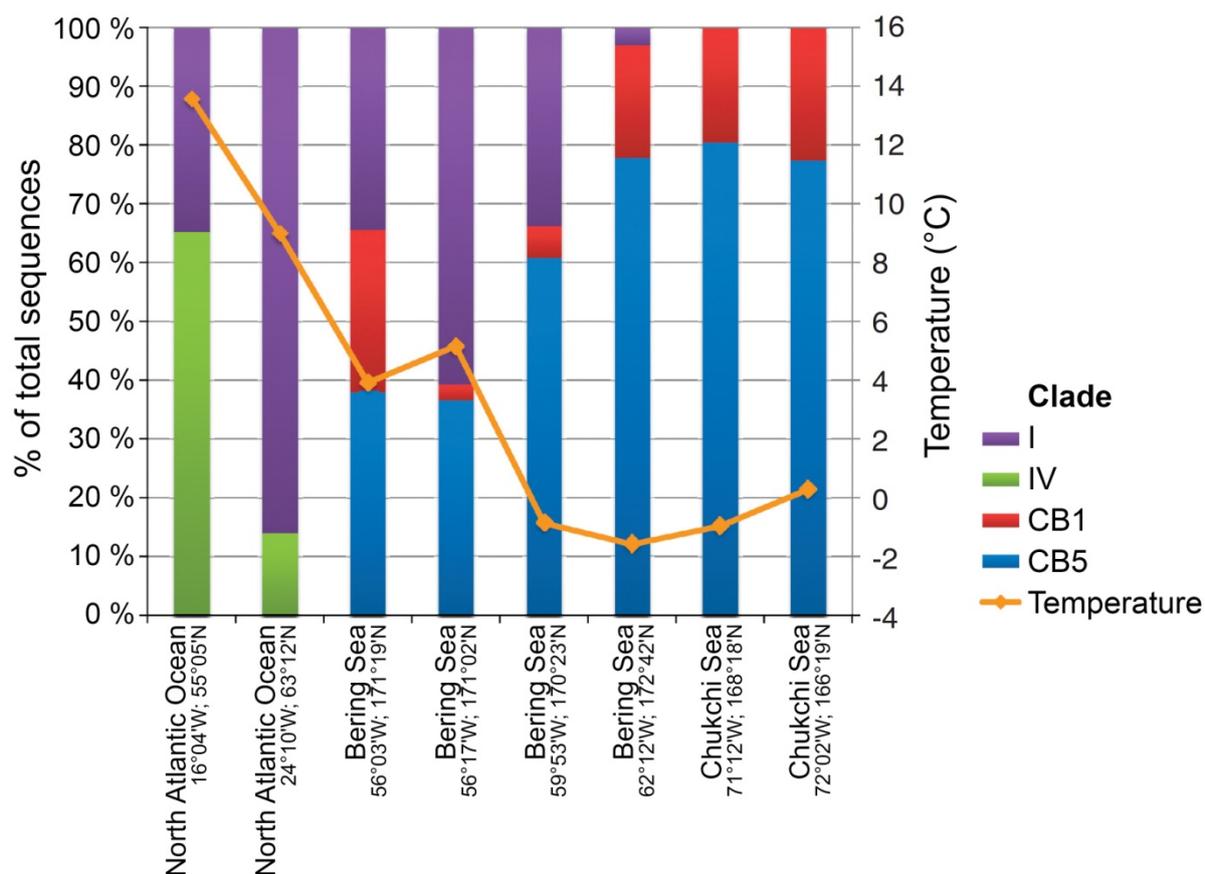


Fig. 2. *Synechococcus* community composition calculated from environmental sequences recovered in high-latitude regions. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: The ISME Journal (Huang *et al.* 2012).

Using 16S rRNA-targeted probes specific for *Synechococcus* clades, Zwirgmaier *et al.* (2008) showed that clades I and IV dominated *Synechococcus* populations in an area between Norwegian, Greenland and Barents Seas, both clades yielding approximately equal hybridization signals. The significance of these clades up to 62°N in the North Atlantic was further confirmed by Huang *et al.* (2012)(Fig. 2). In the southern Bering Sea (56-60°N) where clade IV was not detected, clade I constituted a significant portion of the *Synechococcus* community (Huang *et al.* 2012). In the latter study, a clear shift of *Synechococcus* community structure with increasing latitude and decreasing temperature was observed. Clade I occurred rarely or was not detected in the northern Bering Sea and Chukchi Sea (62-72°N) where the euryhaline clades CB1 and CB5 prevailed. Although these two clades were originally isolated from the Chesapeake Bay, their prevalence in the northern Bering Sea and the Chukchi Sea

suggest an autochthonous rather than a riverine or estuarine origin. Huang *et al.* (2012) argued that they did not amplify freshwater *Synechococcus* although the primer used could amplify them. In the Beaufort Sea that is strongly influenced by the Mackenzie River, only sequences closely related to freshwater *Synechococcus* were detected (Waleron *et al.* 2007).

Regarding their very low abundance in the polar oceans they probably have little impact on the pelagic carbon and energy flow in this part of the globe (Gradinger et Lenz 1989, Díez *et al.* 2012, Koh *et al.* 2012).

3.2. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria

Cyanobacteria are not the only bacteria that can use light energy. The well-known anaerobic anoxygenic phototrophic (AnAnP) bacteria are capable to grow autotrophically using light but only under strictly anoxic conditions, restricting them to benthic habitats in the marine environment (Yurkov et Beatty 1998). However, in the late 1970s, novel aerobic photosynthetic bacteria containing bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) were isolated from seaweeds, sand, bottom sediments, and seawater in the Bay of Tokyo (Harashima *et al.* 1978, Shiba *et al.* 1979). In contrast to their anaerobic counterparts, these organisms now called aerobic anoxygenic phototrophic (AAP) bacteria thrived in oxic conditions.

Rediscovered in the early 2000s, AAP bacteria were thought to be abundant and widespread in the euphotic zone of the open ocean and to contribute significantly to photosynthetically driven electron transport (Kolber *et al.* 2000, Kolber 2001, Rathgeber *et al.* 2004). In his pioneering work, Kolber *et al.* (2000) suggested that AAP bacteria might be abundant in nutrient-poor areas of the ocean where their ability to utilize light energy could provide an ecological advantage over chemoheterotrophic organisms. Latter studies showed that their abundance and distribution vary greatly among oceanic regimes, suggesting that

there is a broad range of potential ecological niches for these microbes (Cottrell *et al.* 2006, Mašín *et al.* 2006, Sieracki *et al.* 2006, Yutin *et al.* 2007, Lehours *et al.* 2010). It seems that AAP bacteria are more abundant in shelf and coastal areas than in the open ocean (Schwalbach et Fuhrman 2005, Sieracki *et al.* 2006). Although their abundance can be high in some oceanic regions (Lami *et al.* 2007), AAP bacteria typically constitute only a small percentage (2 to 4%) of total prokaryotes (Cottrell *et al.* 2006, Jiao *et al.* 2007) and can exceed 10% in estuaries (Waidner et Kirchman 2007, Cottrell *et al.* 2010). Despite the lower abundances in most oligotrophic pelagic marine environments, AAP bacteria constitute a very dynamic part of the bacterial community and potentially contribute significantly to the cycling of organic carbon in the upper ocean (Koblížek *et al.* 2007).

3.2.1. Abundance in the Arctic Ocean

Our current knowledge of the abundance and distribution of AAP bacteria in high-latitude waters is still limited. In the earliest study in the Arctic, AAP bacteria made up 5 to 8% of the total prokaryotic community in coastal waters of the Beaufort and Chukchi Seas (Cottrell et Kirchman 2009). No significant shifts in AAP bacterial abundance between summer and winter were reported. During the Malina cruise that crossed the Bering and Chukchi Sea and focused on the southern Beaufort Sea in summer 2009 (<http://http://Malina.obs-vlfr.fr>), we observed a strong decreasing gradient from the Mackenzie River to the open ocean with a mean AAP bacterial contribution of 7% in the Mackenzie mouth, 1% inshore, and 0.1% offshore (Boeuf *et al.* 2013a). Contrasting with this general pattern, high oceanic estimates (14.8%) close to values reported by Cottrell and Kirchman (2009) occurred at one site in the more productive waters of Chukchi Sea (Springer et McRoy 1993). Along the Mackenzie plume, high AAP abundances were found in surface waters (14 %) and in the benthic nepheloid layer (9%) caused by sediment resuspension and direct inputs of the river

(Matsuoka *et al.* 2011) (Fig. 3). Low AAP bacterial percentages in shelf and offshore Beaufort Sea samples resembled those reported in Antarctic waters of the Southern Ocean (Schwalbach et Fuhrman 2005) and in most oligotrophic temperate and tropical regions (Jiao *et al.* 2007, Lamy *et al.* 2011). These results were consistent with the trophic status of the Beaufort Sea that is quite oligotrophic in summer (Ortega-Retuerta *et al.* 2012a) with nearly undetectable nitrate levels during the Malina cruise. The high percentages of AAP

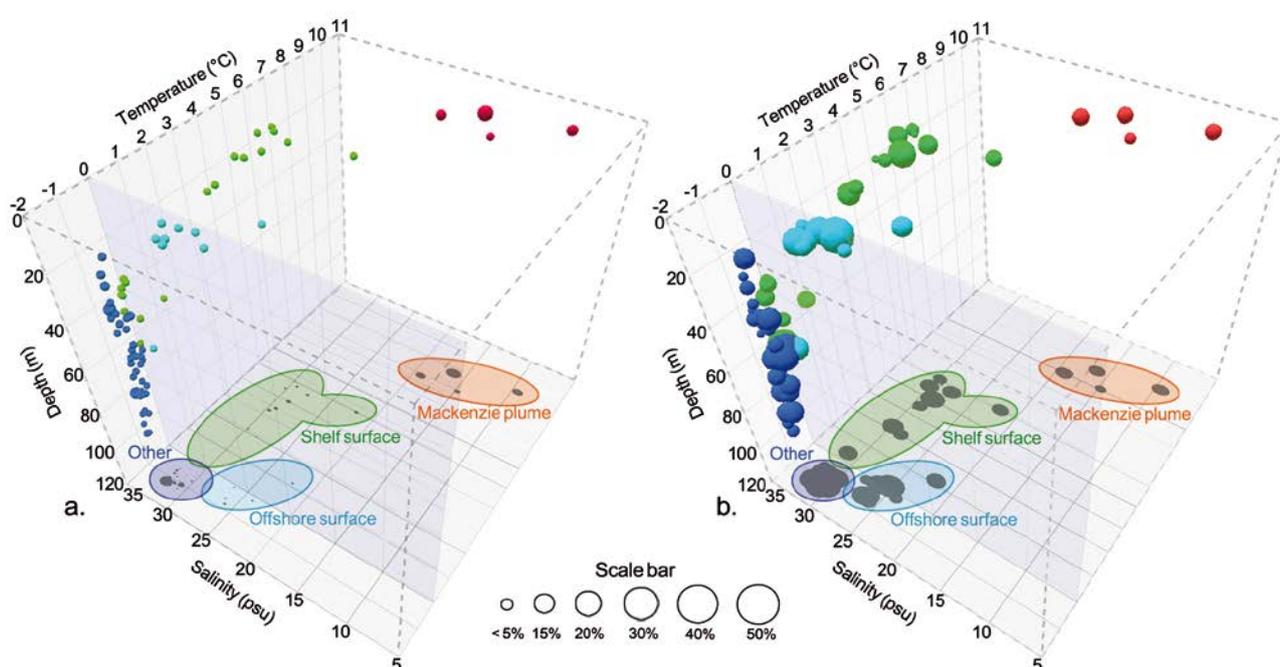


Fig.3. 3D visualization of relative abundances of AAP (a) and PR (b) bacteria obtained during the Malina cruise. The four types of samples defined on the basis of their temperature and salinity characteristics consisted of Mackenzie plume waters (red), shelf surface waters (green), offshore waters (light blue) and others (dark blue). The sphere sizes represent the relative proportions of each photoheterotrophic community for each sample, according to the scale bar. AAP proportions were calculated by dividing AAP bacteria (enumerated by infrared epifluorescence microscopy) by the total prokaryotic numbers (DAPI counts). Total PR proportions were calculated by summing the relative proportions of the 8 most abundant clades recovered in 19 PR clone libraries (Fig. 5). PR proportion of each clade was calculated by dividing its number of PR gene copies by its number of 16S rDNA copies (both obtained by qPCR). Proteorhodopsin values were normalized to 1.9 16S rRNA gene copies per cell. The cyan plan is the zero isotherm.

bacteria obtained in the Mackenzie surface plume were also in line with those recorded in estuarine systems such as Long Island Sound, Delaware Bay and Chesapeake Bay, where

these bacteria can constitute more than 10% of the prokaryotic community (Schwalbach et Fuhrman 2005, Sieracki *et al.* 2006, Waidner et Kirchman 2008, Cottrell *et al.* 2010).

3.2.2. Diversity in the Arctic Ocean

Our knowledge on the diversity of AAP bacteria has long been based on cultures. Currently known cultured AAP bacteria consisted in phylogenetically diverse members interspersed predominantly throughout the *Alphaproteobacteria* (Yurkov et Beatty 1998, Rathgeber *et al.* 2004), with one known betaproteobacterial representative, *Roseateles depolymerans* (Suyama *et al.* 1999), one described gammaproteobacterial species, *Congregibacter litoralis* (Eilers *et al.* 2001, Fuchs *et al.* 2007) and three unassigned gammaproteobacterial isolates (Cho et Giovannoni 2004, Cho *et al.* 2007a). AAP bacteria in environmental BAC and fosmid libraries or in environmental samples have been further successfully identified using known photosynthetic reaction center genes that are involved in bacteriochlorophyll biosynthetic pathways (Béjà *et al.* 2002). Wider PCR primers targeting *pufM* gene encoding the M subunit of bacterial photosynthetic reaction centers were further designed and successfully used to recover additional AAP bacterial diversity in a variety of environments (Yutin *et al.* 2005). Diverse AAP bacteria were also detected in large marine metagenomic libraries from the Atlantic and Pacific Oceans (Venter *et al.* 2004, Waidner et Kirchman 2005, DeLong *et al.* 2006, Yutin *et al.* 2007). Further studies indicated that AAP community structure can strongly differ depending on their geographical location (Jiao *et al.* 2007, Lehours *et al.* 2010, Jeanthon *et al.* 2011). All these efforts have shown AAP bacteria to be genetically diverse with members of the *Alpha*-, *Beta*-, and *Gammaproteobacteria*. Both targeted (Hu *et al.* 2006, Jiao *et al.* 2007, Lehours *et al.* 2010) and non-targeted (Yutin *et al.* 2007) diversity studies have shown that depending on the location and environment, members of either the *Alpha*- or *Gammaproteobacteria* typically dominate the marine AAP bacterial

community. For example, in the Baltic and Mediterranean Seas, most AAP bacteria were *Gammaproteobacteria* (Mašín *et al.* 2006, Jeanthon *et al.* 2011), while in the Global Ocean Sampling (GOS) expedition, the *Roseobacter*-like group of *Alphaproteobacteria* dominated the oligotrophic AAP bacterial community (Yutin *et al.* 2007).

Only a limited number of studies have examined the diversity of AAP bacteria in high-latitude waters. First investigations carried out in the permanently frozen freshwater Lake Fryxell (Antarctica) (Karr *et al.* 2003) revealed that AAP bacteria living in these habitats were distinct from their marine counterparts. The presence of *pufM* genes in Antarctic seawater and sea ice environment was further demonstrated by Koh *et al.* (2011). Using the same primer set, both these studies found that the AAP community were dominated by *Alphaproteobacteria*. Seawater clones were closely related to identified environmental clones and to *Roseobacter denitrificans*, the latter suggesting the presence of the widespread RCA cluster in Antarctic waters. In surface waters of the Chuckchi and Beaufort Seas, although *pufM* genes could be assigned to phylogroups previously identified in metagenomic shotgun sequences from the GOS expedition (Yutin *et al.* 2007), they were mostly distinct from genes retrieved in lower-latitude waters and Antarctic waters (Cottrell et Kirchman 2009, Koh *et al.* 2011, Boeuf *et al.* 2013a). By examining a couple of coastal sites in summer and winter, Cottrell and Kirchman (2009) revealed the presence of three phylogroups (Fig. 4). Two belonged to the *Rhodobacterales* which is one of the most common alphaproteobacterial order in polar and subpolar oceans (Selje *et al.* 2004, Niederberger *et al.* 2010, Ghiglione et Murray 2012). *Loktanella*-like *pufM* clones (phylotype F) dominated the libraries at both seasons whereas proportions of *Sulfitobacter*-related sequences (phylogroup E) increased in winter. Boeuf *et al.* (2013a) investigated more thoroughly the AAP diversity in the transition zone between offshore and Mackenzie-influenced coastal waters (southern Beaufort Sea) in summer. The presence of *pufM* genes grouping with that of *Sulfitobacter* species in most of the Beaufort

shelf was remarkable (Fig. 2) and supported by independent isolation of a large number of *Sulfitobacter* strains from most of the shelf and offshore stations. Whereas an equivalent number of *Loktanella* strains was isolated from the same locations, only one *Loktanella*-related sequence was retrieved by molecular cloning. The relative absence of *Loktanella* clones in the libraries was due strong sequence mismatches between the forward primer *pufMF* (Béjà *et al.* 2002) used for amplification and *Loktanella pufM* sequences.

The most striking observation raised by the high coverage of the Beaufort Sea during summer, was the widespread distribution of betaproteobacterial clades in the entire Beaufort shelf (Fig. 4). The most abundant betaproteobacterial clade exhibited a strong river to ocean gradient, suggesting that these bacteria grew in the Mackenzie River and then were mixed with Beaufort coastal waters. These results were in line with the fact that (i) betaproteobacterial *pufM* genes increased in summer coastal libraries (Cottrell et Kirchman 2009) at higher river flow, (ii) betaproteobacterial AAP bacteria are found in high proportions in estuarine or freshwater habitats (Yutin *et al.* 2007, Waidner et Kirchman 2008, Salka *et al.* 2011), and (iii) *Betaproteobacteria* are commonly found in the Mackenzie River where they are dominant (Garneau *et al.* 2006, Galand *et al.* 2008a).

Although Gammaproteobacteria represent one third of the bacterial community in arctic marine waters (Kirchman *et al.* 2010), no gammaproteobacterial AAPs were found at coastal sites of Chukchi and Beaufort Seas (Cottrell et Kirchman 2009) (Fig. 4). We confirmed this trend during the Malina cruise since only a few *pufM* clones belonging to the gammaproteobacterial phylogroup K were recovered in North Pacific Ocean samples but none were obtained at 62°N and above. Similarly, no clones of this phylogroup were found in Antarctic sea ice and seawater (Koh *et al.* 2011). This seems to indicate that polar waters are

exceptions to its widespread distribution (Yutin *et al.* 2007, Lehours *et al.* 2010, Jeanthon *et al.* 2011).

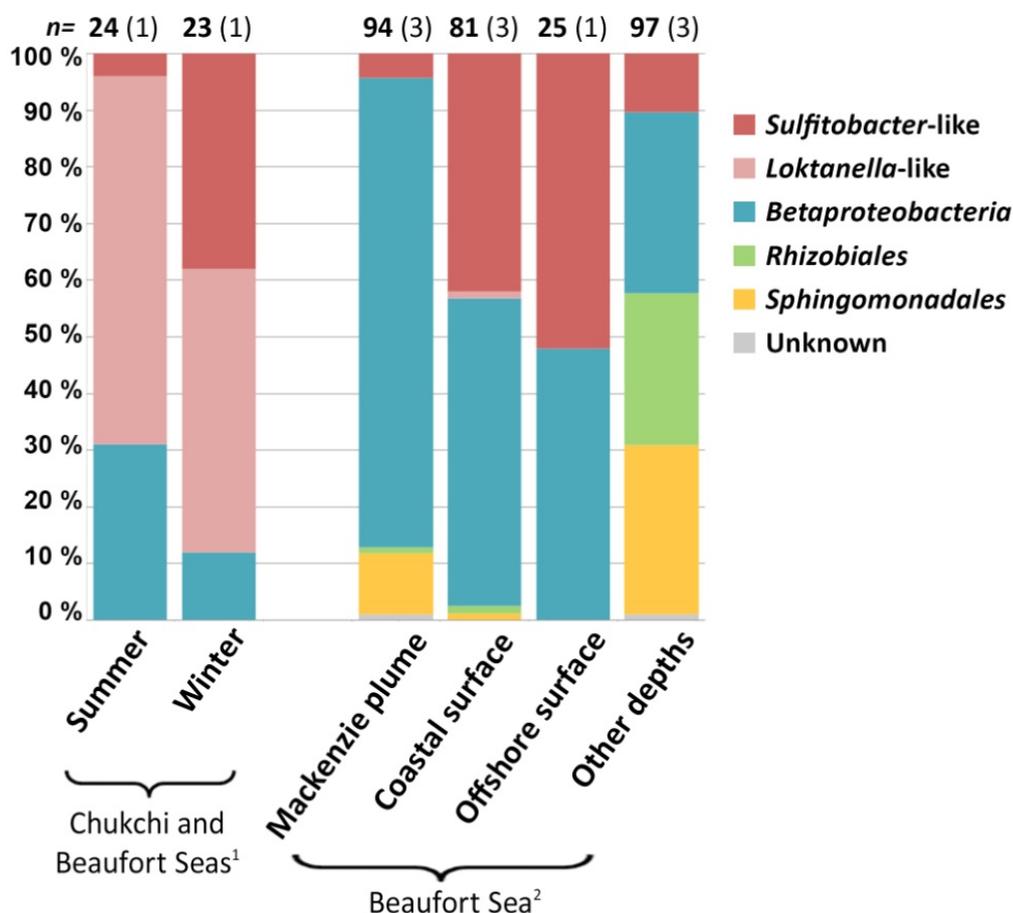


Fig. 4. Relative abundance of different *pufM* genes in clone libraries obtained from Arctic Ocean samples. Libraries were retrieved from coastal samples of the Chukchi and Beaufort Seas in summer and winter (Cottrell et Kirchman 2009) and from the Mackenzie plume, coastal and offshore surface waters and other depths (Boeuf *et al.* 2013b). The numbers of clones and libraries analyzed are indicated in bold and between brackets, respectively.

3.3 . Proteorhodopsin-containing bacteria

An additional type of phototrophy has also been recently discovered in marine surface waters. Proteorhodopsins (PR) are retinal-binding integral membrane proteins found via environmental genomics surveys in the early 2000s (Béjà *et al.* 2000, 2001, de la Torre *et al.* 2003, Venter *et al.* 2004). PR are homologues of bacteriorhodopsins discovered in the halophilic archeon *Halobacterium salinarum* four decades ago (Oesterhelt et Stoeckenius

1971). Their designation was based on the discovery of metagenomic fragments that linked the first discovered of these PR genes to a small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene defining the uncultivated marine gammaproteobacterial group SAR86 (Béjà *et al.* 2000). Rhodopsins belong to a widespread family of photoactive proteins found in all three domains of life. A common feature of these proteins is that they contain seven membrane-embedded α -helices that form an internal pocket in which the retinal is bound. Based on their functional roles, characterized rhodopsin proteins have been classified into three distinct groups: (i) transmembrane proton pumps (bacteriorhodopsins, proteorhodopsins and xanthorhodopsins), involved in energy generation, (ii) transmembrane chloride pumps (halorhodopsins), involved in the maintenance of osmotic balance, and (iii) light sensors (sensory rhodopsins), which direct positive and/or negative phototaxis.

The first proteorhodopsin was found on a genomic fragment originating from the uncultured SAR86 group II, a gammaproteobacterial group widespread in marine plankton (Béjà *et al.* 2000). Subsequent PCR-based gene surveys, screenings of BAC and fosmid libraries, metagenomic and genome analyses have identified a wide variety of PR genes (Béjà *et al.* 2001, de la Torre *et al.* 2003, Man *et al.* 2003, Venter *et al.* 2004, Gómez-Consarnau *et al.* 2007, Rusch *et al.* 2007). PRs were found in diverse bacterial groups, including the ubiquitous SAR11 groups (Giovannoni *et al.* 2005a, Giovannoni et Stingl 2005), the abundant coastal clade SAR 92 (Stingl *et al.* 2007a), as well as in *Roseobacter* HTCC 2255, marine *Flavobacteria* (Gómez-Consarnau *et al.* 2007, González *et al.* 2008, Riedel *et al.* 2010, Yoshizawa *et al.* 2012) and planktonic *Archaea* (Frigaard *et al.* 2006). The phylogeny of the PR gene does not always coincide with those of typical phylogenetic marker genes, indicating that some bacteria and archaea may have obtained it via lateral gene transfer (Sabehi *et al.* 2004, Frigaard *et al.* 2006). PRs were so far detected in different marine environments,

mainly in the open ocean, but also in freshwater, estuarine and brackish ecosystems (Rusch *et al.* 2007, Atamna-Ismaeel *et al.* 2008). Known PR genes encode pigments with two distinct light absorption spectra, commonly referred to as blue-absorbing PRs and green-absorbing PRs (Béjà *et al.* 2001, Man *et al.* 2003). The distribution of these different light-absorbing proteorhodopsin pigments is depth-dependent, with green-absorbing PRs mainly in surface and coastal waters, whereas a trend for blue-absorbing PRs in the open ocean and deeper waters has been observed (Béjà *et al.* 2001, Sabehi *et al.* 2007).

3.3.1. Diversity in the Arctic Ocean

Only very few molecular surveys have reported PR bacteria in marine polar waters. Antarctic PR sequences have been detected in coastal surface waters near Anvers island, Western Antarctic Peninsula (Béjà *et al.* 2000, Williams *et al.* 2012a) and in sea ice and brine samples of the Ross Sea (Koh *et al.* 2010). Sequences analyses revealed that Antarctic PRs showed similarity to previously reported PR sequences, although most of the sequences were generally distinct. Cottrell and Kirchman (2009) reported the first study on PR bacterial diversity in Arctic waters. Although limited to a couple of coastal sites, this study revealed a diverse collection of PR genes, only a few of them belonging to previously identified groups. Clones libraries were mainly composed of green-absorbing *Alpha*- and *Gammaproteobacteria* and their composition changed between summer and winter (Fig. 5). During the Malina cruise in the Beaufort Sea, we surveyed the PR diversity in different water masses using the same primer set and compared the composition of DNA and cDNA libraries (Fig. 5). An alphaproteobacterial group entirely composed of arctic sequences that we called “Arctic” dominated in most surface libraries confirming earlier results of Cottrell & Kirchman (2009). Contributions of SAR11 sequences were higher in cDNA than in DNA libraries, suggesting that this clade is highly active in arctic waters. With the exception of Mackenzie plume

samples, high proportions of gammaproteobacterial PR mostly composed of SAR92-like and IMCC2047-like sequences were found in DNA libraries. Only a few clones aligned with the SAR86 clade of PR genes, which was reported to comprise the majority of Antarctic pelagic PR sequences (Béjà *et al.* 2001). Additionally, coastal surface and Mackenzie plume libraries contained significant amounts of *Flavobacteria* sequences. Contrasting to AAP community composition, only a limited number of betaproteobacterial PR sequences were obtained along the Mackenzie plume although primer sets targeting freshwater clades were specifically tested. Only a limited number of Beaufort Sea sequences matched closely with Antarctic sequences, supporting the fact that PR genes from the Northern and Southern Hemispheres are not similar.

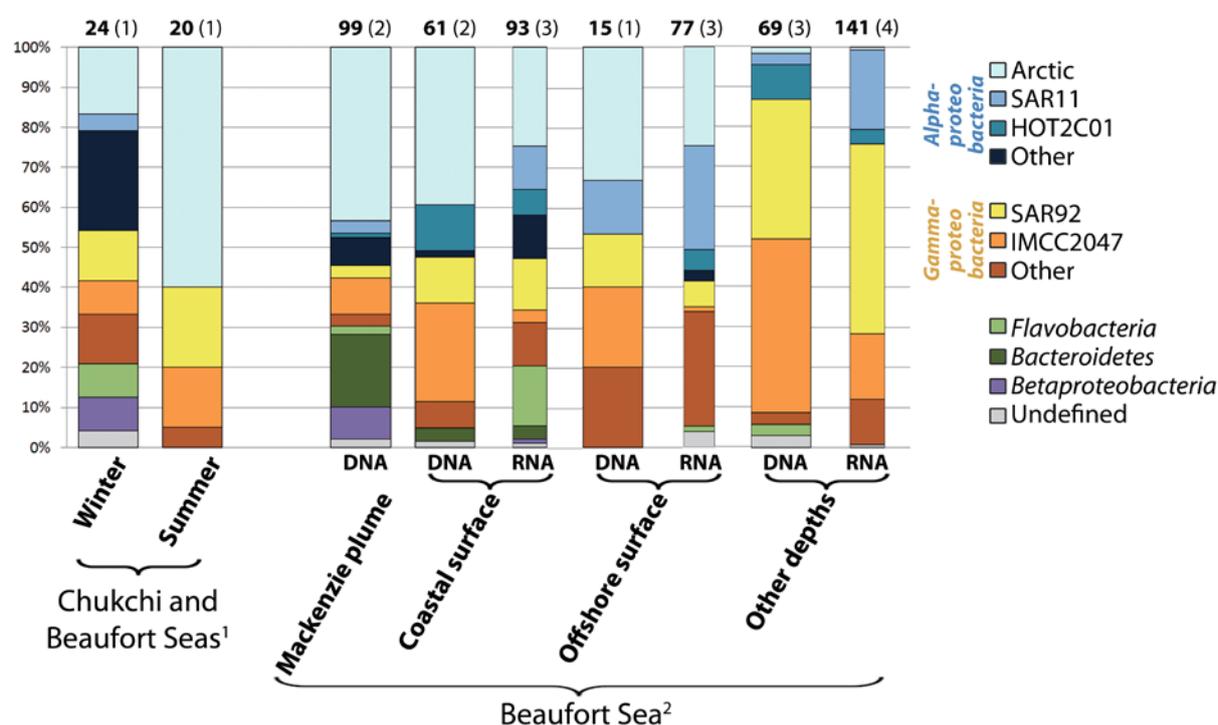


Fig. 5. Relative abundance of different PR genes in clone libraries obtained from Arctic Ocean samples. Libraries were retrieved from coastal samples of the Chukchi and Beaufort Seas in summer and winter (Cottrell et Kirchman 2009) and from the Mackenzie plume, coastal and offshore surface waters and other depths (Boeuf *et al.* 2013b). The numbers of clones and libraries analyzed are indicated in bold and between brackets, respectively.

3.3.2. Abundance in the Arctic Ocean

Several studies have examined the diversity and geographic distribution of PR genes, but there are few estimates of PR gene abundance in the oceans. Unlike cyanobacteria and AAP bacteria, PR-containing microbes cannot be quantified using direct enumeration techniques such as flow cytometry or epifluorescence microscopy. Quantitative real-time PCR (qPCR) is the technique that is most generally used for examining the spatial and temporal distribution of PR prokaryotes (Campbell *et al.* 2008, Riedel *et al.* 2010) and measuring the expression of PR genes (Lami *et al.* 2009). Alternatively, the abundance of PR genes has been estimated from the frequency of PR-bearing clones in environmental genomic libraries (Venter *et al.* 2004, Sabehi *et al.* 2005, Rusch *et al.* 2007).

PR bacteria have been estimated to contribute for up to 65% (mean of 50%) of the total bacterial community in the Sargasso Sea, from 7 to 57% (mean of 23%) in the North Atlantic Ocean, about 13% in the Mediterranean Sea and 35% in the North Sea (Venter *et al.* 2004, Sabehi *et al.* 2005, Rusch *et al.* 2007, Campbell *et al.* 2008, Riedel *et al.* 2010). Alphaproteobacterial groups represent generally the highest fraction among PR bacteria. Among them, the ubiquitous SAR11-like cluster is the sole to contribute to 10% of the overall community and almost 18% in the Sargasso and Mediterranean Seas (Campbell *et al.* 2008, Jeanthon et Boeuf in prep.).

In the polar marine waters, PR bacteria were detected throughout the annual cycle (Cottrell et Kirchman 2009, Williams *et al.* 2012a) but their abundance has not been extensively assessed. Cottrell and Kirchman (2009) compared the seasonal abundance of two clades retrieved from two coastal sites of the Chukchi and Beaufort Seas. Their abundance was not found to differ significantly between summer and winter. Using the set of PR sequences previously amplified from the Beaufort Sea (Boeuf *et al.*, 2013b), we designed qPCR primers to target 8 groups of PR genes among the most abundant in the libraries. By

adding together their abundance estimates, we estimated that these groups accounted between 0.9% and 44.7% (mean of 15.3%) of the total bacterial community (Fig. 3) (Boeuf *et al.* 2013b). The ubiquitous SAR11-like PR clade dominated in the Beaufort Sea and was preferentially distributed offshore and above the DCM layer where mean contributions exceeded 10% of the total bacterial community (Fig. 6). This contribution is close to the percentage of SAR11 16S rRNA gene determined from pyrosequencing data obtained from the western Arctic Ocean (Kirchman *et al.* 2010). Consistent with clone library data, the “Arctic” clade, second most abundant PR clade in the libraries, was preferentially distributed in surface waters. It represented up to 24% of the offshore bacterial community. The alphaproteobacterial HOT2C01 cluster was found in high proportions in Sargasso Sea (26%) while decreasing to 8% in the North Atlantic (Campbell *et al.* 2008). In the Beaufort Sea, this cluster was mostly present in coastal areas but its contribution was low (2%). Surprisingly, although proportions of PR gammaproteobacteria were high in most clone libraries and overdominated in deep libraries (Fig. 5), they represented in all samples a minor fraction of the total bacterial community (mean < 1%). These results indicate that estimates of gene abundance based on frequencies in clone libraries need to be cautiously interpreted. Our data further supports the notion that different PR types are abundant in different ocean regimes (Rusch *et al.* 2007) and indicates that other factors than light may control the abundance of different types of PR in arctic marine waters.

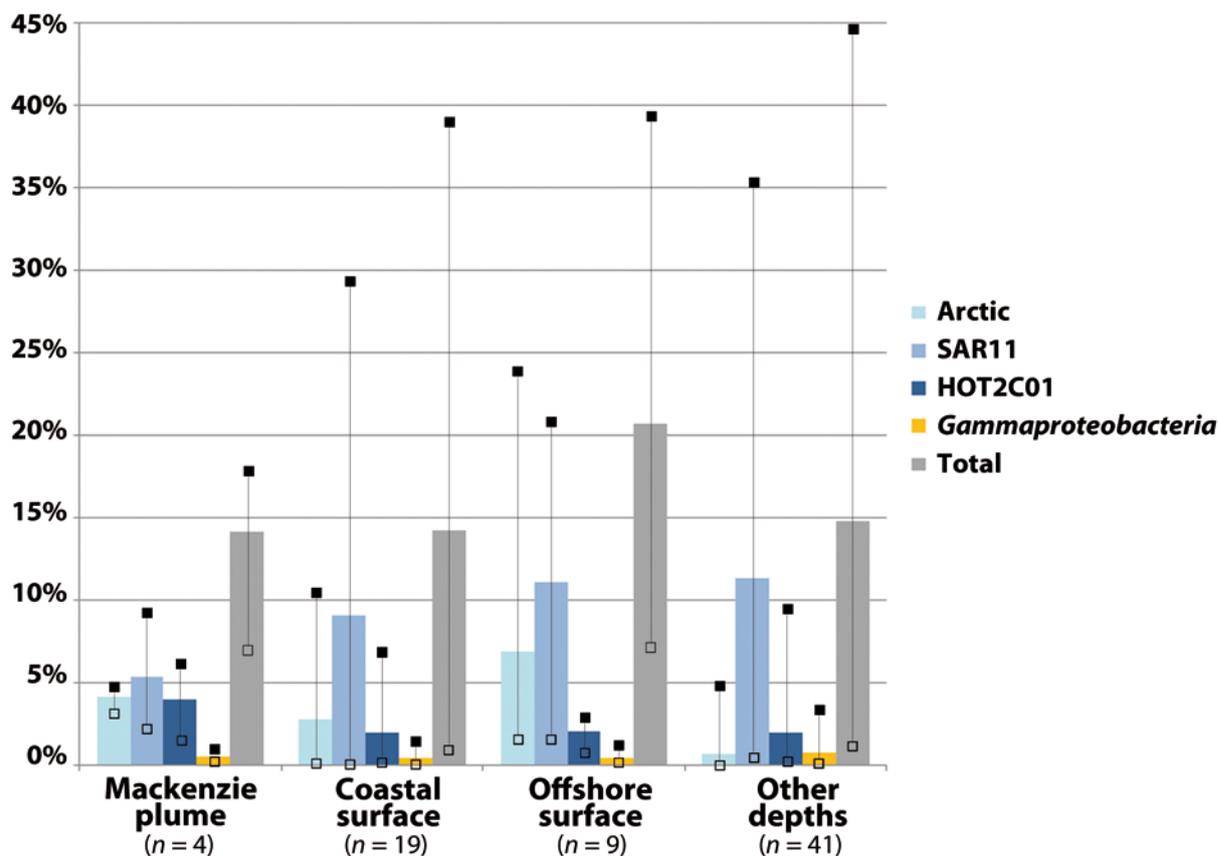


Fig. 6. Relative abundance of major PR bacterial clades recovered in the libraries constructed from Beaufort Sea samples.

4. Potential impact of global change

The Arctic Ocean is both a key player in global climate regulation as well as a particularly sensitive system that has already undergone serious perturbations due to climate warming (Peterson *et al.* 2002, Camill 2005). The total volume and extent of the sea ice are reducing (Walsh 2008) leading to an increase of river runoff (Peterson *et al.* 2002) and a decrease in the surface layer salinity of the Arctic Ocean (ACIA 2005). An additional consequence is the accelerating permafrost melting (Nelson 2003) and coastal erosion (Rachold *et al.* 2000). The increasing delivery of organic carbon is suspected to enhance the mineralization process carried out by heterotrophic bacteria in the estuarine and coastal Arctic Ocean (Meon et Amon 2004) and thus release a large amount of CO₂ in atmosphere (Kling *et al.* 1991). Excluding the potential shift of surrounding Oceans connections, currents and

icecap drifting (Hopcroft *et al.* 2008) that may profoundly affect bacterial communities at both regional and global scales, global warming could impact bacterioplankton by modifying its local environment (physical aspect) and its nutrient sources and interactions in the food web (biotic aspect). The lengthening of the open-water period is likely to stimulate primary production via increased light availability, which in turn would enhance bacteria production (Arrigo *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2010). These models all assume that more open water will lead to increased mixing and entrainment of nutrients into the upper water column. Alternatively, the freshening of the Arctic could lead to stronger salinity stratification and fewer nutrients being entrained into the euphotic zone.

In the Beaufort Sea, distributions of AAP and PR bacteria and their relationships with environmental parameters show strong differences. The most abundant AAP bacterial clade OTU6 is strongly influenced by nutrient-rich river inputs while major clades of PR bacteria prevailed in offshore oligotrophic waters. The freshening of the arctic coastal regions could therefore favor the survival of halotolerant freshwater AAP bacteria like those in OTU 6 and expansion of their habitat. Yet, we do not know the impact of phototrophic light harvesting on energy requirements and carbon metabolism of these bacteria. Future studies have to reveal their role in biogeochemical cycling in coastal-transition ecosystems.

The decrease in ice thickness and the shift from perennial ice pack to seasonal ice (Perovich 2011) could favor under-ice massive phytoplankton blooms in the Arctic (Arrigo *et al.* 2012). Such structural shifts of Arctic marine ecosystems could in turn be favorable to AAP bacteria of the *Roseobacter* clade (González *et al.* 2000) and PR groups (*Flavobacteriaceae*, alphaproteobacterial OTU3, and gammaproteobacterial OTU11) that exhibit a strong responsiveness to phytoplankton blooms. A long-term consequence of further increasing stratification will be reduction of the vertical flux of nutrients to the euphotic zone

and decreasing productivity. Low-nutrient conditions in the upper Beaufort Sea could therefore be particularly favorable to bacterial groups adapted to oligotrophic conditions (SAR11 and other alphaproteobacterial PR groups) whose photoheterotrophic capabilities provide a competitive advantage (Gómez-Consarnau *et al.* 2010, Steindler *et al.* 2011).

The current knowledge suggests that microbial processes in the Arctic Ocean are particularly sensitive to small changes in their environment and have potentially large impacts on carbon flows and other ecosystem functions. How photoheterotrophic microbes adjust to these changes will have impacts on the marine ecosystem of the Arctic Ocean. Understanding how they interact and influence higher food webs as well as biogeochemical cycling in this system is necessary. Future research should include a thorough examination of seasonal influences and communities present in distinct water bodies and in less explored central Arctic regions.

Acknowledgements

This study was conducted as part of the Malina Scientific Program funded by ANR (Agence nationale de la recherche), INSU-CNRS (Institut national des sciences de l'univers – Centre national de la recherche scientifique), CNES (Centre national d'études spatiales) and ESA (European Space Agency). We thank all participants to the Malina cruise for their help, especially M. Babin who coordinated the project, K. Lévesque for the logistics, and all *CCGS Amundsen* crew members. D. Boeuf was supported by a grant from the French Ministry of Higher Education and Research. The publication of this article is financed by CNRS-INSU

References

- Aagaard, K., and Coachman, L.: Toward an ice-free Arctic ocean, *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 56, 484-486, 1975.
- Aagaard, K., Swift, J., and Carmack, E.: Thermohaline circulation in the Arctic Mediterranean seas, *J. Geophys. Res.*, 90, 4833-4846, 1985.
- ACIA: Arctic climate impact assessment, Cambridge University Press, 1042p. pp., 2005.
- Ahlgren, N. A., and Rocap, G.: Diversity and distribution of marine *Synechococcus*: multiple gene phylogenies for consensus classification and development of qPCR assays for sensitive measurement of clades in the ocean, *Frontiers in Microbiology*, 3, 10.3389/fmicb.2012.00213, 2012.
- Amon, R. M. W.: The Role of Dissolved Organic Matter for the Organic Carbon Cycle in the Arctic Ocean, in: *The organic carbon cycle in the Arctic Ocean*, edited by: Stein, R., and Macdonald, R. W., Springer, Berlin, 83-99, 2004.
- Arrigo, K. R., van Dijken, G., and Pabi, S.: Impact of a shrinking Arctic ice cover on marine primary production, *Geophys Res Lett*, 35, 1-6, 2008.
- Arrigo, K. R., Perovich, D. K., Pickart, R. S., Brown, Z. W., van Dijken, G. L., Lowry, K. E., Mills, M. M., Palmer, M. A., Balch, W. M., and Bahr, F.: Massive phytoplankton blooms under Arctic Sea ice, *Science*, 336, 1408-1408, 2012.
- Atamna-Ismaeel, N., Sabehi, G., Sharon, I., Witzel, K. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Barkay, T., Stomp, M., Huisman, J., and Beja, O.: Widespread distribution of proteorhodopsins in freshwater and brackish ecosystems, *ISME J*, 2, 656-662, 2008.
- Baldwin, A. J., Moss, J. A., Pakulski, J. D., Catala, P., Joux, F., and Jeffrey, W. H.: Microbial diversity in a Pacific Ocean transect from the Arctic to Antarctic circles, *Aquat Microb Ecol*, 41, 91-102, 2005.
- Balzano, S., Marie, D., Gourvil, P., and Vaultot, D.: Composition of the summer photosynthetic pico and nanoplankton communities in the Beaufort Sea assessed by T-RFLP and sequences of the 18S rRNA gene from flow cytometry sorted samples, *ISME J*, 6, 1480-1498, 2012.
- Bano, N., and Hollibaugh, J. T.: Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean, *Appl Environ Microbiol*, 68, 505, 2002.
- Bano, N., Ruffin, S., Ransom, B., and Hollibaugh, J. T.: Phylogenetic composition of Arctic Ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages, *Appl Environ Microbiol*, 70, 781-789, 2004.
- Béjà, O., Aravind, L., Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L. P., Jovanovich, S. B., Gates, C. M., Feldman, R. A., Spudich, J. L., Spudich, E. N., and DeLong, E. F.: Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea, *Science*, 289, 1902-1906, 10.1126/science.289.5486.1902, 2000.
- Béjà, O., Spudich, E. N., Spudich, J. L., Leclerc, M., and DeLong, E. F.: Proteorhodopsin phototrophy in the ocean, *Nature*, 411, 786-789, 2001.
- Béjà, O., Suzuki, M. T., Heidelberg, J. F., Nelson, W. C., Preston, C. M., Hamada, T., Eisen, J. A., Fraser, C. M., and DeLong, E. F.: Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs, *Nature*, 415, 630-633, 2002.
- Béjà, O., and Suzuki, M. T.: Photoheterotrophic marine prokaryotes, in: *Microbial Ecology of the Oceans*, 2nd ed., edited by: Kirchman, D. L., Wiley-Blackwell, New York, 131-157, 2008.
- Boeuf, D., Cottrell, M. T., Kirchman, D., Lebaron, P., and Jeanthon, C.: Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean, *FEMS Microbiology Ecology* (in press), 2013a.
- Boeuf, D., Lami, R., Cunnington, E., Lebaron, P., and Jeanthon, C.: Ecological Significance of Proteorhodopsin-containing Bacteria in the Arctic Ocean (submitted), 2013b.
- Bowman, J. S., Rasmussen, S., Blom, N., Deming, J. W., Rysgaard, S., and Sicheritz-Ponten, T.: Microbial community structure of Arctic multiyear sea ice and surface seawater by 454 sequencing of the 16S RNA gene, *ISME J*, 6, 11-20, 2012.

- Buck, K., Chavez, F., and Campbell, L.: Basin-wide distributions of living carbon components and the inverted trophic pyramid of the central gyre of the North Atlantic Ocean, summer 1993, *Aquat Microb Ecol*, 10, 283-298, 1996.
- Camill, P.: Permafrost thaw accelerates in boreal peatlands during late-20th century climate warming, *Clim Change*, 68, 135-152, 2005.
- Campbell, B. J., Waidner, L. A., Cottrell, M. T., and Kirchman, D. L.: Abundant proteorhodopsin genes in the North Atlantic Ocean, *Environ Microbiol*, 10, 99-109, 2008.
- Carmack, E., Barber, D., Christensen, J., Macdonald, R., Rudels, B., and Sakshaug, E.: Climate variability and physical forcing of the food webs and the carbon budget on panarctic shelves, *Prog Oceanogr*, 71, 145-181, 2006.
- Carmack, E., and Wassmann, P.: Food webs and physical-biological coupling on pan-Arctic shelves: Unifying concepts and comprehensive perspectives, *Prog. Oceanogr.*, 71, 446-477, 2006.
- Cauwet, G., and Sidorov, I.: The biogeochemistry of Lena River: organic carbon and nutrients distribution, *Mar Chem*, 53, 211-227, 1996.
- Cho, J. C., and Giovannoni, S. J.: Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 432-440, 10.1128/aem.70.1.432-440.2004, 2004.
- Cho, J. C., Stapels, M. D., Morris, R. M., Vergin, K. L., Schwalbach, M. S., Givan, S. A., Barofsky, D. F., and Giovannoni, S. J.: Polyphyletic photosynthetic reaction centre genes in oligotrophic marine Gammaproteobacteria, *Environ Microbiol*, 9, 1456-1463, 2007.
- Coachman, L. K., and Aagaard, K.: Physical Oceanography of Arctic and Subarctic Seas, DTIC Document, 1974.
- Collins, R. E., Rocap, G., and Deming, J. W.: Persistence of bacterial and archaeal communities in sea ice through an Arctic winter, *Environ Microbiol*, 12, 1828-1841, 2010.
- Cottrell, M. T., Mannino, A., and Kirchman, D. L.: Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mid-Atlantic Bight and the North Pacific Gyre, *Appl Environ Microbiol*, 72, 557-564, 10.1128/AEM.72.1.557-564.2006, 2006.
- Cottrell, M. T., Michelou, V. K., Nemcek, N., DiTullio, G., and Kirchman, D. L.: Carbon cycling by microbes influenced by light in the Northeast Atlantic Ocean, *Aquat Microb Ecol*, 50, 239-250, 2008.
- Cottrell, M. T., and Kirchman, D. L.: Photoheterotrophic microbes in the Arctic Ocean in summer and winter, *Appl Environ Microbiol*, 75, 4958-4966, 2009.
- Cottrell, M. T., Ras, J., and Kirchman, D. L.: Bacteriochlorophyll and community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in a particle-rich estuary, *ISME J*, 4, 945-954, 2010.
- de la Torre, J. R.: Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 12830-12835, 2003.
- DeLong, E. F., Wu, K. Y., Prézelin, B. B., and Jovine, R. V.: High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton, *Nature*, 371, 695-697, 1994.
- DeLong, E. F., Preston, C. M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S. J., Frigaard, N. U., Martinez, A., Sullivan, M. B., Edwards, R., and Brito, B. R.: Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior, *Science*, 311, 496-503, 2006.
- Díez, B., Bergman, B., Pedrós-Alió, C., Antó, M., and Snoeijs, P.: High cyanobacterial *nifH* gene diversity in Arctic seawater and sea ice brine, *Environ Microbiol Rep*, 4, 360-366, 2012.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Peplies, J., Glockner, F. O., Gerdt, G., and Amann, R.: Isolation of novel pelagic bacteria from the German bight and their seasonal contributions to surface picoplankton, *Appl Environ Microbiol*, 67, 5134-5142, 2001.
- Elifantz, H., Dittel, A. I., Cottrell, M. T., and Kirchman, D. L.: Dissolved organic matter assimilation by heterotrophic bacterial groups in the western Arctic Ocean, *Aquat Microb Ecol*, 50, 39, 2007.
- Ferrari, V., and Hollibaugh, J.: Distribution of microbial assemblages in the Central Arctic Ocean Basin studied by PCR/DGGE: analysis of a large data set, *Hydrobiologia*, 401, 55-68, 1999.
- Frigaard, N. U., Martinez, A., Mincer, T. J., and DeLong, E. F.: Proteorhodopsin lateral gene transfer between marine planktonic Bacteria and Archaea, *Nature*, 439, 847-850, 2006.
- Fuchs, B. M., Spring, S., Teeling, H., Quast, C., Wulf, J., Schattenhofer, M., Yan, S., Ferriera, S., Johnson, J., Glockner, F. O., and Amann, R.: Characterization of a marine

- gammaproteobacterium capable of aerobic anoxygenic photosynthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 2891-2896, 2007.
- Galand, P. E., Lovejoy, C., and Vincent, W. F.: Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean, *Aquat Microb Ecol*, 44, 115-126, 2006.
- Galand, P. E., Lovejoy, C., Pouliot, J., Garneau, M. E., and Vincent, W. F.: Microbial community diversity and heterotrophic production in a coastal Arctic ecosystem: A stamukhi lake and its source waters, *Limnol Oceanogr*, 53, 813-823, 2008a.
- Galand, P. E., Lovejoy, C., Pouliot, J., and Vincent, W. F.: Heterogeneous archaeal communities in the particle-rich environment of an arctic shelf ecosystem, *J Mar Syst*, 74, 774-782, 2008b.
- Galand, P. E., Lovejoy, C., Hamilton, A. K., Ingram, R. G., Pedneault, E., and Carmack, E. C.: Archaeal diversity and a gene for ammonia oxidation are coupled to oceanic circulation, *Environ Microbiol*, 11, 971-980, 2009.
- Galand, P. E., Potvin, M., Casamayor, E. O., and Lovejoy, C.: Hydrography shapes bacterial biogeography of the deep Arctic Ocean, *ISME J*, 4, 564-576, 2010.
- Garneau, M. È., Vincent, W. F., Alonso-Sáez, L., Gratton, Y., and Lovejoy, C.: Prokaryotic community structure and heterotrophic production in a river-influenced coastal arctic ecosystem, *Aquat Microb Ecol*, 42, 27-40, 2006.
- Garneau, M. È., Roy, S., Lovejoy, C., Gratton, Y., and Vincent, W. F.: Seasonal dynamics of bacterial biomass and production in a coastal arctic ecosystem: Franklin Bay, western Canadian Arctic, *J Geophys Res*, 113, C07S91, 2008.
- Ghiglione, J., and Murray, A.: Pronounced summer to winter differences and higher wintertime richness in coastal Antarctic marine bacterioplankton, *Environ Microbiol*, 14, 617-629, 2012.
- Ghiglione, J. F., Galand, P. E., Pommier, T., Pedrós-Alió, C., Maas, E. W., Bakker, K., Bertilson, S., Kirchman, D. L., Lovejoy, C., and Yager, P. L.: Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 17633-17638, 2012.
- Giovannoni, S. J., Bibbs, L., Cho, J. C., Stapels, M. D., Desiderio, R., Vergin, K. L., Rappé, M. S., Laney, S., Wilhelm, L. J., and Tripp, H. J.: Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11, *Nature*, 438, 82-85, 2005.
- Giovannoni, S. J., and Stingl, U.: Molecular diversity and ecology of microbial plankton, *Nature*, 437, 343-348, 2005.
- Gómez-Consarnau, L., González, J. M., Coll-Lladó, M., Gourdon, P., Pascher, T., Neutze, R., Pedrós-Alió, C., and Pinhassi, J.: Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine Flavobacteria, *Nature*, 445, 210-213, 2007.
- Gómez-Consarnau, L., Akram, N., Lindell, K., Pedersen, A., Neutze, R., Milton, D. L., González, J. M., and Pinhassi, J.: Proteorhodopsin phototrophy promotes survival of marine bacteria during starvation, *PLoS Biol*, 8, e1000358, 2010.
- González, J. M., Simó, R., Massana, R., Covert, J. S., Casamayor, E. O., Pedrós-Alió, C., and Moran, M. A.: Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom, *Appl Environ Microbiol*, 66, 4237-4246, 2000.
- González, J. M., Fernández-Gómez, B., Fernández-Guerra, A., Gómez-Consarnau, L., Sánchez, O., Coll-Lladó, M., Del Campo, J., Escudero, L., Rodríguez-Martínez, R., and Alonso-Sáez, L.: Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (Flavobacteria), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 8724, 2008.
- Gradinger, R., and Lenz, J.: Picocyanobacteria in the high Arctic, *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 52, 99-101, 1989.
- Harashima, K., Shiba, T., Totsuka, T., Simidu, U., and Taga, N.: Occurrence of bacteriochlorophyll *a* in a strain of an aerobic heterotrophic bacterium, *Agric Biol Chem*, 42, 1627-1628, 1978.
- Hopcroft, R., Bluhm, B., Gradinger, R., Whitley, T., Weingartner, T., Norcross, B., and Springer, A.: Arctic ocean synthesis: Analysis of climate change impacts in the Chukchi and beaufort seas with strategies for future research, Fairbanks, AK: University of Alaska, Fairbanks, Institute of Marine Science, 2008.

- Hu, Y., Du, H., Jiao, N., and Zeng, Y.: Abundant presence of the γ -like Proteobacterial *pufM* gene in oxic seawater, *FEMS Microbiol Lett*, 263, 200-206, 2006.
- Huang, S., Wilhelm, S. W., Harvey, H. R., Taylor, K., Jiao, N., and Chen, F.: Novel lineages of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in the global oceans, *ISME J*, 6, 285-297, 2012.
- Jeanthon, C., Boeuf, D., Dahan, O., Le Gall, F., Garczarek, L., Bendif, E. M., and Lehours, A. C.: Diversity of cultivated and metabolically active aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea, *Biogeosciences*, 8, 1955-1970, 10.5194/bg-8-1955-2011, 2011.
- Jeanthon, C., and Boeuf, D.: Ecological Significance of Proteorhodopsin-containing Bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea, in prep.
- Jiao, N., Zhang, Y., Zeng, Y., Hong, N., Liu, R., Chen, F., and Wang, P.: Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean, *Environ Microbiol*, 9, 3091-3099, 2007.
- Johnson, Z. I., Zinser, E. R., Coe, A., McNulty, N. P., Woodward, E. M. S., and Chisholm, S. W.: Niche partitioning among *Prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients, *Science*, 311, 1737-1740, 2006.
- Kaneko, T., Atlas, R. M., and Krichevsky, M.: Diversity of bacterial populations in the Beaufort Sea, *Nature*, 270, 596-599, 1977.
- Karr, E. A., Sattley, W. M., Jung, D. O., Madigan, M. T., and Achenbach, L. A.: Remarkable diversity of phototrophic purple bacteria in a permanently frozen Antarctic lake, *Appl Environ Microbiol*, 69, 4910, 2003.
- Kellogg, C. T., and Deming, J. W.: Comparison of free-living, suspended particle, and aggregate-associated bacterial and archaeal communities in the Laptev Sea, *Aquat Microb Ecol*, 57, 1, 2009.
- Kirchman, D. L., Elifantz, H., Dittel, A. I., Malmstrom, R. R., and Cottrell, M. T.: Standing stocks and activity of Archaea and Bacteria in the western Arctic Ocean, *Limnol Oceanogr*, 52, 495-507, 2007.
- Kirchman, D. L., Cottrell, M. T., and Lovejoy, C.: The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes, *Environ Microbiol*, 12, 1132-1143, 2010.
- Kling, G. W., Kipphut, G. W., and Miller, M. C.: Arctic lakes and streams as gas conduits to the atmosphere: Implications for tundra carbon budgets, *Science*, 251, 298-301, 1991.
- Koblížek, M., Mašín, M., Ras, J., Poulton, A. J., and Prášil, O.: Rapid growth rates of aerobic anoxygenic phototrophs in the ocean, *Environ Microbiol*, 9, 2401-2406, 2007.
- Koh, E. Y., Atamna-Ismaeel, N., Martin, A., Cowie, R. O. M., Beja, O., Davy, S. K., Maas, E. W., and Ryan, K. G.: Proteorhodopsin-bearing bacteria in Antarctic sea ice, *Appl Environ Microbiol*, 76, 5918, 2010.
- Koh, E. Y., Phua, W., and Ryan, K. G.: Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in Antarctic sea ice and seawater, *Environ Microbiol Rep*, 3, 710-716, 2011.
- Koh, E. Y., Cowie, R. O. M., Simpson, A. M., O'Toole, R., and Ryan, K. G.: The origin of cyanobacteria in Antarctic sea ice: marine or freshwater?, *Environ Microbiol Rep*, 2012.
- Kolber, Z. S., Van Dover, C. L., Niederman, R. A., and Falkowski, P. G.: Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean, *Nature*, 407, 177-179, 2000.
- Kolber, Z. S.: Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean, *Science*, 292, 2492-2495, 2001.
- Lami, R., Cottrell, M. T., Ras, J., Ulloa, O., Obernosterer, I., Claustre, H., Kirchman, D. L., and Lebaron, P.: High abundances of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in the South Pacific Ocean, *Appl Environ Microbiol*, 73, 4198, 2007.
- Lami, R., Cottrell, M. T., Campbell, B. J., and Kirchman, D. L.: Light-dependent growth and proteorhodopsin expression by Flavobacteria and SAR11 in experiments with Delaware coastal waters, *Environ Microbiol*, 11, 3201-3209, 2009.
- Lamy, D., Jeanthon, C., Cottrell, M. T., Kirchman, D. L., Van Wambeke, F., Ras, J., Dahan, O., Pujol-Pay, M., Oriol, L., Bariat, L., Catala, P., Cornet-Barthaux, V., and Lebaron, P.: Ecology of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea, *Biogeosciences*, 8, 973-985, 10.5194/bg-8-973-2011, 2011.

- Lehours, A. C., Cottrell, M. T., Dahan, O., Kirchman, D. L., and Jeanthon, C.: Summer distribution and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mediterranean Sea in relation to environmental variables, *FEMS Microbiol Ecol*, 74, 397-409, 10.1111/j.1574-6941.2010.00954.x, 2010.
- Li, W.: Annual average abundance of heterotrophic bacteria and *Synechococcus* in surface ocean waters, *Limnol Oceanogr*, 43, 1746-1753, 1998.
- Li, W. K. W.: Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eucaryotic ultraphytoplankton: measurements from flow cytometric sorting, *Limnol Oceanogr*, 169-175, 1994.
- Li, W. K. W.: From cytometry to macroecology: a quarter century quest in microbial oceanography, *Aquat Microb Ecol*, 57, 239, 2009.
- Lin, L., He, J., Zhao, Y., Zhang, F., and Cai, M.: Flow cytometry investigation of picoplankton across latitudes and along the circum Antarctic Ocean, *Acta Oceanologica Sinica*, 31, 134-142, 2012.
- Loeng, H., Brander, K., Carmack, E., Denisenko, S., Drinkwater, K., Hansen, B., Kovacs, K., Livingston, P., McLaughlin, F., and Sakshaug, E.: Marine systems, Arctic climate impact assessment, 439-538, 2005.
- Malmström, R. R., Kiene, R. P., Vila, M., and Kirchman, D. L.: Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) assimilation by *Synechococcus* in the Gulf of Mexico and northwest Atlantic Ocean, *Limnol Oceanogr*, 1924-1931, 2005.
- Malmström, R. R., Straza, T. R. A., Cottrell, M. T., and Kirchman, D. L.: Diversity, abundance, and biomass production of bacterial groups in the western Arctic Ocean, *Aquat Microb Ecol*, 47, 45-55, 2007.
- Man, D.: Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins, *EMBO J.*, 22, 1725-1731, 2003.
- Marchant, H. J., Davidson, A. T., and Wright, S. W.: The distribution and abundance of chroococcoid cyanobacteria in the Southern Ocean, 1, National Institute of Polar Research, 1-9 pp., 1987.
- Mašín, M., Zdun, A., Ston-Egiert, J., Nausch, M., Labrenz, M., Moulisova, V., and Koblizek, M.: Seasonal changes and diversity of aerobic anoxygenic phototrophs in the Baltic Sea, *Aquat Microb Ecol*, 45, 247-254, 2006.
- Matsuoka, A., Hill, V., Huot, Y., Babin, M., and Bricaud, A.: Seasonal variability in the light absorption properties of western Arctic waters: Parameterization of the individual components of absorption for ocean color applications, *J Geophys Res*, 116, C02007, 2011.
- Meon, B., and Amon, R. M. W.: Heterotrophic bacterial activity and fluxes of dissolved free amino acids and glucose in the Arctic rivers Ob, Yenisei and the adjacent Kara Sea, *Aquat Microb Ecol*, 37, 121-135, 2004.
- Michelou, V. K., Cottrell, M. T., and Kirchman, D. L.: Light-stimulated bacterial production and amino acid assimilation by cyanobacteria and other microbes in the North Atlantic Ocean, *Appl Environ Microbiol*, 73, 5539, 2007.
- Murphy, L., and Haugen, E.: The distribution and abundance of phototrophic ultraplankton in the North Atlantic, *Limnol Oceanogr*, 47-58, 1985.
- Nelson, F. E.: (Un) frozen in time, *Science*, 299, 1673-1675, 2003.
- Niederberger, T. D., Perreault, N. N., Tille, S., Lollar, B. S., Lacrampe-Couloume, G., Andersen, D., Greer, C. W., Pollard, W., and Whyte, L. G.: Microbial characterization of a subzero, hypersaline methane seep in the Canadian High Arctic, *ISME J*, 4, 1326-1339, 2010.
- Oesterhelt, D., and Stoekenius, W.: Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nature*, 233, 149-152, 1971.
- Opsahl, S., Benner, R., and Amon, R. M. W.: Major flux of terrigenous dissolved organic matter through the Arctic Ocean, *Limnol Oceanogr*, 44, 2017-2023, 1999.
- Ortega-Retuerta, E., Jeffrey, W., Ghiglione, J., and Joux, F.: Evidence of heterotrophic prokaryotic activity limitation by nitrogen in the Western Arctic Ocean during summer, *Polar Biol*, 35, 785-794, 2012a.
- Ortega-Retuerta, E., Joux, F., Jeffrey, W. H., and Ghiglione, J. F.: Spatial variability of particle-attached and free-living bacterial diversity in surface waters from the Mackenzie River to the

- Beaufort Sea (Canadian Arctic), *Biogeosciences Discuss.*, 9, 17401-17435, 10.5194/bgd-9-17401-2012, 2012b.
- Palenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, W., Allen, E., and McCarren, J.: The genome of a motile marine *Synechococcus*, *Nature*, 424, 1037-1042, 2003.
- Partensky, F., Blanchot, J., and Vaultot, D.: Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review, *BULLETIN-INSTITUT OCEANOGRAPHIQUE MONACO-NUMERO SPECIAL-*, 457-476, 1999a.
- Partensky, F., Hess, W., and Vaultot, D.: *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance, *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 106-127, 1999b.
- Perovich, D. K.: The changing Arctic sea ice cover, *Oceanography-Oceanography Society*, 24, 162, 2011.
- Peterson, B. J., Holmes, R. M., McClelland, J. W., Vörösmarty, C. J., Lammers, R. B., Shiklomanov, A. I., Shiklomanov, I. A., and Rahmstorf, S.: Increasing river discharge to the Arctic Ocean, *Science*, 298, 2171-2173, 2002.
- Pidwirny, M.: *Introduction to the Oceans, Fundamentals of Physical Geography*, 2006.
- Pommier, T., Canbäck, B., Riemann, L., Boström, K. H., Simu, K., Lundberg, P., Tunlid, A., and Hagström, Å.: Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton, *Mol Ecol*, 16, 867-880, 10.1111/j.1365-294X.2006.03189.x, 2007.
- Powell, L., Bowman, J., Skerratt, J., Franzmann, P., and Burton, H.: Ecology of a novel *Synechococcus* clade occurring in dense populations in saline Antarctic lakes, *Mar Ecol Prog Ser*, 291, 65-80, 2005.
- Rachold, V., Grigoriev, M. N., Are, F. E., Solomon, S., Reimnitz, E., Kassens, H., and Antonow, M.: Coastal erosion vs riverine sediment discharge in the Arctic Shelf seas, *Int J Earth Sci*, 89, 450-460, 2000.
- Rathgeber, C., Beatty, J. T., and Yurkov, V.: Aerobic phototrophic bacteria: new evidence for the diversity, ecological importance and applied potential of this previously overlooked group, *Photosynthesis Res*, 81, 113-128, 2004.
- Riedel, T., Tomasch, J., Buchholz, I., Jacobs, J., Kollenberg, M., Gerdt, G., Wichels, A., Brinkhoff, T., Cypionka, H., and Wagner-Dobler, I.: Constitutive expression of the proteorhodopsin gene by a *Flavobacterium* strain representative of the proteorhodopsin-producing microbial community in the North Sea, *Appl Environ Microbiol*, 76, 3187, 2010.
- Robineau, B., Legendre, L., Michel, C., Budéus, G., Kattner, G., Schneider, W., and Pesant, S.: Ultraphytoplankton abundances and chlorophyll *a* concentrations in ice-covered waters of northern seas, *J Plankton Res*, 21, 735-755, 1999.
- Rosenberg, G.: Environmental control and potential fate of size-fractionated phytoplankton production in the Greenland Sea (75° N), *Mar Ecol Prog Ser*, 98, 297-313, 1993.
- Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K., Williamson, S., and Yooseph, S.: The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific, *PLoS Biol*, 5, e77, 2007.
- Sabehi, G., Beja, O., Suzuki, M. T., Preston, C. M., and DeLong, E. F.: Different SAR86 subgroups harbour divergent proteorhodopsins, *Environ. Microbiol.*, 6, 903-910, 2004.
- Sabehi, G., Loy, A., Jung, K. H., Partha, R., Spudich, J. L., Isaacson, T., Hirschberg, J., Wagner, M., and Béjà, O.: New insights into metabolic properties of marine bacteria encoding proteorhodopsins, *PLoS Biol*, 3, e273, 2005.
- Sabehi, G., Kirkup, B. C., Rozenberg, M., Stambler, N., Polz, M. F., and Béjà, O.: Adaptation and spectral tuning in divergent marine proteorhodopsins from the eastern Mediterranean and the Sargasso Seas, *ISME J*, 1, 48-55, 2007.
- Salka, I., Čuperová, Z., Mašín, M., Koblížek, M., and Grossart, H. P.: *Rhodofera*-related *pufM* gene cluster dominates the aerobic anoxygenic phototrophic communities in German freshwater lakes, *Environ Microbiol*, 13, 2865-2875, 2011.
- Schwalbach, M. S., and Fuhrman, J. A.: Wide-ranging abundances of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence microscopy and quantitative PCR, *Limnol Oceanogr*, 50, 620-628, 2005.

- Selje, N., Simon, M., and Brinkhoff, T.: A newly discovered Roseobacter cluster in temperate and polar oceans, *Nature*, 427, 445-448, 2004.
- Serreze, M. C., Barrett, A. P., Slater, A. G., Woodgate, R. A., Aagaard, K., Lammers, R. B., Steele, M., Moritz, R., Meredith, M., and Lee, C. M.: The large-scale freshwater cycle of the Arctic, *Journal of Geophysical Research: Oceans* (1978–2012), 111, 10.1029/2005JC003424, 2006.
- Shiba, T., Simidu, U., and Taga, N.: Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*, *Appl Environ Microbiol*, 38, 43-45, 1979.
- Shiklomanov, I. A.: *World water resources, A New Appraisal and Assessment for the 21st Century*, 1998.
- Sieracki, M. E., Gilg, I. C., Thier, E. C., Poulton, N. J., and Goericke, R.: Distribution of planktonic aerobic anoxygenic photoheterotrophic bacteria in the northwest Atlantic, *Limnol Oceanogr*, 51, 38-46, 2006.
- Springer, A. M., and McRoy, C. P.: The paradox of pelagic food webs in the northern Bering Sea--III. Patterns of primary production, *Cont Shelf Res*, 13, 575-599, 1993.
- Steindler, L., Schwalbach, M. S., Smith, D. P., Chan, F., and Giovannoni, S. J.: Energy Starved Candidatus *Pelagibacter Ubique* Substitutes Light-Mediated ATP Production for Endogenous Carbon Respiration, *PloS one*, 6, e19725, 2011.
- Stingl, U., Desiderio, R. A., Cho, J. C., Vergin, K. L., and Giovannoni, S. J.: The SAR92 clade: an abundant coastal clade of culturable marine bacteria possessing proteorhodopsin, *Appl Environ Microbiol*, 73, 2290-2296, 2007.
- Suyama, T., Shigematsu, T., Takaichi, S., Nodasaka, Y., Fujikawa, S., Hosoya, H., Tokiwa, Y., Kanagawa, T., and Hanada, S.: *Roseateles depolymerans* gen. nov., sp. nov., a new bacteriochlorophyll *a*-containing obligate aerobe belonging to the β -subclass of the Proteobacteria, *Int J Syst Bacteriol*, 49, 449-457, 1999.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H., and Smith, H. O.: Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea, *Science*, 304, 66-74, 10.1126/science.1093857, 2004.
- Vincent, W., Bowman, J., Rankin, L., and McMeekin, T.: Phylogenetic diversity of picocyanobacteria in Arctic and Antarctic ecosystems, 2000, 317-322,
- Waidner, L. A., and Kirchman, D. L.: Aerobic anoxygenic photosynthesis genes and operons in uncultured bacteria in the Delaware River, *Environ Microbiol*, 7, 1896-1908, 10.1111/j.1462-2920.2005.00883.x, 2005.
- Waidner, L. A., and Kirchman, D. L.: Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria attached to particles in turbid waters of the Delaware and Chesapeake estuaries, *Appl Environ Microbiol*, 73, 3936-3944, 2007.
- Waidner, L. A., and Kirchman, D. L.: Diversity and distribution of ecotypes of the aerobic anoxygenic phototrophy gene, *pufM*, in the Delaware estuary, *Appl Environ Microbiol*, 74, 4012-4021, 2008.
- Waleron, M., Waleron, K., Vincent, W. F., and Wilmotte, A.: Allochthonous inputs of riverine picocyanobacteria to coastal waters in the Arctic Ocean, *FEMS Microbiol Ecol*, 59, 356-365, 2007.
- Walsh, J. E.: Climate of the Arctic marine environment, *Ecol Appl*, 18, 3-22, 2008.
- Wells, L. E., and Deming, J. W.: Abundance of Bacteria, the Cytophaga-Flavobacterium cluster and Archaea in cold oligotrophic waters and nepheloid layers of the Northwest Passage, Canadian Archipelago, *Aquat Microb Ecol*, 31, 19-31, 2003.
- Wheeler, P., Watkins, J., and Hansing, R.: Nutrients, organic carbon and organic nitrogen in the upper water column of the Arctic Ocean: implications for the sources of dissolved organic carbon, *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 44, 1571-1592, 1997.
- Wheeler, P. A., Gosselin, M., Sherr, E., Thibault, D., Kirchman, D. L., Benner, R., and Whitley, T. E.: Active cycling of organic carbon in the central Arctic Ocean, 1996.
- Williams, T. J., Long, E., Evans, F., DeMaere, M. Z., Lauro, F. M., Raftery, M. J., Ducklow, H., Grzymalski, J. J., Murray, A. E., and Cavicchioli, R.: A metaproteomic assessment of winter and

-
- summer bacterioplankton from Antarctic Peninsula coastal surface waters, *ISME J*, 6, 1883-1900, 2012.
- Yoshizawa, S., Kawanabe, A., Ito, H., Kandori, H., and Kogure, K.: Diversity and functional analysis of proteorhodopsin in marine *Flavobacteria*, *Environ Microbiol*, 14, 1240-1248, 2012.
- Yurkov, V. V., and Beatty, J. T.: Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria, *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 695-724, 1998.
- Yutin, N., Suzuki, M. T., and Beja, O.: Novel primers reveal wider diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs, *Appl Environ Microbiol*, 71, 8958, 2005.
- Yutin, N., Suzuki, M. T., Teeling, H., Weber, M., Venter, J. C., Rusch, D. B., and Bèjà, O.: Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling expedition metagenomes, *Environ Microbiol*, 9, 1464-1475, 2007.
- Zaballos, M., López-López, A., Ovreas, L., Bartual, S. G., D'Auria, G., Alba, J. C., Legault, B., Pushker, R., Daae, F. L., and Rodríguez-Valera, F.: Comparison of prokaryotic diversity at offshore oceanic locations reveals a different microbiota in the Mediterranean Sea, *FEMS Microbiol Ecol*, 56, 389-405, 2006.
- Zhang, J., Spitz, Y. H., Steele, M., Ashjian, C., Campbell, R., Berline, L., and Matrai, P.: Modeling the impact of declining sea ice on the Arctic marine planktonic ecosystem, *Journal of Geophysical Research: Oceans* (1978–2012), 115, 2010.
- Zubkov, M. V., and Tarran, G. A.: Amino acid uptake of *Prochlorococcus* spp. in surface waters across the South Atlantic Subtropical Front, *Aquat Microb Ecol*, 40, 241-249, 2005.
- Zwirgmaier, K., Jardillier, L., Ostrowski, M., Mazard, S., Garczarek, L., Vaulot, D., Massana, R., Ulloa, O., and Scanlan, D. J.: Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes, *Environ Microbiol*, 10, 147-161, 2008.

VALORISATION

Etudes menées en parallèle

Dans le cadre de la campagne BOUM (Biogéochimie de l'oligotrophie à l'ultra-oligotrophie méditerranéenne ; <http://www.insu.cnrs.fr/expeditions-et-campagnes/boum-biogeochimie-de-l-oligotrophie-a-l-ultra-oligotrophie-mediterraneenne>), j'ai pu participer à l'étude des communautés BPAA et B-PR actives en mer Méditerranée. Un article sur les BPAA a été publié dans *Biogeosciences* en 2011 (ci-après) et l'article sur les B-PR et en cours de rédaction.

Diversity of cultivated and metabolically active aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea

C. Jeanthon^{1,2}, D. Boeuf^{1,2}, O. Dahan^{1,2}, F. Le Gall^{1,2}, L. Garczarek^{1,2}, E. M. Bendif^{1,2}, and A.-C. Lehours³

¹Observatoire Océanologique de Roscoff, UMR7144, INSU-CNRS – Groupe Plancton Océanique, 29680 Roscoff, France

²UPMC Univ Paris 06, UMR7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

³CNRS, UMR6023, Microorganismes: Génome et Environnement, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France

Received: 21 April 2011 – Published in Biogeosciences Discuss.: 5 May 2011

Revised: 7 July 2011 – Accepted: 8 July 2011 – Published: 20 July 2011

Abstract. Aerobic anoxygenic phototrophic (AAP) bacteria play significant roles in the bacterioplankton productivity and biogeochemical cycles of the surface ocean. In this study, we applied both cultivation and mRNA-based molecular methods to explore the diversity of AAP bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea in early summer 2008. Colony-forming units obtained on three different agar media were screened for the production of bacteriochlorophyll-*a* (BChl-*a*), the light-harvesting pigment of AAP bacteria. BChl-*a*-containing colonies represented a low part of the cultivable fraction. In total, 54 AAP strains were isolated and the phylogenetic analyses based on their 16S rRNA and *pufM* genes showed that they were all affiliated to the *Alphaproteobacteria*. The most frequently isolated strains belonged to *Citromicrobium bathyomarimum*, and *Erythrobacter* and *Roseovarius* species. Most other isolates were related to species not reported to produce BChl-*a* and/or may represent novel taxa. Direct extraction of RNA from seawater samples enabled the analysis of the expression of *pufM*, the gene coding for the M subunit of the reaction centre complex of aerobic anoxygenic photosynthesis. Clone libraries of *pufM* gene transcripts revealed that most phylogenotypes were highly similar to sequences previously recovered from the Mediterranean Sea and a large majority (~94%) was affiliated to the *Gammaproteobacteria*. The most abundantly detected phylogenotypes occurred in the western and eastern Mediterranean basins. However, some were exclusively

detected in the eastern basin, reflecting the highest diversity of *pufM* transcripts observed in this ultra-oligotrophic region. To our knowledge, this is the first study to document extensively the diversity of AAP isolates and to unveil the active AAP community in an oligotrophic marine environment. By pointing out the discrepancies between culture-based and molecular methods, this study highlights the existing gaps in the understanding of the AAP bacteria ecology, especially in the Mediterranean Sea and likely globally.

1 Introduction

Aerobic anoxygenic phototrophic (AAP) bacteria are photoheterotrophs that require oxygen for their growth and for bacteriochlorophyll-*a* (BChl-*a*) synthesis. Given their capability of harvesting light energy, they represent an important fraction of the bacterioplankton in freshwater and marine illuminated environments (Kolber et al., 2000, 2001; Bèjà et al., 2002; Jiao et al., 2007; Yutin et al., 2007; Masin et al., 2008; Jiang et al., 2009). AAP bacteria were found to be widely distributed in the marine environment representing about 1.5–5% of total bacteria in the euphotic zone of the ocean (Schwalbach and Fuhrman, 2005; Cottrell et al., 2006; Sieracki et al., 2006; Jiao et al., 2007). On the other hand, BChl-*a* measurements suggested that AAP bacteria may constitute a very dynamic part of the marine bacterial community contributing significantly to the cycling of organic carbon in the upper ocean (Koblizek et al., 2007). A global ocean study showed that the maximum AAP bacterial diversity was found in oligotrophic areas, whereas AAP bacterial



Correspondence to: C. Jeanthon
 (jeanthon@sb-roscoff.fr)

abundance followed the opposite trend, positively correlated to the concentration of chlorophyll-*a* (Jiao et al., 2007).

The Mediterranean Sea is one of the most oligotrophic oceanic systems and is characterized by a longitudinal gradient of oligotrophy increasing eastwards. The different trophic conditions available in the Mediterranean Sea offer a unique context to link nutrient availability, trophic status and functioning of the food web to the dynamics of photoheterotrophic populations. The 3000 km transect surveyed by the BOUM (Biogeochemistry from the Oligotrophic to the Ultraoligotrophic Mediterranean) cruise during the stratification period in early summer 2008 provided an opportunity to better understand the distribution pattern of abundance and diversity of AAP bacteria in this environment. In a companion paper, Lamy et al. (2011) demonstrated that concentrations of BChl-*a* and AAP bacterial abundance decreased from the western to the eastern basins of the Mediterranean Sea and were linked with concentrations of Chl-*a*, nutrient and dissolved organic carbon. Interestingly, the BChl-*a* content per cell was significantly higher in the ultra-oligotrophic eastern basin than in the two other basins suggesting that reliance on phototrophy varied along the oligotrophic gradient and that nutrient and/or carbon limitation favors BChl-*a* synthesis.

Molecular analyses based on the *pufM* gene encoding the M-subunit of the photosynthetic reaction center have explored AAP bacterial diversity using the polymerase chain reaction (PCR) (Béjà et al., 2002; Yutin et al., 2005; Jiao et al., 2007), denaturing/temperature gradient gel electrophoresis (DGGE/TGGE) (Yutin et al., 2008; Lehours et al., 2010), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) (Ranchou-Peyruse et al., 2006) and metagenomic analysis (Yutin et al., 2007). Although these DNA-based approaches have given insight into the diversity of AAP bacteria, analysis of relevant functional communities is still a challenge, as DNA could be stable in resting cells and even dead cells and may also be present as extracellular DNA. In contrast, RNA is highly labile and rRNA levels, and therefore ribosome numbers, have been correlated with cellular activity (Kramer and Singleton, 1992, 1993). Moreover, studies of cultured bacteria have identified that mRNA is typically short-lived having a half-life of only a few minutes (Von Gabain et al., 1983). Thus, it has been argued that analysis of sequences derived from RNA rather than DNA templates potentially provide a more representative indication of the active members of the bacterial community and a strong indication of specific gene expression at the time of sampling (Pichard and Paul, 1993). Reverse transcription PCR (RT-PCR) approaches have been used to investigate gene expression and to identify active AAP bacteria in the environment (Béjà et al., 2002; Karr et al., 2003). Up to now, several DNA-based molecular studies have explored the diversity patterns of AAP bacteria in the Mediterranean Sea (Oz et al., 2005; Yutin et al., 2005, 2008; Lehours et al., 2010; Martinez-Garcia et al., 2010). However, only a very

small number of AAP bacteria have been isolated from its surface waters so far and the examination of the taxa actively expressing *pufM* has never been conducted.

The aim of this study was to identify the cultivable fraction and active members of the AAP bacterial community along a large transect in the Mediterranean Sea during the stratification period through cultivation and mRNA-based techniques.

2 Material and methods

2.1 Sampling

Seawater samples were collected from 16 stations along a transect in the Mediterranean Sea (from the North of the Western Basin to the Levantine Basin) in June and July 2008 during the BOUM cruise aboard the R/V *L'Atalante* (Fig. 1). The sampled stations included fourteen short duration (4h) stations (stations 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 24, 25, 27) and three 4-day drifting stations (stations A, B and C) representative of low nutrient low chlorophyll (LNLC) conditions (Moutin et al., 2011). These three stations were located at the center of anticyclonic eddies in the western basin (station A), in the Ionian Sea (station B) and in the Levantine Sea (station C). Water samples were retrieved using 12 l Niskin bottles fitted on a Rosette sampler equipped with conductivity, temperature and depth (CTD) sensors. For bacterial cultures, samples were kept in the dark and at 4 °C until processed (within one hour). Bacterioplankton cells for total RNA extraction were collected by filtering seawater from the same water sample used for the culture experiments. To limit the degradation of mRNA, small volumes of seawater (~1 l) were filtered as rapidly as possible, immediately upon retrieval of the CTD. The time from the start of filtration to storage in RNAlater was 15–20 min. Briefly, the seawater was prefiltered in line through 47 mm diameter and 3 µm pore size polycarbonate filters (Cyclopore, Whatman) before the final collection of bacterioplankton cells onto 25 mm diameter and 0.22 µm pore size polycarbonate filters (Isopore, Millipore) using a four-head Masterflex peristaltic pump (Cole Parmer Instrument Company). Three filters per sample were processed and immediately transferred individually to a screw-cap tube containing 1 ml RNAlater (Ambion Inc., Austin, USA), frozen in liquid nitrogen and kept at –80 °C aboard the R/V *L'Atalante*. Samples were transported frozen in dry ice to the laboratory and stored at –80 °C until RNA extraction procedures.

2.2 Culture media, strain isolation and identification

Seawater samples collected at the surface (3 m) and at the deep chlorophyll maximum (DCM) were used to isolate AAP bacteria (Table 1). Colonies were obtained by spreading 50 to 100 µl of seawater samples on Marine Agar (Difco, Detroit, MI) and two low strength agar media referred here as MAD and MiA. MAD medium consisted in 0.5 g Bacto

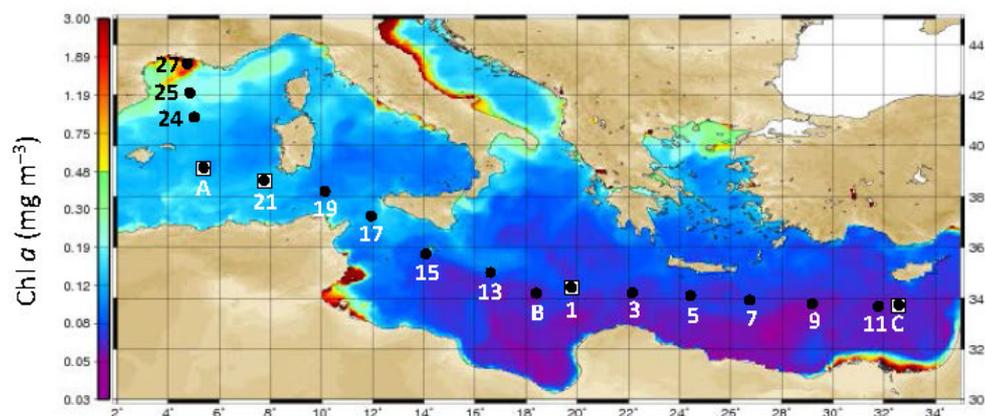


Fig. 1. Track of the BOUM cruise (16 June–20 July 2008) superimposed on the composite SeaWiFS image of the sea surface Chl-*a* concentrations (June 2008, courtesy to E. Bosc). Symbol types represent analyses performed at sampled stations: black spheres (●) indicate stations where AAP isolation was attempted and white squares (□) indicate stations where RNA-based *pufM* libraries were additionally constructed.

Table 1. Location, depth, temperature and date of sampling, source and medium of isolation of cultivated Mediterranean AAP bacteria.

Isolate ^a	Station	Latitude	Longitude	Depth (m)	Temp (°C)	Sampling date	Source of isolation	Isolation medium ^b
RCC 1876	5	34°03'N	24°30'E	5	23	22 Jun 2008	seawater	MAD
RCC 1877	13	34°53'N	16°42'E	93	16	8 Jul 2008	seawater	MAD
RCC 1878–1882	B	34°08'N	18°27'E	5	27	6 Jul 2008	seawater	MiA
RCC 1883–1887	B	34°08'N	18°27'E	5	27	6 Jul 2008	seawater	MAD
RCC 1888	17	37°10'N	12°00'E	80	16	9 Jul 2008	seawater	MiA
RCC 1889	17	37°10'N	12°00'E	80	16	9 Jul 2008	seawater	MAD
RCC 1890–1894	21	38°38'N	7°55'E	85	15	11 Jul 2008	seawater	MAD
RCC 1895–1898	21	38°38'N	7°55'E	85	15	11 Jul 2008	seawater	MiA
RCC 1899–1904	A	39°06'N	5°21'E	90	15	16 Jul 2008	seawater	MAD
RCC 1905–1906	24	41°05'N	5°03'E	5	22	18 Jul 2008	seawater	MAD
RCC 1907	27	43°13'N	4°56'E	5	18	19 Jul 2008	seawater	MAD
RCC 1908	27	43°13'N	4°56'E	5	18	19 Jul 2008	seawater	MA
RCC 1909	27	43°13'N	4°56'E	25	15	19 Jul 2008	seawater	MAD
RCC 1910	27	43°13'N	4°56'E	25	15	19 Jul 2008	seawater	MiA
RCC 1911	A	39°06'N	5°21'E	90	15	16 Jul 2008	seawater	MAD
RCC 1912–1913	24	41°05'N	5°03'E	5	22	18 Jul 2008	seawater	MiA
RCC 1914	A	39°06'N	5°21'E	100	15	14 Jul 2008	<i>Synechococcus</i> culture obtained in PRO2/5 + NO ₃	MAD
RCC 1915–1916	A	39°06'N	5°21'E	100	15	14 Jul 2008	<i>Synechococcus</i> culture obtained in JM100	MAD
RCC 1917	A	39°06'N	5°21'E	100	15	14 Jul 2008	<i>Osteococcus</i> culture obtained in PRO2/5	MAD
RCC 1918	27	43°13'N	4°56'E	5	18	19 Jul 2008	unidentified algal culture obtained in PRO2/5	MAD
RCC 1919	15	35°40'N	14°06'E	100	16	8 Jul 2008	<i>Fycococcus</i> culture obtained in PRO2/5 + NO ₃	MAD
RCC 1920	27	43°13'N	4°56'E	5	18	19 Jul 2008	mixed culture obtained in PRO2/5 + NO ₃	MAD
RCC 1921–1922	27	43°13'N	4°56'E	5	18	19 Jul 2008	<i>Ochromonas</i> culture obtained in JM100	MAD
RCC 1923	27	43°13'N	4°56'E	5	18	19 Jul 2008	mixed culture obtained in PRO2/5	MAD
RCC 1924	24	41°05'N	5°03'E	5	22	18 Jul 2008	mixed culture obtained in PRO2/5	MAD
RCC 1925–1926	24	41°05'N	5°03'E	5	22	18 Jul 2008	mixed culture obtained in PRO2/5 + NO ₃	MAD
RCC 1927	15	35°40'N	14°06'E	25	22	8 Jul 2008	mixed culture obtained in PRO2/5	MAD
RCC 1928	C	33°38'N	32°39'E	5	27	27 Jun 2008	mixed culture obtained in PRO2/5 + NO ₃	MAD
RCC 1929	24	41°05'N	5°03'E	5	22	18 Jul 2008	mixed culture obtained in PRO2/5	MAD

^a Isolates are identified by their RCC (Roscoff Culture Collection) numbers.

^b Indicates the agar medium used to isolate the corresponding organism (see the Material and methods section).

peptone (Difco), 0.1 g yeast extract (Difco), NH_4Cl (10 μM), KH_2PO_4 (1 μM), nicotinic acid (2 μM), biotin ($2 \cdot 10^{-9}$ M) vitamin B₁₂ ($4 \cdot 10^{-10}$ M), 1 ml of K medium trace elements (Keller et al., 1987) and 15 g agar (Difco) per liter of seawater sampled offshore during the cruise. MiA medium was a modified version of the latter where peptone was omitted and local seawater was replaced by the supernatant of a culture of *Isochrysis aff. galbana* (RCC 179) freshly grown in K medium (Keller et al., 1987). After the cruise, AAP isolates were also obtained by streaking on MAD medium 3–5 μl of microalgal or cyanobacterial cultures enriched on-board as previously described (Le Gall et al., 2008). Briefly, seawater sample was filtered by simple gravity through two superposed (in an effort to provide more tight size fractionation) Nuclepore filters of 47 mm diameter, with either 0.6 μm or 3 μm porosity (Whatman International Ltd, Maidstone, UK). The filtrate was partitioned into 50 ml culture flasks (Sarstedt, Orsay, France) to which was added either 1/100 of full strength Jaworski medium (Jaworski et al., 1981) for photosynthetic eukaryotes or 1/5 of full strength Pro2 medium (Moore and Chisholm, 1999) for picocyanobacteria (*Prochlorococcus* and *Synechococcus*). In order to promote the growth of nitrate-assimilating cyanobacteria, the latter medium amended with 10 μM nitrate was also used.

After incubation at 18 °C for 7 days in the dark, MAD agar plates were transferred into thermostatic cabinets illuminated by luminescent tubes (Sylvania daylight 18 W) at irradiance levels of 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (for surface samples) and 25 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (for DCM samples) in 12:12 light-dark cycle.

Detection of BChl-*a*-containing colonies was performed using a CCD camera based fluorescence imaging. Briefly, after up to 7–8 weeks of incubation at 18 °C, colonies grown on the MA, MiA and MAD media were illuminated by a set of Nichia blue light emitting diodes (470 nm). Infra-red fluorescence from BChl-*a*-containing colonies was registered by a CCD camera (Photon Systems Instruments Ltd., Brno, Czechia) protected by a long pass >850 nm glass filter (Oriol 51360, USA). The purification procedure on MAD plates was repeated two to three times until cultures were considered pure. The presence of BChl-*a* signal was evaluated using an infra-red kinetic fluorometer (model FL3500, Photon Systems Instruments Ltd.) in pure cultures cultivated in 1/10 marine broth under a 14 h–10 h light-dark regime.

For DNA extraction, cell pellets from 1.5-ml cultures were suspended in MilliQ water, boiled for 10 min, left at room temperature for 10 min, boiled again for 10 min and centrifuged (5000 g, 5 min, 4 °C). The presence of *pufM* was determined by using PCR amplification with specific primers (Lehours et al., 2010).

Small-subunit rRNA genes were amplified by PCR using universal reverse primer 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') and *Bacteria*-specific primer 8 F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'). Reaction mixtures (25 μl) contained the following components:

5 X buffer (5 μl), 2 mM MgCl_2 , 10 pmoles of each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Eurogentec), 10 pmoles of each oligonucleotide primer, 1.25 U of GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, Madison, USA) and 1 μl of extract. The initial denaturation step consisted of heating the reaction mixture at 95 °C for 10 min, and the thermal profile then consisted of 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 50 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1.5 min. A final extension step was carried out at 72 °C for 10 min. The PCR products were grouped initially by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using *HaeIII* and *MnlI* restriction patterns.

Amplified PCR products were purified using the ExoSap purification kit (ExoSap-it, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). 16S rRNA gene sequences of at least two randomly chosen strains from each RFLP group (if applicable) were sequenced using an ABI 3130 POP7 sequencer (Applied Biosystems) at the Biogenouest Sequencing-Genotyping Platform (Roscoff site).

2.3 RNA isolation

Total RNA was extracted using a NucleoSpin RNA II isolation kit (Macherey-Nagel), with several modifications to recover RNA possibly released to the 1 ml RNeasy lysis buffer due to the sample freeze and thaw (Frias-Lopez et al., 2008). Samples were thawed on ice, and the 1 ml of RNeasy lysis buffer was loaded on a Microcon YM-50 column (Millipore, Billerica, USA) for desalting and concentrating by centrifugal filtration. The resulting 50 μl of RNeasy lysis buffer were added back to the sample tubes containing 50 μl of glass beads (100 μm) and 350 μl of RA1 buffer, and total RNA extraction was performed following the NucleoSpin RNA II manual. Genomic DNA was removed using a Turbo DNA-free kit (Ambion). DNA removal in RNA samples was confirmed by control PCR amplifications that contained RNA and were not previously subjected to the reverse transcription step. No amplification was detected in these controls performed following the PCR conditions described below.

2.4 Reverse transcription and cDNA amplification

ThermoScript RT-PCR system (Invitrogen, Carlsbad, USA) was used for the reverse transcription of *pufM* mRNA from total RNA samples isolated from stations A, 21, 1 and C. All reverse transcription reactions were performed in a total reaction volume of 10 μl . cDNA synthesis was performed at 55 °C using the PufWAW reverse primer (5'-AYNGCRAACCACCANGCCCA-3', Yutin et al., 2005) as gene-specific primer. On the basis of specificity and efficiency (e.g. yield) results (Lehours et al., 2010), we selected PufMF forward (5'-TACGSAACCTGTWCTAC-3', Béjà et al., 2002) and PufWAW reverse primers to amplify *pufM* genes in cDNA samples. Reaction mixtures (25 μl) prepared

as previously contained 1 to 3 μ l of cDNA sample. Amplifications were carried out in a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) with the following parameters: 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, with a final extension step at 72 °C for 10 min. PCR products were loaded in a 0.8 % agarose gel containing 0.5 μ g ml⁻¹ ethidium bromide, and electrophoresed at 80 V for 1.5 h. Since the amplified DNA was later released from gel for the cloning procedure, modified Tris-acetate EDTA (TAE) buffer (1 mM NaEDTA (pH 8.0), 40 mM Tris acetate) was used to prepare the agarose gel and as the running buffer. The DNA band of the targeted size was carefully cut from the gel using a transilluminator and DNA isolated from gel using an Ultrafree-DA centrifuge filter (Millipore).

2.5 Library construction and analyses

Fresh RT-PCR products were cloned using the TOPO-TA cloning kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Recombinant clones were screened for insert-containing plasmids by direct PCR amplification with M13 forward and reverse primers. Clones were sequenced using the latter primers at the Biogenouest Sequencing-Genotyping Platform (Roscoff site). Clone libraries were screened for chimeric sequences with Chimera.Check program available on the RDP website (Cole et al., 2003). The remaining sequences were subjected to BLAST search against publicly available sequences to determine their approximate phylogenetic affiliations. A conservative value of 94 % nucleic acid sequence similarity (Zeng et al., 2007) was chosen for grouping sequences into Operational Taxonomic Units (OTUs) using Mothur (Schloss et al., 2009). Coverage value (C) was calculated as previously described (Mullins et al., 1995).

2.6 Phylogenetic analyses

Sequence data were analyzed with the ARB software package (Ludwig et al., 2004). The new sequences were added to the SSU ARB database and aligned with the Fast Aligner tool. Alignments were checked and corrected manually where necessary. 16S rRNA gene sequences from the isolates were compared to sequences in public databases with BLASTn (Altschul et al., 1997). 16S rRNA gene sequences with high similarities to those determined in this study were retrieved and added to the alignment. Framework trees were calculated with fastDNAmL, a maximum-likelihood method implemented in ARB, using only almost full-length sequences. The stability of the branching pattern was tested with the neighbor-joining and maximum parsimony (DNA-PARS) methods included in the PHYLIP package as implemented in ARB.

A *pufM* database containing more than 700 aligned sequences of cultured species and environmental clones retrieved from GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) and the GOS scaffold nucleotide sequences

was constructed using ARB (Ludwig et al., 2004). Sequences were translated to protein and the resulting alignment was then used to manually realign nucleotide sequences. A neighbor-joining tree was first constructed with all the sequences longer than 600 bp and the robustness of inferred tree topologies was tested by bootstrap analysis (1000 resamplings) using PHYLIP (Felsenstein, 1993). Shorter sequences were aligned as above and added to the tree using ADD-BY-PARSIMONY algorithm, which allows the addition of short sequences to existing phylogenetic trees without changing global tree topologies. Phylogenetic tree display and annotation were performed with iTOL software (Letunic and Bork, 2007).

2.7 Nucleotide sequence accession numbers

The 16S rRNA and environmental *pufM* gene sequences obtained in this study are available in GenBank database under the accession numbers HQ871842-HQ871863 and JF421730-JF421749, respectively. The *pufM* gene sequences of the isolates have been deposited in EMBL database under the accession numbers FR852756-FR852767.

3 Results

3.1 Oceanographic context

The oceanographic context, the physical and hydrologic characteristics of the water masses in the Mediterranean Sea during BOUM cruise are extensively described by Moutin et al. (2011). Briefly, sea surface temperatures ranged from 21.4 °C (station 25 in the western basin) to 26.9 °C (station B in the eastern basin). Salinity was higher in the eastern basin and especially from station 5 where it remained above 39 ‰ down to 200 m depth. Nutrient concentrations were close or below the detection limit in the upper layers, decreased in the eastern basin where lower pigment concentrations and primary production rates were measured (Pujo-Pay et al., 2011). Chlorophyll concentration showed a well defined Deep Chlorophyll Maximum (DCM), more pronounced in the western basin (for details, see Crombet et al., 2011), and deepening from west (~40 to 80 m) to east (from 80 to >100 m).

3.2 AAP isolates

Colonies grown on the agar plates of the three media used in this study were screened for the presence of BChl-*a*. The numbers of colonies showing infra-red fluorescence under blue light illumination varied greatly between samples. AAP bacteria represented only a small percentage (less than 1 %) of the cultivable bacterial community. A total of 54 AAP strains were isolated; 38 strains were obtained after direct plating of the fresh seawater samples and 16 were retrieved

Table 2. Closest phylogenetic neighbor, nucleotide accession number and 16S rRNA gene sequence length of the AAP bacteria isolated from the Mediterranean Sea.

Isolate	16S rRNA sequence length (bp)	Nucleotide accession no.	Closest described species (% 16S rRNA sequence identity)*	Other strains with identical RFLP
RCC 1876	1274	HQ871842	<i>Erythrobacter litoralis</i> (98)	
RCC 1877	1317	HQ871843	<i>Erythrobacter litoralis</i> (98)	
RCC 1878	1315	HQ871844	<i>Citromicrobium bathyomarinum</i> (99)	19 (RCC 1879-87, RCC 1890-98, RCC1907)
RCC 1888	1318	HQ871846	<i>Sulfitobacter dubius</i> (96)	
RCC 1889	1352	HQ871847	<i>Erythrobacter aquamaris</i> (99)	5 (RCC 1899-04)
RCC 1906	1300	HQ871851	<i>Sagittula stellata</i> (96)	1 (RCC 1923)
RCC 1908	1272	HQ871852	<i>Thalassobaculum salexigens</i> (94)	1 (RCC 1918)
RCC 1909	1072	HQ871853	<i>Tateyamaria omphalii</i> (98)	
RCC 1910	1349	HQ871854	<i>Thalassobaculum litoreum</i> (99)	
RCC 1919	1351	HQ871856	<i>Tateyamaria omphalii</i> (97)	
RCC 1920	1357	HQ871857	<i>Marivita litorea</i> (99)	
RCC 1921	1361	HQ871858	<i>Marivita cryptomonadis</i> (98)	
RCC 1922	1352	HQ871859	<i>Roseovarius halotolerans</i> (97)	2 (RCC1924, RCC1929)
RCC 1925	1381	HQ871861	<i>Thalassobaculum salexigens</i> (94)	1 (RCC 1926)
RCC 1927	1364	HQ871862	<i>Roseibacterium elongatum</i> (96)	
RCC 1928	1367	HQ871863	<i>Roseovarius tolerans</i> (99)	8 (RCC 1905, RCC 1911-17)

* As determined by the program BLAST.

after streaking of primary algal or cyanobacterial cultures enriched onboard from seawater samples (Table 1). All but one strains cultivated after direct plating were recovered on the two media with low nutrient and carbon content. Twenty four strains were isolated from the western basin (4 stations), 13 from the central basin (3 stations) and one from the eastern basin (1 station). All isolates were positive for the presence of the *pufM* gene by PCR amplification. BChl-*a* fluorescence signals were detected in the cultures of all isolates when grown in 1/10 marine broth.

Phylogenetic analysis of 16S rRNA and *pufM* gene sequences demonstrated that all isolates were exclusively alphaproteobacterial and were more closely related to members of the *Alpha-1*, *Alpha-3* and *Alpha-4*-proteobacteria (Table 2, Figs. 2 and 3a). Twenty isolates recovered from surface or DCM waters were almost identical (~99.8% 16S rRNA identity) to *Citromicrobium bathyomarinum*. Within the *Alpha-4*-proteobacteria, two other clusters representing 8 strains were affiliated to *Erythrobacter* species (>98%). Among the most frequently isolated strains, twelve belonged to the genus *Roseovarius*. Interestingly, all strains having *R. tolerans* as closest cultivated species (98%) were isolated after direct plating of seawater samples whereas those affiliated to *R. halotolerans* were obtained from microalgal cultures. A portion of the isolates was highly related to recently described genera, whose species were not known to synthesize BChl-*a*. Among them, RCC 1920 and RCC 1921 represented two strains of the recently described genus *Marivita* and had *M. litoreum* and *M. cryptomonadis* as closest cultivated neighbors (>98%), respectively. Although *pufL* and *pufM*

genes were amplified from the type strains of both *Marivita* species, production of BChl-*a* was not detected in their cultures (Hwang et al., 2009). Two isolates (RCC 1909 and RCC 1919) were identified as very close relatives of *Tateyamaria omphalii* (97–98%). In the genus *Tateyamaria*, BChl-*a* has been detected only in the cells of *T. pelophila* (Kurahashi and Yokota, 2007; Sass et al., 2010). Within the *Alpha-1*-proteobacteria, RCC 1910 was highly related (99%) to *Thalassobaculum litoreum* while four strains (RCC 1908, RCC 1918, RCC 1925 and RCC 1926) were more distantly related to *Thalassobaculum salexigens* (94%). Both species of the recently described genus *Thalassobaculum* were not reported to produce BChl-*a* (Zhang et al., 2008; Urios et al., 2010).

Additionally to strains RCC 1908, RCC 1918, RCC 1925 and RCC 1926 that exhibited marked novelty (Table 2), other strains bearing 96% or less 16 rRNA gene sequence identity to taxonomically characterized species may also represent new taxa (Stackebrandt and Goebel, 1994). Among them was categorized strain RCC 1927 most closely related to *Roseibacterium elongatum*. Strains RCC 1906 and RCC 1923 may represent a new species of the genus *Sagittula*. *S. stellata*, the only species of this genus, was not reported to synthesize BChl-*a* (Gonzalez et al., 1997). Finally, we detected BChl-*a* production in strain RCC1888 that had *Sulfitobacter dubius* as closest characterized relative. This phenotypic trait has been reported only in a few described *Sulfitobacter* species (Labrenz et al., 2000; Park et al., 2007; Yoon et al., 2007).

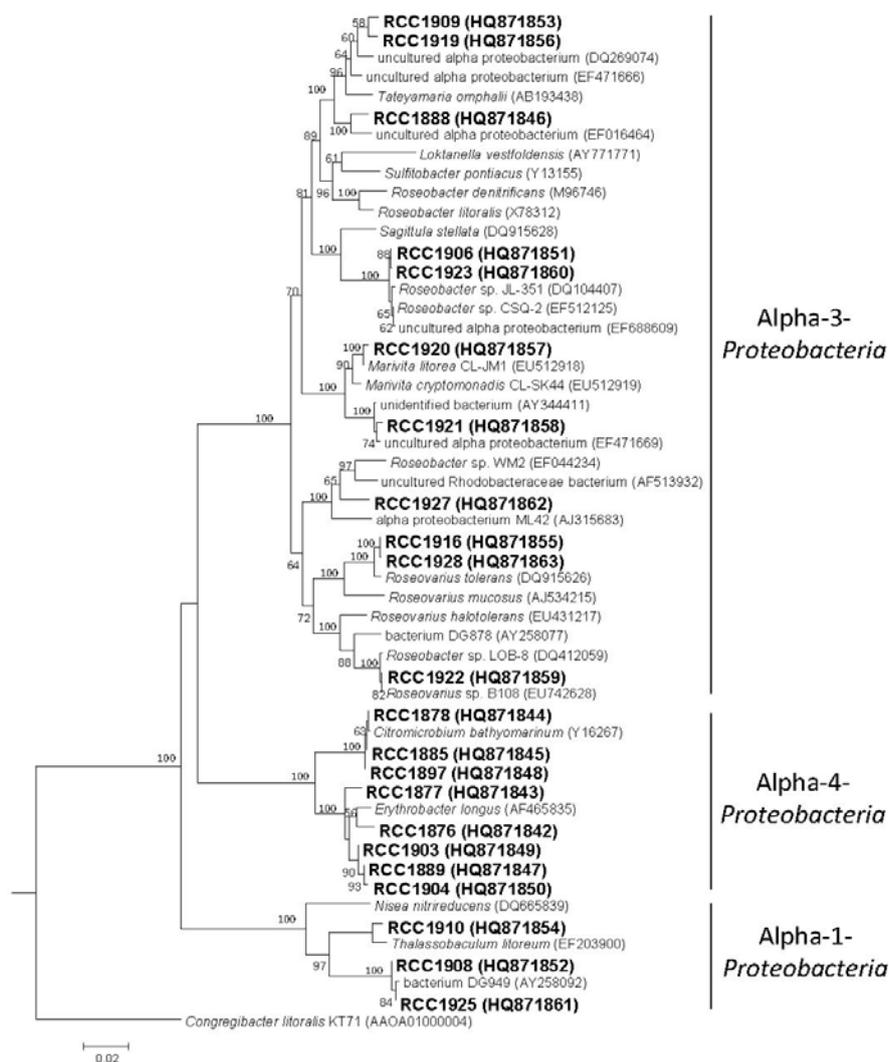


Fig. 2. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA sequences indicating the position of selected AAP strains isolated during the BOUM cruise. The tree was calculated by the neighbor-joining method. Percentages of 1000 bootstrap resamplings that support branching points above 50% are indicated. Bar represents the number of substitutions per 100 sequence positions.

Most *pufM* gene sequences of the isolates did not cluster with that of cultivated organisms (Fig. 3a). They exhibited generally highest sequence levels of identity to sequences recovered from environments other than the Mediterranean Sea.

3.3 Diversity of active AAP bacteria

Functional expression of *pufM* mRNA transcripts, using reverse transcription-PCR to produce cDNA, was performed to

determine which phylotypes were actively transcribing *pufM* in the Mediterranean Sea. We amplified by PCR *pufM* transcripts directly from RNA (cDNA) extracted from mixed picoplankton assemblages collected in the western and eastern Mediterranean Sea. Interestingly, *pufM* genes were amplified from samples collected during night time but no amplification products were obtained from those retrieved during the day (stations 25 and B). A total of 207 randomly picked clones containing *pufM* inserts were sequenced; 109 were recovered from station A and 11 from station 21 in the western

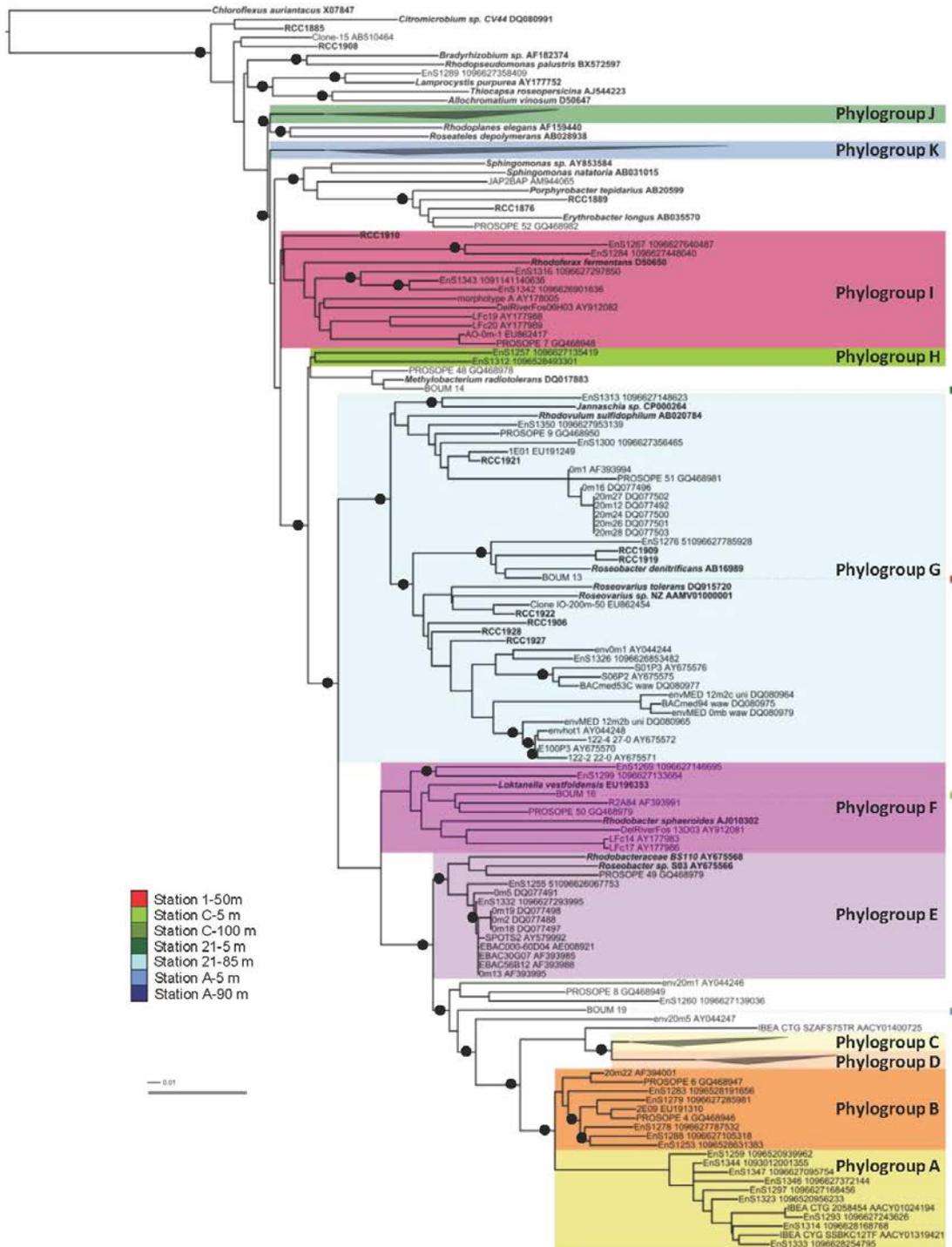


Fig. 3a. *pufM* phylogenetic trees showing the inferred phylogenetic relationships of *pufM* gene sequences from AAP isolates and environmental samples. Color ranges highlight the different groups defined by Yutin et al. (2007). (a) Phylogenetic relationships of *pufM* genes affiliated to phylogroups F, G, I and to unidentified phylogroups.

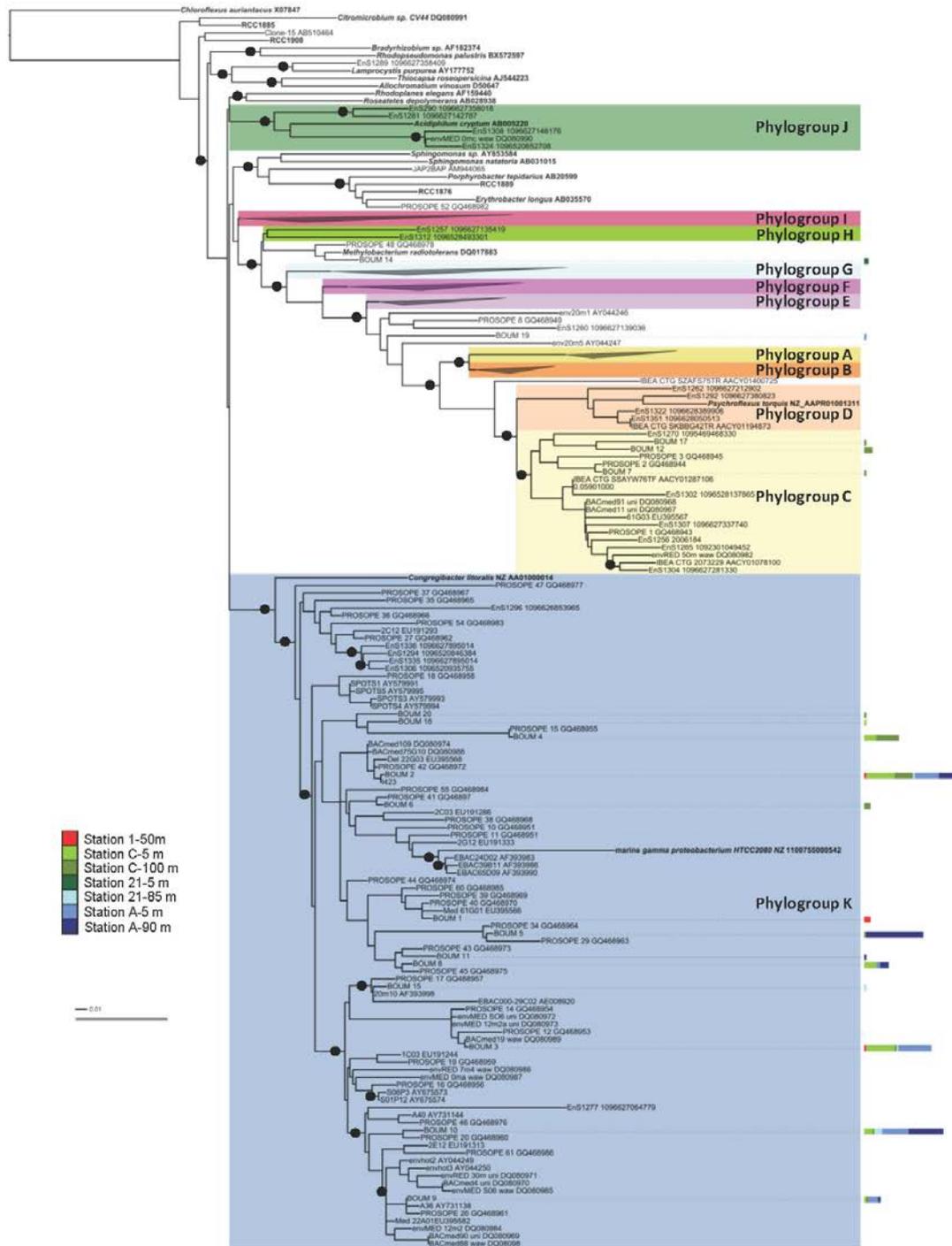


Fig. 3b. (b) Phylogenetic relationships of *pufM* genes affiliated to phylogroups C and K and to unidentified phylogroups. Trees are based on a neighbor-joining (NJ) tree to which short sequences were added by ARB_PARISOMONY. Sequences used to construct NJ trees are marked in bold and black circles on nodes represent confidence values >50% for branches found in the initial NJ trees. Sequences retrieved in this study are indicated as BOUM 1 to BOUM 20. The multivalued bar charts represent the relative frequencies of the corresponding OTU in the different clone libraries. Colors used to represent the clone libraries are indicated at the left of the trees.

basin whereas 83 were retrieved from station C and 4 from station 1 in the eastern basin.

Using an operational taxonomic unit definition of 94% nucleic acid sequence similarity, 20 distinct OTUs were identified (Table 3). Coverage values (>85%) indicated that most of the diversity was detected in the libraries. Most *pufM* sequences were more than 94% identical to known sequences and were related to clones retrieved from the Mediterranean Sea (93.7%) (Table 3). None were closely related to that of our AAP isolates. The phylogenetic analysis demonstrated that the expressed *pufM* sequences were distributed into 4 of the 12 phylogroups previously defined by Yutin et al. (2007) (Fig. 3a and b). The diversity of *pufM* transcripts was higher at station C (Shannon-Wiener index $H' = 2.1$), located in the most oligotrophic region of the Mediterranean Sea, than at station A ($H' = 1.6$).

Only two OTUs, namely BOUM 13 (3 sequences) and BOUM 14 (2 sequences) were most similar to sequences of known organisms, *Roseobacter denitrificans* and *Methylobacterium radiotolerans*, respectively. Thirteen OTUs, representing ~94% of the sequences, fell into group K which contained *Gammaproteobacteria* representatives including few isolates such as *Congregibacter litoralis* KT71 (Eilers et al., 2001), strains NOR5-3, NOR51B and HTCC2080 (Cho et al., 2007) and BAC clones EBAC65D09 and EBAC29C02 (Béjà et al., 2002), all related to the NOR5/OM60 clade (Rappe et al., 1997). Most of them were very highly similar ($\geq 97\%$) to sequences recovered from the Mediterranean Sea (Lehours et al., 2010). The most dominant gammaproteobacterial OTUs (i.e. OTUs BOUM 2, -3 and -10) were recovered in both basins. BOUM 2 and BOUM 10 were uniformly distributed along the euphotic layer while BOUM 3 predominated in surface samples. BOUM 4, representing more than 20% of the sequences at station C, was absent in other stations. In contrast, BOUM 5 only detected in DCM samples predominated at station A.

4 Discussion

The BOUM cruise constituted a unique opportunity for ecological studies as it offered a large range of trophic conditions from the ultra-oligotrophic eastern basin to the less oligotrophic western basin during the stratification period. A parallel study carried out during the same cruise reported the largest spatial dataset of BChl-*a* concentrations in the Mediterranean Sea and provided a comprehensive picture of biogeographical trends of AAP bacteria along its different trophic regimes (Lamy et al., 2011). To complement these detailed data on their abundance and distribution, we aimed in this study at identifying the diversity and distribution of cultivable and metabolically active AAP bacteria along the two major basins of the Mediterranean Sea.

4.1 Dominance of *Alphaproteobacteria* in the cultivable community

Our data report a decrease of the numbers of AAP colonies from the western to the eastern basin of the Mediterranean Sea. This is in agreement with the HPLC and infrared microscopy data of Lamy et al. (2011) revealing the decrease of BChl-*a* concentrations and AAP bacterial abundance from west to east. All BChl-*a*-containing bacteria that formed visible colonies on plates were identified phylogenetically, thus assessing cultivable diversity although AAP bacteria represented a low part of the cultivable fraction. To our knowledge, although several studies examined the cultivable diversity of marine AAP bacteria (Allgaier et al., 2003; Koblizek et al., 2003; Rathgeber et al., 2008; Salka et al., 2008), this work presents the largest collection of AAP bacteria isolated in the frame of an oceanographic cruise. All our isolates belonged to the *Alphaproteobacteria*. This finding is not very surprising because AAP bacteria are dispersed throughout the *Alphaproteobacteria*, with one known betaproteobacterial representative, *Roseateles depolymerans* (Suyama et al., 1999), one described gammaproteobacterial species, *Congregibacter litoralis* (Eilers et al., 2001; Fuchs et al., 2007) and three unassigned gammaproteobacterial isolates (Cho and Giovannoni, 2004; Cho et al., 2007; Thrash et al., 2010).

The distribution of our isolates within at least 9 different genera reflects a high cultivable diversity for this functional group in the Mediterranean Sea. The most frequent AAP isolate was *C. bathyomarimum*, originally isolated from deep-sea hydrothermal vent plume waters (Yurkov and Beatty, 1998a). Other strains of *C. bathyomarimum* were isolated from deep ocean waters above the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean (Rathgeber et al., 2008). Since these authors were unsuccessful to obtain colonies of *C. bathyomarimum* offset from hydrothermal vents, they suggest that it may be endemic to deep vent plumes and possibly benefit from hydrothermal effluent components. However, the wide distribution of *C. bathyomarimum* in the upper waters of the Mediterranean Sea (3 stations within the western basin and the Ionian Sea at the surface and up to 85 m depth) and their occurrence in other surface marine waters (Koblizek et al., 2003; Jiao et al., 2010) does not favor this hypothesis. The frequent isolation of *Erythrobacter* species is not surprising since *Erythrobacter* spp. are among the more commonly cultured BChl-*a*-containing bacteria recovered from marine environments (Shiba et al., 1991; Kolber et al., 2001; Koblizek et al., 2003).

Several of our isolates belonged to species whose type strains were not reported to produce BChl-*a*. It is even not uncommon that strains containing the *pufL* and *pufM* genes were found not to produce BChl-*a* (Allgaier et al., 2003; Park et al., 2007; Hwang et al., 2009), pointing out that the expression of the photosynthetic reaction centre genes seems to be highly dependent on environmental parameters. These failures may probably be considered as a

Table 3. Phylogenetic affiliation and accession numbers of operational taxonomic units (OTU) recovered in the RNA-based *pufM* libraries and general features of their closest relatives in GenBank

OTU	Representative clone	Accession number	Phylogenetic affiliation	Closest relative in GenBank	Identity (%)	Habitat of closest relative	Accession number
BOUM 1	BOUM SIC7-P236	JF421730	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PROSOPE 40	98	Mediterranean Sea	GQ468970
BOUM 2	BOUM SIC7-P349	JF421731	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PROSOPE 42	99	Mediterranean Sea	GQ468972
BOUM 3	BOUM SIA6-CJ7	JF421732	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PROSOPE 14	99	Mediterranean Sea	GQ468954
BOUM 4	BOUM SIC3-CJ3	JF421733	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PROSOPE 15	100	Mediterranean Sea	GQ468955
BOUM 5	BOUM SIA6-P128	JF421734	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PROSOPE 34	99	Mediterranean Sea	GQ468964
BOUM 6	BOUM SIC3-P114	JF421735	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PROSOPE 41	97	Mediterranean Sea	GQ468971
BOUM 7	BOUM SIC3-CJ17	JF421736	Unresolved	Uncultured bacterium clone PROSOPE 2	99	Mediterranean Sea	GQ468944
BOUM 8	BOUM SIA6-P175	JF421737	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PROSOPE 45	97	Mediterranean Sea	GQ468975
BOUM 9	BOUM SIA6-CJ24	JF421738	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PROSOPE 26	98	Mediterranean Sea	GQ468961
BOUM 10	BOUM SIA213-P260	JF421739	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PROSOPE 20	97	Mediterranean Sea	GQ468960
BOUM 11	BOUM SIA2-P146	JF421740	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone 2A08	96	Delaware Bay	EU191269
BOUM 12	BOUM SIC3-P18	JF421741	Unresolved	Uncultured bacterium clone envSargasso	87	Sargasso sea	DQ080981
BOUM 13	BOUM SIA216-P381	JF421742	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh114	98	Coastal marine sediments (Australia)	CP000362
BOUM 14	BOUM SIA216-P280	JF421743	<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM2831	95	Japanese unhulled rice	CP001002
BOUM 15	BOUM SIA213-P354	JF421744	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured proteobacterium clone EBAC000-29C02	97	Monterey Bay	AE008920
BOUM 16	BOUM SIC7-CJ19	JF421745	<i>α-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PROSOPE 50	86	Mediterranean Sea	GQ468980
BOUM 17	BOUM SIC3-P336	JF421746	Unresolved	Global Ocean Sampling GS-31-01-01-1P3	90	Pacific Ocean (Galapagos islands)	EK382594
BOUM 18	BOUM SIC7-P232	JF421747	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone 2A08	88	Delaware Bay	EU191269
BOUM 19	BOUM SIA6-P161	JF421748	Unresolved	Uncultured bacterium clone j1-nggw26-s7	95	China Sea	AY652833
BOUM 20	BOUM SIC3-CJ10	JF421749	<i>γ-Proteobacteria</i>	Uncultured bacterium clone PROSOPE 45	93	Mediterranean Sea	GQ468975

result of inappropriate culture conditions employed (Biebl and Wagner-Dobler, 2006) and possibly inadequate methods to detect trace amounts of BChl-*a* synthesized. In this study, we cultivated our strains in low carbon media under natural light-dark cycle and several independent lines of evidence indicate that all our isolates are AAPs. The *pufM* gene was amplified from all strains and BChl-*a* signals and fluorescence were recorded in all cultures using fluorometry and infrared imaging, respectively. Species of the genus *Roseovarius* are among those whose cultures are reported to contain low amounts of BChl-*a* and to show a strain-dependent BChl-*a* production (Labrenz et al., 1999; Allgaier et al., 2003; Biebl et al., 2005a). Twelve *Roseovarius* strains representing two clades were identified. Although strains from both clades were recovered from the same sample, those related to *R. halotolerans* were only isolated from microalgal cultures obtained during the cruise. Similarly to *R. mucosus* (Biebl et al., 2005a) and other AAP bacteria isolated from algal cultures (Biebl et al., 2005b, 2006, 2007), this species may probably benefit from algal extracellular products. It is also conceivable that culture conditions used for algae may also contribute to the in vitro development of communities dominated by specific bacterial taxa. On the other hand, phytoplankton cultures are likely to select for different associated bacterial species that may rely on organic compounds available in algal exudates and production of osmolytes such as dimethylsulphoniopropionate (DMSP). It is, however, not possible to conclude whether algal growth and culture conditions selected for *R. halotolerans*-like bacteria, enhanced their growth or promoted their cultivability or ability to form colonies on agar medium. The high incidence of *R. halo-*

tolerans-like bacteria associated with algal cultures did not appear to be restricted to this putative new species. Indeed, this culture approach allowed the isolation of three taxa – including an additional new species – that were not obtained by direct plating. Therefore, this study demonstrates that primary cocultivation with other organism(s) may be a fruitful approach to extend the cultivable diversity and to isolate previously uncultured microorganisms.

4.2 Dominance of Gammaproteobacteria in the metabolically active AAP community

The isolation and analysis of mRNA transcripts from environmental microbial samples is an important step to increase our understanding of the complex processes of microbial ecology. In order to investigate the diversity of bacteria expressing *pufM* mRNA at the time of sample collection and thus likely the photosynthetically active members of the AAP community, RT-PCR was performed to detect the expression of this gene coding for the photosynthetic reaction center. Our results showed that *pufM* transcripts could be detected from ~1 l of seawater in all stations sampled during the night time. Using the same experimental conditions and the same seawater volume, no *pufM* RT-PCR products could be obtained from stations 25 and B sampled during the day time. This finding is consistent with the decrease of *puf* transcripts in *R. denitrificans* cultures shifted from darkness to light (Nishimura et al., 1996) and the complete inhibition of BChl-*a* synthesis by high levels of irradiance in cultivated AAP bacteria (Yurkov and Beatty, 1998b). Since we succeeded in amplifying other functional genes using the

same RNA extracts in RT-PCRs, the failure to amplify *pufM* mRNAs in daytime seawater samples was likely to be a consequence of the low relative amounts of these transcripts in the total RNA extracts. However, we acknowledge that *pufM* transcripts may have been obtained from larger volumes of seawater.

RT-PCR analysis has been used to detect the expression of functional (i.e. *nifH* and *amoA*) genes in the environment and several studies have compared the composition of DNA and RNA-based assemblages (Zani et al., 2000; Labrenz et al., 2010). The majority of expressed *pufM* sequences were similar to sequences recovered previously in DNA libraries from the PROSOPE cruise in the Mediterranean Sea (Lehours et al., 2010). Unfortunately, we were not able to amplify *pufM* mRNAs from the stations harvested in both cruises, making difficult the comparison between both data sets. However, comparison between stations C and MIO, both located in the eastern basin, indicated that fewer photosynthetic groups detectable by direct PCR of DNA could be shown to express *pufM*. A similar trend has been observed in other studies (Zani et al., 2000) including *pufM* expression analysis in lake Fryxell (Antarctica) (Karr et al., 2003). We found substantial overlap between our RNA library and the PROSOPE DNA library produced by Lehours et al. (2010), but also many cases in which a particular DNA or RNA sequence occurred alone. Phylotypes BOUM 3, -5 and -10, well represented in the DNA library (as PROSOPE 14, 34 and 20), are clearly present and, as indicated by the detection of their mRNA, are presumably photosynthetically active as well. In contrast, the most frequently detected phylotype in the *pufM* mRNA library, namely BOUM 2 was not abundantly recovered in the DNA library. The expressed *pufM* sequences also included OTUs (BOUM 12, -17 and -19), previously undetected in the Mediterranean Sea. These phylotypes may represent bacteria that are uncommon but metabolically highly active.

Previous studies have also revealed a high contribution of *Gammaproteobacteria* to AAP populations in various marine environments (Hu et al., 2006; Masin et al., 2006; Yutin et al., 2007) but their activity has only been poorly evaluated (Béjà et al., 2002). The data obtained in this work support the previous observations on the abundance of the *Gammaproteobacteria* AAP bacteria in the Mediterranean Sea (Lehours et al., 2010) and suggest their dominant photosynthetic activity. Our sequences fall into the NOR5/OM60 clade also well represented in a metagenomic library from the eastern Mediterranean Sea waters (Feingersch et al., 2010). This clade was recently shown to have a cosmopolitan occurrence in the marine environment, with a clear preference for coastal waters (Yutin et al., 2007; Yan et al., 2009). We did not clearly observe this habitat preference in the Mediterranean Sea since equivalent proportions of *pufM* *Gammaproteobacteria* sequences were detected in coastal and off shore regions (Lehours et al., 2010). However, we acknowledge that this discrepancy may be linked to the fact that relative clone library abundance does not necessarily reflect relative natu-

ral abundance. Moreover, although the four strains isolated from marine surface waters KT71, HTCC2080, HTCC2246 and HTCC2148 were shown to contain *pufLM* genes (Fuchs et al., 2007; Cho et al., 2007), it cannot be taken for granted that all members of NOR5/OM60 clade are AAP bacteria.

The highest diversity of *pufM* transcripts was present in the most oligotrophic basin where abundance of AAP bacteria is the lowest during the stratification period (Lamy et al., 2011). These findings are consistent with the contrasting variation of abundance and diversity of AAP assemblages suggested previously by a large-scale survey analysis of their distribution patterns (Jiao et al., 2007). The most abundantly detected phylotypes occurred in the western and eastern Mediterranean basins. However, several photosynthetically active OTUs (BOUM 4, -6, and -7) were exclusively detected in the ultra-oligotrophic eastern basin confirming our previous study (Lehours et al., 2010). In a companion paper, Lamy et al. (2011) showed that the concentration of BChl-*a* per cell in AAP bacterial communities was significantly higher in the eastern basin than in the western basin, suggesting that reliance on phototrophy varied along the oligotrophic gradient and that nutrient and/or carbon limitation favors BChl-*a* synthesis. Our results together with this last study suggest that in the most extreme oligotrophic conditions, competition due to nutrient limitation may favor less abundant AAP bacteria with high substrate affinity and increased BChl-*a* synthesis, resulting in higher species diversity.

In the latter metagenomic analysis, Feingersch et al. (2010) showed that strain HTCC 2080, one of the four *Gammaproteobacteria* AAP bacteria currently isolated, recruited hits displaying only a 70% identity average. This highlights that none of the current genome sequences are good references for organisms living in the eastern Mediterranean Sea. We attempted in this study to vary culture conditions to isolate the largest AAP diversity. By using low concentrations of undefined substrates like peptone and yeast extract, local seawater or supernatant of an algal culture, we were unable to grow *Gammaproteobacteria* AAP colonies although they were active at the time of sampling. In the Mediterranean Sea, most of the AAP bacteria (<0.8 μm fraction) (Lamy et al., 2011) are free-living, the common lifestyle of oligotrophic bacteria. It has been shown that obligately oligotrophic *Gammaproteobacteria* AAP bacteria are not able to form colonies on agar upon their first isolation from seawater (Cho and Giovannoni, 2004). We experienced this situation during the cruise because bacterial and AAP cultivability decreased along the oligotrophic gradient. This can explain our failure, but only partly, because *Gammaproteobacteria* AAP bacteria have been isolated on agar plates (Eilers et al., 2000; Csotonyi et al., 2008). Since cultures of *C. litoralis* grow optimally in microaerophilic conditions (Fuchs et al., 2007; Spring et al., 2009), strategies that attempt to favor colony formation below the air-solid interface could be more appropriate. However, strain EG19, a

distant relative to *C. litoralis*, is an obligate aerobe (Csotonyi et al., 2008). Finally, we propose that further cultivation attempts to isolate yet these uncultured AAP bacteria could consider filtration (pore size, <0.8 µm) of the inoculum to remove large, generally highly active, particle-associated bacteria and colony isolation in soft agar medium for bacteria unable to grow at the air-water interface.

5 Conclusions

The present data based on AAP culture isolation and *pufM* transcripts bring two major conclusions:

- i. RT-PCR analysis to identify the active populations of AAP bacteria supports the previous observations on the dominant role of the gammaproteobacterial AAP bacteria in the Mediterranean Sea during the stratification period.
- ii. most environmental sequences were not affiliated with any cultivated organisms.

These data highlight the existing gaps in the understanding of aerobic anoxygenic photosynthesis, especially in the Mediterranean Sea and likely globally and form the basis for culture-dependent investigations to isolate these yet uncultured groups of bacteria.

Acknowledgements. This is a contribution of the BOUM (Biogeochemistry from the Oligotrophic to the Ultraoligotrophic Mediterranean) experiment (<http://www.com.univ-mrs.fr/BOUM/>) of the french national LEFE-CYBER program, the european IP SESAME and the international IMBER project. The BOUM experiment was coordinated by the Institut National des Sciences de l'Univers (INSU) and managed by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). The authors thank the crew of the R/V *L'Atalante* for outstanding shipboard operation. Claudic Marec and Louis Prieur are warmly thanked for their efficient help in CTD rosette management and data processing.

We wish to thank Thierry Moutin for coordinating the BOUM cruise and inviting us onboard. We are grateful to Michal Koblizek for help with detection of AAP bacterial colonies using the infra-red system available in his laboratory, Morgan Perennou and Gwenn Tanguy (Biogenouest Sequencing Platform-FR2424-Station Biologique) for help with sequencing and to Sébastien Henry (FR2424-Station Biologique) for the fresh grown *Isochrysis* cultures. This work was financially supported by the program LEFE-CYBER PANAME (CNRS-INSU). Dominique Boeuf and Océane Dahan are supported by grants from the Ministry of Higher Education and Research.

Edited by: T. Moutin



The publication of this article is financed by CNRS-INSU.

References

- Allgaier, M., Uphoff, H., Felske, A., and Wagner-Dobler, I.: Aerobic anoxygenic photosynthesis in *Roseobacter* clade bacteria from diverse marine habitats, *Appl. Environ. Microb.*, 69, 5051–5059, 2003.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389–3402, 1997.
- Béjå, O., Suzuki, M. T., Heidelberg, J. F., Nelson, W. C., Preston, C. M., Hamada, T., Eisen, J. A., Fraser, C. M., and DeLong, E. F.: Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs, *Nature*, 415, 630–633, 2002.
- Biebl, H. and Wagner-Dobler, I.: Growth and bacteriochlorophyll a formation in taxonomically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in chemostat culture: Influence of light regimen and starvation, *Process Biochem.*, 41, 2153–2159, 2006.
- Biebl, H., Allgaier, M., Lunsdorf, H., Pukall, R., Tindall, B. J., and Wagner-Dobler, I.: *Roseovarius mucosus* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade with trace amounts of bacteriochlorophyll a, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 2377–2383, 2005a.
- Biebl, H., Allgaier, M., Tindall, B. J., Koblizek, M., Lunsdorf, H., Pukall, R., and Wagner-Dobler, I.: *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates, *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 55, 1089–1096, 2005b.
- Biebl, H., Tindall, B. J., Pukall, R., Lunsdorf, H., Allgaier, M., and Wagner-Dobler, I.: *Hoeflea phototrophica* sp. nov., a novel marine aerobic alphaproteobacterium that forms bacteriochlorophyll a, *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 56, 821–826, 2006.
- Biebl, H., Pukall, R., Lunsdorf, H., Schulz, S., Allgaier, M., Tindall, B. J., and Wagner-Dobler, I.: Description of *Labrenzia alexandrii* gen. nov., sp. nov., a novel alphaproteobacterium containing bacteriochlorophyll a, and a proposal for reclassification of *Stappia aggregata* as *Labrenzia aggregata* comb. nov., of *Stappia marina* as *Labrenzia marina* comb. nov. and of *Stappia alba* as *Labrenzia alba* comb. nov., and emended descriptions of the genera *Pannonibacter*, *Stappia* and *Roseibium*, and of the species *Roseibium denhamense* and *Roseibium hanelinense*, *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 57, 1095–1107, 2007.
- Cho, J. C. and Giovannoni, S. J.: Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*, *Appl. Environ. Microb.*, 70, 432–440, 2004.
- Cho, J. C., Stapels, M. D., Morris, R. M., Vergin, K. L., Schwalbach, M. S., Givan, S. A., Barofsky, D. F., and Giovannoni, S. J.: Polyphyletic photosynthetic reaction centre genes in oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*, *Environ. Microbiol.*, 9, 1456–1463, 2007.

- Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., Chandra, S., McGarrell, D. M., Schmidt, T. M., Garrity, G. M., and Tiedje, J. M.: The Ribosomal Database Project (RDP-II): reviewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy, *Nucleic Acids Res.*, 31, 442–443, 2003.
- Cottrell, M. T., Mannino, A., and Kirchman, D. L.: Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mid-Atlantic Bight and the North Pacific Gyre, *Appl. Environ. Microb.*, 72, 557–564, 2006.
- Crombet, Y., Leblanc, K., Quéguiner, B., Moutin, T., Rimmelin, P., Ras, J., Claustre, H., Leblond, N., Oriol, L., and Pujo-Pay, M.: Deep silicon maxima in the stratified oligotrophic Mediterranean Sea, *Biogeosciences*, 8, 459–475, doi:10.5194/bg-8-459-2011, 2011.
- Csotonyi, J. T., Swiderski, J., Stackebrandt, E., and Yurkov, V. V.: Novel halophilic aerobic anoxygenic phototrophs from a Canadian hypersaline spring system, *Extremophiles*, 12, 529–539, 2008.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glockner, F. O., and Amann, R.: Culturability and In situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea, *Appl. Environ. Microb.*, 66, 3044–3051, 2000.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Peplies, J., Glockner, F. O., Gerds, G., and Amann, R.: Isolation of novel pelagic bacteria from the German bight and their seasonal contributions to surface picoplankton, *Appl. Environ. Microb.*, 67, 5134–5142, 2001.
- Feingersch, R., Suzuki, M. T., Shmoish, M., Sharon, I., Sabeji, G., Partensky, F., and Béjà, O.: Microbial community genomics in eastern Mediterranean Sea surface waters, *ISME J.*, 4, 78–87, 2010.
- Felsenstein, J.: PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.5., Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1993.
- Frias-Lopez, J., Shi, Y., Tyson, G. W., Coleman, M. L., Schuster, S. C., Chisholm, S. W., and DeLong, E. F.: Microbial community gene expression in ocean surface waters, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 3805–3810, 2008.
- Fuchs, B. M., Spring, S., Teeling, H., Quast, C., Wulf, J., Schatzenhofer, M., Yan, S., Ferreira, S., Johnson, J., Glockner, F. O., and Amann, R.: Characterization of a marine gammaproteobacterium capable of aerobic anoxygenic photosynthesis, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 2891–2896, 2007.
- Gonzalez, J. M., Mayer, F., Moran, M. A., Hodson, R. E., and Whitman, W. B.: *Sagittula stellata* gen. nov, sp. nov, a lignin-transforming bacterium from a coastal environment, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 773–780, 1997.
- Hu, Y., Du, H., Jiao, N., and Zeng, Y.: Abundant presence of the gamma-like proteobacterial *pufM* gene in oxic seawater, *FEMS Microbiol. Lett.*, 263, 200–206, 2006.
- Hwang, C. Y., Bae, G. D., Yih, W., and Cho, B. C.: *Marivita cryptomonadis* gen. nov., sp. nov. and *Marivita litorea* sp. nov., of the family *Rhodobacteraceae*, isolated from marine habitats, *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 59, 1568–1575, 2009.
- Jaworski, G. H. M., Talling, J. F., and Heaney, S. I.: The influence of carbon dioxide-depletion on growth and sinking rate of 2 planktonic diatoms in culture, *Br. Phycol. J.*, 16, 395–410, 1981.
- Jiang, H., Dong, H., Yu, B., Lv, G., Deng, S., Wu, Y., Dai, M., and Jiao, N.: Abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in saline lakes on the Tibetan plateau, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 67, 268–278, 2009.
- Jiao, N., Zhang, Y., Zeng, Y., Hong, N., Liu, R., Chen, F., and Wang, P.: Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean, *Environ. Microbiol.*, 9, 3091–3099, 2007.
- Jiao, N., Zhang, R., and Zheng, Q.: Coexistence of two different photosynthetic operons in *Citromicrobium bathyomarimum* JL354 as revealed by whole-genome sequencing, *J. Bacteriol.*, 192, 1169–1170, 2010.
- Karr, E. A., Sattley, W. M., Jung, D. O., Madigan, M. T., and Achenbach, L. A.: Remarkable diversity of phototrophic purple bacteria in a permanently frozen Antarctic lake, *Appl. Environ. Microb.*, 69, 4910–4914, 2003.
- Keller, M. D., Selvin, R. C., Claus, W., and Guillard, R. R. L.: Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton, *J. Phycol.*, 23, 633–638, 1987.
- Koblizek, M., Béjà, O., Bidigare, R. R., Christensen, S., Benitez-Nelson, B., Vetrani, C., Kolber, M. K., Falkowski, P. G., and Kolber, Z. S.: Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean, *Arch. Microbiol.*, 180, 327–338, 2003.
- Koblizek, M., Masin, M., Ras, J., Poulton, A. J., and Prasil, O.: Rapid growth rates of aerobic anoxygenic phototrophs in the ocean, *Environ. Microbiol.*, 9, 2401–2406, 2007.
- Kolber, Z. S., Van Dover, C. L., Niederman, R. A., and Falkowski, P. G.: Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean, *Nature*, 407, 177–179, 2000.
- Kolber, Z. S., Plumley, F. G., Lang, A. S., Beatty, J. T., Blankenship, R. E., VanDover, C. L., Vetrani, C., Koblizek, M., Rathgeber, C., and Falkowski, P. G.: Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean, *Science*, 292, 2492–2495, 2001.
- Kramer, J. G. and Singleton, F. L.: Variations in rRNA content of marine *Vibrio* spp during starvation-survival and recovery, *Appl. Environ. Microb.*, 58, 201–207, 1992.
- Kramer, J. G. and Singleton, F. L.: Measurement of rRNA variations in natural communities of microorganisms on the Southwestern U.S. continental shelf, *Appl. Environ. Microb.*, 59, 2430–2436, 1993.
- Kurahashi, M. and Yokota, A.: *Tateyamaria omphaliti* gen. nov., sp. nov., an alpha-proteobacterium isolated from a top shell *Omphalius pfeifferi pfeifferi*, *Syst. Appl. Microbiol.*, 30, 371–375, 2007.
- Labrenz, M., Collins, M. D., Lawson, P. A., Tindall, B. J., Schumann, P., and Hirsch, P.: *Roseovarius tolerans* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium with variable bacteriochlorophyll a production from hypersaline Ekho Lake, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 137–147, 1999.
- Labrenz, M., Tindall, B. J., Lawson, P. A., Collins, M. D., Schumann, P., and Hirsch, P.: *Staleyia guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., alpha-3-Proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake, *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 50, 303–313, 2000.
- Labrenz, M., Sintez, E., Toetzke, F., Zumsteg, A., Herndl, G. J., Seidler, M., and Jurgens, K.: Relevance of a crenarchaeotal subcluster related to Candidatus *Nitrosopumilus maritimus* to ammonia oxidation in the suboxic zone of the central Baltic Sea, *ISME J.*, 4, 1496–1508, 2010.
- Lamy, D., Jeanthon, C., Cottrell, M. T., Kirchman, D. L., Van Wambeke, F., Ras, J., Dahan, O., Pujo-Pay, M., Oriol, L., Bariat, L., Catala, P., Cornet-Barthaux, V., and Lebaron, P.: Ecology of

- aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea, *Biogeosciences*, 8, 973–985, doi:10.5194/bg-8-973-2011, 2011.
- Le Gall, F., Rigaut-Jalabert, F., Marie, D., Garczarek, L., Vîprey, M., Gobet, A., and Vault, D.: Picoplankton diversity in the South-East Pacific Ocean from cultures, *Biogeosciences*, 5, 203–214, doi:10.5194/bg-5-203-2008, 2008.
- Lehours, A. C., Cottrell, M. T., Dahan, O., Kirchman, D. L., and Jeanthon, C.: Summer distribution and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mediterranean Sea in relation to environmental variables, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 74, 397–409, 2010.
- Letunic, I. and Bork, P.: Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation, *Bioinformatics*, 23, 127–128, 2007.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., Konig, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K. H.: ARB: a software environment for sequence data, *Nucleic Acids Res.*, 32, 1363–1371, 2004.
- Martinez-Garcia, M., Diaz-Valdes, M., and Anton, J.: Diversity of *pufM* genes, involved in aerobic anoxygenic photosynthesis, in the bacterial communities associated with colonial ascidians, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 71, 387–398, 2010.
- Masin, M., Zdun, A., Ston-Egiert, J., Nausch, M., Labrenz, M., Moulisova, V., and Koblizek, M.: Seasonal changes and diversity of aerobic anoxygenic phototrophs in the Baltic Sea, *Aquat. Microb. Ecol.*, 45, 247–254, 2006.
- Masin, M., Nedoma, J., Pechar, L., and Koblizek, M.: Distribution of aerobic anoxygenic phototrophs in temperate freshwater systems, *Environ. Microbiol.*, 10, 1988–1996, 2008.
- Moore, L. R. and Chisholm, S. W.: Photophysiology of the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*: Ecotypic differences among cultured isolates, *Limnol. Oceanogr.*, 44, 628–638, 1999.
- Moutin, T., Van Wambeke, F., and Prieur, L.: Introduction to the Biogeochemistry from the Oligotrophic to the Ultraoligotrophic Mediterranean (BOUM) experiment, *Biogeosciences*, in preparation, 2011.
- Mullins, T. D., Britschgi, T. B., Krest, R. L., and Giovannoni, S. J.: Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities, *Limnol. Oceanogr.*, 40, 148–158, 1995.
- Nishimura, K., Shimada, H., Ohta, H., Masuda, T., Shioi, Y., and Takamiya, K.: Expression of the *puf* operon in an aerobic photosynthetic bacterium, *Roseobacter denitrificans*, *Plant Cell Physiol.*, 37, 153–159, 1996.
- Oz, A., Sabehi, G., Koblizek, M., Massana, R., and Bèjà, O.: *Roseobacter*-like bacteria in Red and Mediterranean Sea aerobic anoxygenic photosynthetic populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 344–353, 2005.
- Park, J. R., Bae, J. W., Nam, Y. D., Chang, H. W., Kwon, H. Y., Quan, Z. X., and Park, Y. H.: *Sulfitobacter litoralis* sp. nov., a marine bacterium isolated from the East Sea, Korea, *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 57, 692–695, 2007.
- Pichard, S. L. and Paul, J. H.: Gene-expression per gene dose, a specific measure of gene-expression in aquatic microorganisms, *Appl. Environ. Microb.*, 59, 451–457, 1993.
- Pujo-Pay, M., Conan, P., Oriol, L., Cornet-Barthaux, V., Falco, C., Ghiglione, J.-F., Goyet, C., Moutin, T., and Prieur, L.: Integrated survey of elemental stoichiometry (C, N, P) from the western to eastern Mediterranean Sea, *Biogeosciences*, 8, 883–899, doi:10.5194/bg-8-883-2011, 2011.
- Ranchou-Peyruse, A., Herbert, R., Caumette, P., and Guyoneaud, R.: Comparison of cultivation-dependent and molecular methods for studying the diversity of anoxygenic purple phototrophs in sediments of an eutrophic brackish lagoon, *Environ. Microbiol.*, 8, 1590–1599, 2006.
- Rappe, M. S., Kemp, P. F., and Giovannoni, S. J.: Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina, *Limnol. Oceanogr.*, 42, 811–826, 1997.
- Rathgeber, C., Lince, M. T., Alric, J., Lang, A. S., Humphrey, E., Blankenship, R. E., Vermeglio, A., Plumley, F. G., Van Dover, C. L., Beatty, J. T., and Yurkov, V.: Vertical distribution and characterization of aerobic phototrophic bacteria at the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean, *Photosynth. Res.*, 97, 235–244, 2008.
- Salka, I., Moulisova, V., Koblizek, M., Jost, G., Jurgens, K., and Labrenz, M.: Abundance, depth distribution, and composition of aerobic bacteriochlorophyll *a*-producing bacteria in four basins of the central Baltic Sea, *Appl. Environ. Microb.*, 74, 4398–4404, 2008.
- Sass, H., Kopke, B., Rutters, H., Feuerlein, T., Droge, S., Cypionka, H., and Engelen, B.: *Tateyamaria pelophila* sp. nov., a facultatively anaerobic alphaproteobacterium isolated from tidal-flat sediment, and emended descriptions of the genus *Tateyamaria* and of *Tateyamaria omphalii*, *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 60, 1770–1777, 2010.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., and Weber, C. F.: Introducing Mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Appl. Environ. Microb.*, 75, 7537–7541, 2009.
- Schwalbach, M. S. and Fuhrman, J. A.: Wide-ranging abundances of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence microscopy and quantitative PCR, *Limnol. Oceanogr.*, 50, 620–628, 2005.
- Shiba, T., Shioi, Y., Takamiya, K., Sutton, D. C., and Wilkinson, C. R.: Distribution and physiology of aerobic bacteria containing bacteriochlorophyll *a* on the east and west coasts of Australia, *Appl. Environ. Microb.*, 57, 295–300, 1991.
- Sieracki, M. E., Gilg, I. C., Thier, E. C., Poulton, N. J., and Goericke, R.: Distribution of planktonic aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the northwest Atlantic, *Limnol. Oceanogr.*, 51, 38–46, 2006.
- Spring, S., Lunsdorf, H., Fuchs, B. M., and Tindall, B. J.: The photosynthetic apparatus and its regulation in the aerobic gammaproteobacterium *Congregibacter litoralis* gen. nov., sp. nov., *PLoS One*, 4(3), e4866, doi:10.1371/journal.pone.0004866, 2009.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. M.: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 846–849, 1994.
- Suyama, T., Shigematsu, T., Takaichi, S., Nodasaka, Y., Fujikawa,

- S., Hosoya, H., Tokiwa, Y., Kanagawa, T., and Hanada, S.: *Roseateles depolymerans* gen. nov., sp. nov., a new bacteriochlorophyll a-containing obligate aerobe belonging to the beta-subclass of the *Proteobacteria*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 449–457, 1999.
- Thrash, J. C., Cho, J. C., Ferriera, S., Johnson, J., Vergin, K. L., and Giovannoni, S. J.: Genome sequences of strains HTCC2148 and HTCC2080, belonging to the OM60/NOR5 clade of the *Gammaproteobacteria*, *J. Bacteriol.*, 192, 3842–3843, 2010.
- Urios, L., Michotey, V., Intertaglia, L., Lesongeur, F., and Lebaron, P.: *Thalassobaculum salexigens* sp. nov., a new member of the family *Rhodospirillaceae* from the NW Mediterranean Sea, and emended description of the genus *Thalassobaculum*, *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 60, 2507–2507, 2010.
- Von Gabain, A., Belasco, J. G., Schottel, J. L., Chang, A. C. Y., and Cohen, S. N.: Decay of messenger-RNA in *Escherichia coli*: investigation of the fate of specific segments of transcripts, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 653–657, 1983.
- Yan, S., Fuchs, B. M., Lenk, S., Harder, J., Wulf, J., Jiao, N. Z., and Amann, R.: Biogeography and phylogeny of the NOR5/OM60 clade of *Gammaproteobacteria*, *Syst. Appl. Microbiol.*, 32, 124–139, 2009.
- Yoon, J. H., Kang, S. J., Lee, M. H., and Oh, T. K.: Description of *Sulfitobacter donghicola* sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea, transfer of *Staleyia guttiformis* Labrenz et al. 2000 to the genus *Sulfitobacter* as *Sulfitobacter guttiformis* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfitobacter*, *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 57, 1788–1792, 2007.
- Yurkov, V. and Beatty, J. T.: Isolation of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria from black smoker plume waters of the Juan de Fuca ridge in the Pacific ocean, *Appl. Environ. Microb.*, 64, 337–341, 1998a.
- Yurkov, V. V. and Beatty, J. T.: Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 62, 695–724, 1998b.
- Yutin, N., Suzuki, M. T., and Bèjà, O.: Novel primers reveal wider diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs, *Appl. Environ. Microb.*, 71, 8958–8962, 2005.
- Yutin, N., Suzuki, M. T., Teeling, H., Weber, M., Venter, J. C., Rusch, D. B., and Bèjà, O.: Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling expedition metagenomes, *Environ. Microbiol.*, 9, 1464–1475, 2007.
- Yutin, N., Beja, O., and Suzuki, M. T.: The use of denaturing gradient gel electrophoresis with fully degenerate *pufM* primers to monitor aerobic anoxygenic phototrophic assemblages, *Limnol. Oceanogr.-Meth.*, 6, 427–440, 2008.
- Zani, S., Mellon, M. T., Collier, J. L., and Zehr, J. P.: Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3119–3124, 2000.
- Zeng, Y. H., Chen, X. H., and Jiao, N. Z.: Genetic diversity assessment of anoxygenic photosynthetic bacteria by distance-based grouping analysis of *pufM* sequences, *Lett. Appl. Microbiol.*, 45, 639–645, 2007.
- Zhang, G. I., Hwang, C. Y., and Cho, B. C.: *Thalassobaculum litoreum* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Rhodospirillaceae* isolated from coastal seawater, *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 58, 479–485, 2008.

Dominique BOEUF

14, rue Joseph Bara
29680 Roscoff, FRANCE

phone: +33 6 03 08 71 99
email: dboeuf@sb-roscoff.fr

Microbial Ecologist

27 years old, married, 1 child
French Citizen

**EDUCATION**2009 – May 2nd 2013

PhD in Marine Microbiology

Ecological significance of Photoheterotrophic Bacteria in the Arctic Ocean

Advisors: Christian Jeanthon and Philippe Lebaron
Biological Station of Roscoff, CNRS & Pierre and Marie Curie University with collaborative periods at University of Delaware and Oceanological Observatory of Banyuls-sur-Mer

2007 – 2009

Master of Marine Biology & Ecology

Identification of free and aggregated prokaryotic communities in relation with the nutrition of the tahitian pearl-producing oyster *Pinctada margaritifera*

Advisors: Valérie Michotey and Patricia Bonin
Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), CNRS & Aix-Marseille II University

Identification and quantification of arctic Mesozooplankton

Advisor : Delphine Thibault-Botha
Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), CNRS & Aix-Marseille II University

04 – 07

Bachelor of Science in Genetics, Cell Biology & Biochemistry

Aix-Marseille II University

Languages

French (mother tong)
English, moderate (1 month in the USA)
German, notion

REFERENCES**Dr Christian Jeanthon**

jeanthon@sb-roscoff.fr

CNRS Research director,
Station Biologique– place Georges Teissier
29680 Roscoff, France
+33 2 98 29 25 63

Pr Valérie Michotey

valerie.michotey@univ-amu.fr

Professor in Marine Microbial Ecology
Institut Méditerranéen d'Océanographie (MIO)
Campus de Luminy-
13288 Marseille Cedex 9, FRANCE
+33 4 91 82 93 36

WORK EXPERIENCE & SKILLS

Training in Infrared Epifluorescence Microscopy

Advisor: Dr M T Cottrell, University of Delaware,
School of Marine Science and Policy. 1 month

Training in quantitative PCR

Advisor: Dr R Lami, Oceanologic Observatory of
Banyuls-sur-Mer (OOB) 1 month

Training in advanced Phylogeny

Advisor: Dr Y Desdevises, ADAPHYL_Adaptation et
Phylogénie (<http://desdevises.free.fr/Adaphyl/>)
OOB 2 weeks

Other Techniques & Field Skills

Molecular techniques: DNA/RNA extraction and
purification, RT-PCR, qPCR, T-RFLP, RFLP, DGGE,
TTGE, high-throughput cloning-sequencing

Cultures : isolation and purification of bacterial
strains, media preparation, screening and
cryopreservation of strains, flow cytometry

Field campaigns: Onboard RNA/DNA filtration and
preservation, features of nets, Niskin, CTD

Computer Skills

Sequence processing : BioEdit, Geneious ; MAFFT;
Clustering (MOTHUR) ; Phylogeny (MrBayes, PAUP,
ARB, MEGA5)

Data analysis : statistics and multivariable analysis
(XLStat, CANOCO, PAST, notions of R)

Other : Adobe creative suite (photoshop, illustrator),
Microsoft Office suite, OS (windows vista & 7, mac
X.8, Biolinux 6)

Programming under Linux environment (notions)

MISCELLANEOUS

Transfer of knowledge

Teaching of molecular techniques and bioinformatics
to 1 PhD and 3 Master students

Popularization of marine ecology (primary school)

Volunteer experiences & Hobbies

Ecogestes Méditerranée : Information campaign to learn
green practices to sea users

Coastal boat licence

Diver niv2 CMAS/PADI Nitrox 40

Occupational health and safety (SST)

PUBLICATIONS

- Boeuf D**, Lami R, Cunnington E, Lebaron P & Jeanthon C. *Alphaproteobacteria* dominates the Proteorhodopsin-containing Community in the western Arctic Ocean. *In preparation*
- Boeuf D**, R. Edern & Jeanthon C. Proteorhodopsin-containing bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea. *In preparation*
- Boeuf D**, Lebaron P & Jeanthon C. Ecological Significance of Photoheterotrophic Bacteria in the Arctic Ocean. *Biogeosciences*. (IF 3.859) *Submitted*
- Boeuf D**, Cottrell MT, Kirchman DL, Lebaron P & Jeanthon C. Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean. *FEMS Microbiology Ecology*. (IF 3.408). *Accepted*
- Michotey V, Guasco S, **Boeuf D**, Morezzi N, Durieux B, Charpy L *et al.* (2012). Spatio-temporal diversity of free-living and particle-attached prokaryotes in the tropical lagoon of Ahe atoll (Tuamotu Archipelago) and its surrounding oceanic waters. *Marine Pollution Bulletin* **65**: 525-537. (IF 2.503)
- Jeanthon C, **Boeuf D**, Dahan O, Le Gall F, Garczarek L, Bendif EM *et al.* (2011). Diversity of cultivated and metabolically active aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **8**: 1955-1970. (IF 3.859)
- Hubas C, Jesus B, Davoult D, **Boeuf D**, Spilmont N, Paterson DM & Jeanthon C. Proliferation of anoxygenic purple bacteria at the sediment surface affects intertidal biofilm diversity and functionality *In preparation*
- Passarelli C, **Boeuf D**, Thiney N, Migné A, Meziane T, Jeanthon C, Paterson DM & Hubas C. Exopolymer composition and functions in soft coastal sediments. *In preparation*
- Lehours A-C, **Boeuf D** & Jeanthon C. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in Spitzbergen polar front. *In preparation*

ORAL & POSTER – International Conferences

References with asterisk indicate oral communications

- Jeanthon C, **Boeuf D**, Cottrell MT, Kirchman DL & Lebaron P. (2012) Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean. *In* : The 14th International Symposium on Microbial Ecology, The power of the small, August 19 – 24, 2012, Copenhagen, Denmark.
- ***Boeuf D**, Cottrell MT, Kirchman DL, Lebaron P & Jeanthon C. (2011) Ecological significance of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the arctic ocean. *In* : Microorganisms facing their environment, October 27 – 28, 2011, Paris, France.
- ***Boeuf D**, Cottrell MT, Kirchman DL, Lebaron P & Jeanthon C. (2011) Ecological significance of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the arctic ocean. *In* : The 12th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, August 28 – September 02, 2011, Rostock-Warnemünde, Germany.
- Boeuf D**, Cottrell MT, Kirchman DL, Lebaron P & Jeanthon C. (2010) Abundance and Diversity of Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria in the Beaufort Sea. *In* : The microbial view of marine biogeochemical cycles International Workshop, May 19 – 21, 2010, Banyuls-sur-Mer, France.
- Charpy L, Bonin P, **Boeuf D**, Bouvy M, Champalbert G, Claquin P, Dupuy C, Durieux B, Fournier J, Guasco S, Lefebvre S, Michotey V, Orvain F, Pagano M, Thomas Y, Veron B & Lo-Yat A (2009) Quality and quantity of available food for pearl oyster: a key parameter for a successful culture. *In*: The 11th Pacific Science Inter-congress, March 2 – 6, 2009, Papeete, French Polynesia.

ORAL & POSTER – Other

Boeuf D, Cottrell MT, Kirchman DL, Lebaron P. & Jeanthon C. (2012) Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean. *In* : The 4th Young Scientist Day, December 6, 2012, Roscoff, France.

***Jeanthon C.**, **Boeuf D**, Cottrell MT, Kirchman DL, & Lebaron P (2012) Ecological significance of photoheterotrophic bacteria in the western arctic ocean. *In* : Plenary meeting for the Malina project, September 19 – 21, 2012, Villefranche-sur-Mer, France.

***Boeuf D**, & Jeanthon C. (2012) Proteorhodopsin-bearing bacteria in the Beaufort Sea. *In* : Kick-off meeting for the ANR project Rhomeo, June 13, 2012, Banyuls-sur-Mer, France.

***Boeuf D**, Cottrell MT, Kirchman DL, Lebaron P & Jeanthon C. (2011) Ecological significance of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the arctic ocean. *In* : Journées des doctorants du Centre des Sciences de la Mer, September 12 – 16, 2011, Paris, France.

***Boeuf D** & Jeanthon C. (2011) Cultural diversity of photoheterotrophic bacteria in the Beaufort Sea. *In* : Souchothèque Workshop, June 27, 2011, Concarneau, France

***Boeuf D**, Cottrell MT, Kirchman DL, Lebaron P & Jeanthon C. (2011) Ecological significance of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the arctic ocean. *In* : Plenary meeting for the Malina project, May 9 – 11, 2011, Villefranche-sur-Mer, France.

Boeuf D, Cottrell MT, Kirchman DL, Lebaron P & Jeanthon C. (2011) Abundance and Diversity of Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria in the Beaufort Sea. *In* : Poster Day of the UMR « Adaptation and Diversity in Marine Environment », April 10, 2011, Roscoff, France.

***Boeuf D**, Bonin P, Michotey V, Guasco S, Charpy L & Lo-Yat A, Microbial diversity assessment in Ahe Atoll, *In* : FED inter-team Workshop, February 28, 2009, Papeete, French Polynesia.



ABUNDANCE AND DIVERSITY OF AEROBIC ANOXYGENIC PHOTOTROPHIC BACTERIA IN THE BEAUFORT SEA

Boeuf D.^{a,b}, M. Cottrell^c, D. Kirchman^c, P. Lebaron^{d,e}, R. Lami^e & C. Jeanthon^{a,b}

^aUPMC Univ Paris VI, UMR 7144, Station Biologique, 29682 Roscoff, France
^bCNRS, UMR 7144, Groupe Plancton Océanique, Station Biologique, BP 74, 29682 Roscoff, France
^cSchool of Marine Science and Policy, University of Delaware, Lewes, Delaware 19958, USA
^dAUPMC Univ Paris VI, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, F-66651 Banyuls/mer, France
^eCNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, F-66651, Banyuls/mer, France



INTRODUCTION The Arctic is an environment where the effects of global climate change are accumulating and increasing. We currently witness: 1) a decrease in summer ice cover that exposes sea surfaces to solar radiation and physical forcings, 2) permafrost thawing and increased river-runoff, both leading to an increase in the export of organic carbon to the ocean and 3) an increase in ultraviolet radiation. These three phenomena favor the mineralization of organic carbon through photo-oxidation and bacterial activity, amplifying the increase in atmospheric CO₂. In addition, the exposure of a larger fraction of ocean surface to sunlight and the increase in nutrients brought by rivers lead to larger autotrophic production and sequestration of organic carbon.

Photoheterotrophy, which is the ability to utilize organic substrates and harvest light energy, occurs in a broad range of microbes, including aerobic anoxygenic phototrophic bacteria (AAnPB), proterhodopsin-containing bacteria (PRB), and cyanobacteria. The hybrid metabolism of photoheterotrophs (respiration and phototrophy) will probably make them key players of the actual changes (increased solar radiation and carbon availability). Abundance of cyanobacteria in Arctic waters is generally low and little is known about the abundance and diversity of AAnPB and PRB. To give new insights into the ecological significance of the latter functional groups in Arctic waters, we conducted an extensive study in the MacKenzie river/Beaufort Sea system in August 2009 onboard the Canadian research icebreaker Amundsen. Here, we present the abundance and diversity data for AAnPB obtained using infrared epifluorescence microscopy, cultural and molecular approaches.

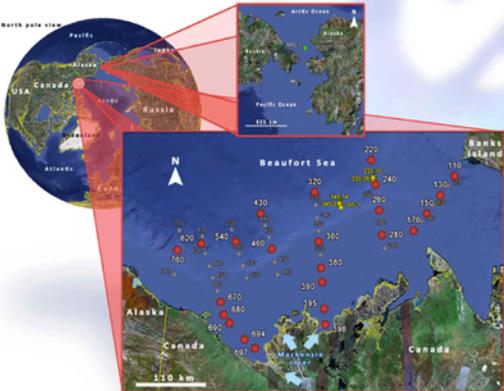


FIG. 1. Map of MALINA sampling. Red dots indicate stations sampled in this study.

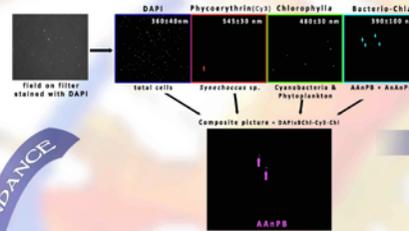


FIG. 2. Principle of infrared epifluorescence microscopy following the procedure described by Cottrell et al. (2006). DAPI staining is performed on a portion of the filters and 20 fields per filter are analyzed. A series of four images is acquired for each field of view using the following optical filter sets: DAPI (excitation 360 ± 40 nm, emission 460 ± 50 nm), infrared (390 ± 100 nm, 750 nm long pass), Chla (480 ± 30 nm, 660 ± 50 nm) and phycoerythrin (545 ± 30 nm, 610 ± 75 nm). The four pictures are computed in only one. AAnPB are the cells which have DAPI and infrared fluorescence but not Chla or phycoerythrin fluorescence.

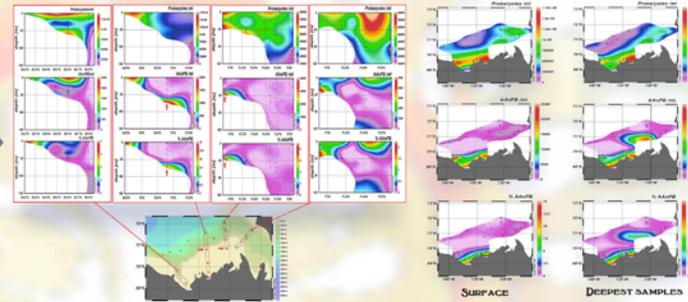


FIG. 3. Abundance and relative abundance of the total prokaryotic community and AAnPB. For the four main transects, the Latitude-Depth plots of abundance are presented. Data are gridded by the DIVA software implemented in Ocean Data View.

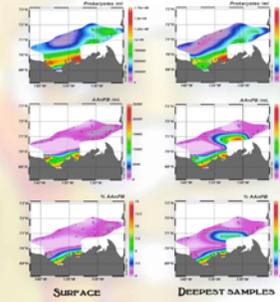


FIG. 4. Maps of Abundance and relative abundance of the total prokaryotic community and AAnPB at surface and at the deepest samples. Data are gridded by the DIVA software implemented in Ocean Data View.

ABUNDANCE Very low relative abundances of AAnPB were generally recorded across the transect covering the North Pacific waters, the Bering and Beaufort Seas (< 1% of the total prokaryotic community). The highest contributions of AAnPB were obtained in samples subjected to rivers of the Bering Sea (14.8 % of the total prokaryotes) and the MacKenzie plume (between 6% to 14.2% of the total prokaryotes). These results suggest that freshwater input may play a major role in the dynamics and composition of AAnPB populations in the Beaufort Sea.

Some other high relative proportions (9.6 % and 8.7% of the total prokaryotes) were recorded close to the continental shelf bottom in transects 2 and 3 (red arrows in Fig. 1). These data could be explained by possible releases of sediments increasing the abundance of heterotrophic bacteria, including AAnPB (high CDOM concentrations have also been measured at these depths; Ron Benner, pers. comm.).

CULTURAL APPROACH

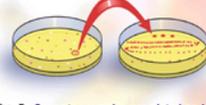


FIG. 5. Seawater samples are plated on Low Nutrient Heterotrophic Media (LNHM). The BChla-containing colonies are screened by fluorometry. Selected colonies are purified on 0.25% Marine Agar plates.



FIG. 6. Map showing stations from which AAnPB were cultured. Green: surface samples, Orange: Surface and DCM samples, Grey: no cultures.

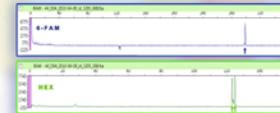


FIG. 7. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) analysis. 16S rRNA genes were amplified by PCR using 27F-FAM and 1492R-HEX primers and double-digested by MspI and HinfI restriction enzymes. Sizes of terminal fragments were resolved using an automatic sequencer.

CULTURAL DIVERSITY Among 103 AAnPB isolates obtained by plating, most of them were obtained from surface samples and belonged to the Alphaproteobacteria (98%). Half of them were identified as *Sulfotobacter* species and half as members of the genus *Loktanelia*. Other isolates were affiliated to the Gammaproteobacteria (to be confirmed).

MOLECULAR APPROACH

OBTAINING THE SEQUENCES.

Total DNA was isolated using a phenol-chloroform extraction method. PufM genes were amplified using PufMf and PufMw primers (Béjà et al., 2002; Yutin et al., 2007). Amplicons were cloned using the TOPO-TA cloning kit (Invitrogen). PCR products obtained using M13F and M13R primers were purified with the Exo-SAP treatment and sequenced.

REFERENCES

Béjà O, Suzuki MT, Helleberg JF, Nelson WC, Preston CM, Hamada T, Eisen JA, Fraser CM, DeLong EF (2002) Unexpected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* 415: 620-623.
 Cottrell MT, Kirchman DL (2008) Photoheterotrophic microbes in the Arctic Ocean in summer and winter. *Appl Environ Microbiol* 75(15): 4958-4966.
 Cottrell MT, Manning A, Kirchman DL (2006) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mid-Atlantic Bight and the North Pacific Gyre. *Appl Environ Microbiol* 72:557-564.
 Galand PE, Leveau J, Poulet J, Garnaue ME, Vincent WF (2008) Microbial community diversity and heterotrophic production in a coastal Arctic ecosystem: A Itanukhi lake and its source waters. *Limnol Oceanogr* 53(2): 813-823.
 Yutin N, Suzuki MT, Teeling H, Weber N, Vorlovic Z, Raaijmakers AB, Béjà O (2007) Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling expedition metagenomes. *Environ Microbiol* 9: 1464-1475.

Group	MALINA stations	% of clone libraries (n=154)	Fast Blast hit	% of similarity	Origin
1	Every Beaufort samples	35.7%	CloneENV 20m11 (AF393999)	100%	Coastal Pacific water
2	360 Surface + DCM 680 Surface + DCM 620 Surface ARCL	21.2%	CloneENV 20m8 (AF393997)	98.8%	Coastal Pacific water
3	680 Surface 620 Surface + DCM	8.7%	Prosoppe 49 (GG466979)	88.6%	Coastal Atlantic water
4	360 DCM 680 DCM 620 DCM	6.5%	CloneENV JL-ECSF-8m85 (AY652827)	99.5%	Offshore and coastal seawater
5	360 Surface ARCL	3.8%	CloneENV PUF_108_8_2 (F4638990)	99%	Arctic coastal water
6	360 DCM	3.3%	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (CP000494)	90.9%	soil
7	360 DCM 697 680 DCM 620 DCM	3.3%	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> (CP000001)	98.8%	soil
8	360 DCM 620 DCM	2.2%	<i>Sphingomonas ursincola</i> (AB031016)	98.4%	Freshwater
9	360 surface 697	2.2%	CloneENV 2-43 (GU075076)	91.2%	Estuary
undef		13.1%			

TABLE I. Phylogenetic affiliations of the major pufM type sequences found in this study.

GENERAL CONCLUSION In this preliminary study, we have highlighted the potential crucial role of the MacKenzie River in the distribution, composition and diversity of the aerobic anoxygenic phototrophic communities in the Beaufort Sea ecosystem. AAnPB abundance and diversity will be linked to the environmental data collected during the cruise (available soon). This will help to confirm the hypotheses drawn on the basis of our results. Further work will aim at studying in this system the abundance and diversity of proterhodopsin-containing bacteria, another functional group of photoheterotrophic bacteria. Their ecological significance was recently suggested by the high numbers of SAR11 sequences recovered by Galand et al. (2008).

Summer Community Structure of Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria in the Western Arctic Ocean

Boëuf D.^a, M. Cottrell^b, D. Kirchman^b, P. Lebaron^c & C. Jeanthon^a

^a CNRS & UPMC Univ Paris VI, UMR 7144, Station Biologique, 29680 Roscoff, France

^b School of Marine Science and Policy, University of Delaware, Lewes, Delaware 19958, USA

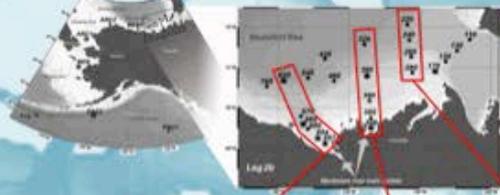
^c CNRS & UPMC, Univ Paris VI, UMR 7622, Observatoire Océanologique, 66651 Banyuls-sur-mer, France

INTRODUCTION

Photoheterotrophy is the ability to utilize organic substrates and harvest light energy and occurs in a broad range of microbes. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria are photoheterotrophs that require oxygen for their growth and for bacteriochlorophyll *a* synthesis. In the Arctic Ocean, we observe an increase in solar radiation due to a decrease in summer ice cover and an increase in the export of organic carbon to the ocean due to permafrost thawing and increased river-runoff.

Therefore, the hybrid metabolism of photoheterotrophs (respiration and phototrophy) may likely make them key players of coastal arctic ecosystems in the response to ongoing change.

Fig. 1 Locations of stations sampled during MALINA cruise. In summer 2009 from Vancouver to Beaufort Sea. Circles indicate stations where *pufM* clone libraries were constructed.



OBJECTIVES

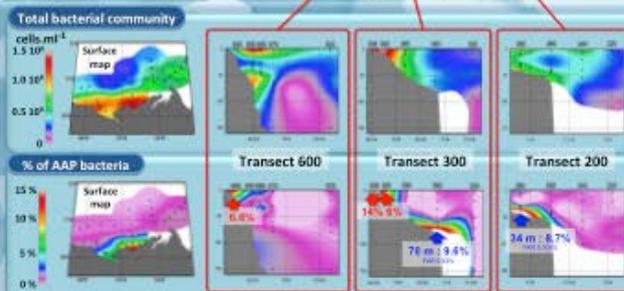
- To examine AAP community structure and factors that govern it in the Beaufort Sea (Fig.1) during summer
- To evaluate how the AAP populations will be affected by the ongoing climate changes

Abundance

using Infrared Epifluorescence Microscopy (Fig.2)

Based on the IR fluorescence of Bchl *a* -160 samples processed

Fig. 2 Spatial distribution of total prokaryotes (cells.ml⁻¹) and contribution of AAPs (%) in surface waters of the Beaufort Sea and along the transects 600, 300 and 200



Major Conclusions

- AAPs averaged 0.5% of total bacteria
- High contributions recorded :
 - in the Mackenzie record (~7%) and in the Bering sea (~10%) samples
 - in some deep samples (~9%) close to the bottom of the shelf in the benthic nepheloid layer

Diversity

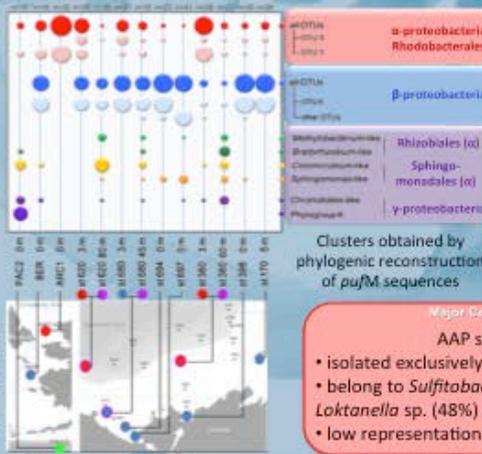
Molecular Methods (Fig.3) using *pufM* gene involved in Bchl *a* synthesis

365 sequences

Cultural Methods

92 strains

Fig. 3 Relative abundance of phylogenetic clusters in samples from the North Pacific waters (leg 1b) to the Beaufort Sea (leg 2b). Numbers of analyzed clones in each library are indicated.



Major Conclusions

- OTU 1** dominant in offshore surface stations
- OTU 6** dominant in stations under Mackenzie influence
- Rhizobiales and Sphingomonadales** associated with deep samples

Major Conclusions

- AAP strains
 - isolated exclusively from surface waters
 - belong to *Sulfitobacter* sp. (52%) and *Loktanella* sp. (48%) (Rhodobacterales)
 - low representation in clone libraries

Origin & Activity

Quantitative PCR assays (Fig.4) using primers targeting the major OTU

(OTU 6, 36% of total sequences)

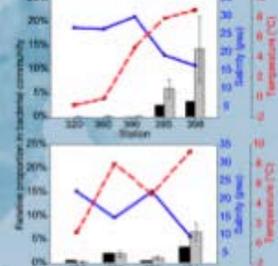


Fig. 4 Surface abundance of OTU 6 members and AAP bacteria along transects 300 and 600 in relation with temperature and salinity.

Major Conclusions

- % OTU6-*pufM* genes decreased gradually from Mackenzie plume to offshore waters
- OTU 6 members were detected in all Beaufort Sea surface samples except at the 3 northern stations (110, 220 and 320) and still actively expressed *pufM* in cold offshore waters (PCR survey on DNA and cDNA)

CONCLUSION

This study demonstrates that AAP composition and distribution in the Beaufort Sea is strongly influenced by oceanic circulation and riverine inputs (Fig.5), suggesting that ongoing climate change will affect AAP community structure mostly in arctic coastal environments.

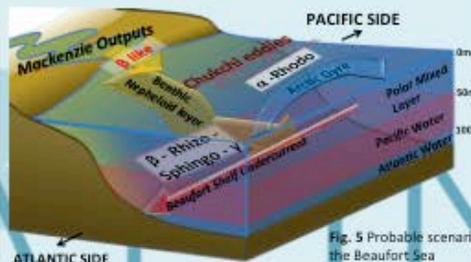


Fig. 5 Probable scenario explaining the distribution of AAP populations in the Beaufort Sea

This study was conducted as part of the Malina Scientific Program funded by ANR (Agence nationale de la recherche), INSU-CNRS (Institut national des sciences de l'univers - Centre national de la recherche scientifique), CNES (Centre national d'études spatiales) and ESA (European Space Agency). We thank all participants to the MALINA cruises for their help, especially M. Babin who coordinated the project, K. Lévesque for the logistics, and all CCGS Amundsen crew members. D. Boëuf was supported by a grant from the French Ministry of Higher Education and Research.

BIBLIOGRAPHIE

- Aagaard K, Coachman L** (1975). Toward an ice-free Arctic ocean. *Eos, Transactions American Geophysical Union* **56**: 484-486.
- Aagaard K, Coachman L, Carmack E** (1981). On the halocline of the Arctic Ocean. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers* **28**: 529-545.
- Aagaard K, Swift J, Carmack E** (1985). Thermohaline circulation in the Arctic Mediterranean seas. *Journal of Geophysical Research* **90**: 4833-4846.
- Aagaard K, Carmack EC** (1989). The Role of Sea Ice and Other Fresh Water in the Arctic Circulation. *Journal of Geophysical Research* **94**: 14485-14498.
- Achenbach LA, Carey J, Madigan MT** (2001). Photosynthetic and Phylogenetic Primers for Detection of Anoxygenic Phototrophs in Natural Environments. *Applied Environmental Microbiology* **67**: 2922-2926.
- ACIA** (2005). *Arctic climate impact assessment*. Cambridge University Press.
- Acinas SG, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, Pharino C, Ceraj I, Distel DL et al** (2004a). Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* **430**: 551-554.
- Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Polz MF** (2004b). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Journal of Bacteriology* **186**: 2629-2635.
- Ahlenius H, Johnsen K, Nellemann C** (2005). *Vital Arctic Graphics*. UNEP/GRID-Arendal: Arendal, Norway.
- Ahlgren NA, Rocap G** (2012). Diversity and distribution of marine *Synechococcus*: multiple gene phylogenies for consensus classification and development of qPCR assays for sensitive measurement of clades in the ocean. *Frontiers in Microbiology* **3**.
- Akram N, Palovaara J, Forsberg J, Lindh MV, Milton DL, Luo H et al** (2013). Regulation of proteorhodopsin gene expression by nutrient limitation in the marine bacterium *Vibrio* sp. AND4. *Environmental Microbiology*.
- Allakhverdiev SI, Nishiyama Y, Miyairi S, Yamamoto H, Inagaki N, Kanasaki Y et al** (2002). Salt Stress Inhibits the Repair of Photodamaged Photosystem II by Suppressing the Transcription and Translation of *psbA* Genes in *Synechocystis*. *Plant Physiology* **130**: 1443-1453.
- Allison FE, Hoover SR, Morris HJ** (1937). Physiological studies with the nitrogen-fixing alga, *Nostoc muscorum*. *Botanical Gazette* **98**: 433-463.
- Alonso-Sáez L, Sánchez O, Gasol JM, Balagué V, Pedrós-Alio C** (2008). Winter-to-summer changes in the composition and single-cell activity of near-surface Arctic prokaryotes. *Environmental Microbiology* **10**: 2444-2454.
- Alperovitch-Lavy A, Sharon I, Rohwer F, Aro E-M, Glaser F, Milo R et al** (2011). Reconstructing a puzzle: existence of cyanophages containing both photosystem-I and photosystem-II gene suites inferred from oceanic metagenomic datasets. *Environmental Microbiology* **13**: 24-32.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W et al** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Amann RI, Krumholz L, Stahl DA** (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**: 762-770.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH** (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without

- cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.
- AMAP** (1998). *AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Issues*. Arctic Monitoring and Assessment Programme: Oslo, Norway.
- Amaral-Zettler L, Artigas LF, Baross J, Bharathi P.A L, Boetius A, Chandramohan D et al** (2010). A Global Census of Marine Microbes. In: McIntyre AD (ed). *Life in the World's Oceans : diversity, distribution, and abundance*. Wiley-Blackwell. pp 221-245.
- Amon RMW** (2004). The Role of Dissolved Organic Matter for the Organic Carbon Cycle in the Arctic Ocean. In: Stein R, Macdonald RW (eds). *The organic carbon cycle in the Arctic Ocean*. Springer: Berlin. pp 83-99.
- Arístegui J, Gasol JM, Duarte CM, Herndl G** (2009). Microbial oceanography of the dark ocean's pelagic realm. *Limnol Oceanogr* **54**: 1501-1529.
- Armstrong GA** (1997). Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annual Reviews in Microbiology* **51**: 629-659.
- Arnell NW** (2005). Implications of climate change for freshwater inflows to the Arctic Ocean. *Journal of Geophysical Research* **110**: D07105.
- Arrigo KR, van Dijken G, Pabi S** (2008). Impact of a shrinking Arctic ice cover on marine primary production. *Geophysical Research Letters* **35**: 1-6.
- Arrigo KR, Perovich DK, Pickart RS, Brown ZW, van Dijken GL, Lowry KE et al** (2012). Massive phytoplankton blooms under Arctic Sea ice. *Science* **336**: 1408-1408.
- Atamna-Ismaeel N, Sabehi G, Sharon I, Witzel KP, Labrenz M, Jürgens K et al** (2008). Widespread distribution of proteorhodopsins in freshwater and brackish ecosystems. *The ISME journal* **2**: 656-662.
- Atamna-Ismaeel N, Finkel O, Glaser F, von Mering C, Vorholt JA, Koblížek M et al** (2012). Bacterial anoxygenic photosynthesis on plant leaf surfaces. *Environmental Microbiology Reports* **4**: 209-216.
- Azam F, Fenchel T, Gray JS, Meyer-Reill LA, Thingstad F** (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series* **10**: 257-263.
- Bahr M, Hobbie J, Sogin M** (1996). Bacterial diversity in an arctic lake: a freshwater SAR11 cluster. *Aquatic Microbial Ecology* **11**: 271-277.
- Bakermans C** (2012). Psychrophiles: Life in the Cold. In: Anitori R (ed). *Extremophiles: Microbiology and Biotechnology*. Horizon Scientific Press: Hethersett, UK. pp 53-76.
- Balashov SP, Imasheva ES, Boichenko VA, Antón J, Wang JM, Lanyi JK** (2005). Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna. *Science* **309**: 2061.
- Baldwin AJ, Moss JA, Pakulski JD, Catala P, Joux F, Jeffrey WH** (2005). Microbial diversity in a Pacific Ocean transect from the Arctic to Antarctic circles. *Aquatic Microbial Ecology* **41**: 91-102.
- Balkwill DL, Fredrickson JK, Romine MF** (2006). *Sphingomonas* and related genera. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edn edn. Springer: New York. pp 605-629.
- Balzano S, Gourvil P, Siano R, Chanoine M, Marie D, Lessard S et al** (2012a). Diversity of cultured photosynthetic flagellates in the northeast Pacific and Arctic Oceans in summer. *Biogeosciences* **9**: 4553-4571.
- Balzano S, Marie D, Gourvil P, Vaultot D** (2012b). Composition of the summer photosynthetic pico and nanoplankton communities in the Beaufort Sea assessed by T-RFLP and sequences of the 18S rRNA gene from flow cytometry sorted samples. *The ISME journal* **6**: 1480-1498.

- Bano N, Hollibaugh JT** (2002). Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 505.
- Bano N, Ruffin S, Ransom B, Hollibaugh JT** (2004). Phylogenetic composition of Arctic Ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 781-789.
- Barber DG, Hanesiak JM** (2004). Meteorological forcing of sea ice concentrations in the southern Beaufort Sea over the period 1979 to 2000. *Journal of Geophysical Research* **109**: C06014.
- Bates NR, Mathis JT** (2009). The Arctic Ocean marine carbon cycle: evaluation of air-sea CO₂ exchanges, ocean acidification impacts and potential feedbacks. *Biogeosciences* **6**: 2433-2459.
- Beatty JT** (2002). On the natural selection and evolution of the aerobic phototrophic bacteria. *Photosynthesis Research* **73**: 109-114.
- Béjà O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP et al** (2000). Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. *Science* **289**: 1902-1906.
- Béjà O, Spudich EN, Spudich JL, Leclerc M, DeLong EF** (2001). Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* **411**: 786-789.
- Béjà O, Suzuki MT, Heidelberg JF, Nelson WC, Preston CM, Hamada T et al** (2002). Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* **415**: 630-633.
- Béjà O, Suzuki MT** (2008). Photoheterotrophic marine prokaryotes. In: Kirchman DL (ed). *Microbial Ecology of the Oceans*, 2nd edn. Wiley-Blackwell: New York. pp 131-157.
- Bergey D, Harrison F, Breed R, Hammer B, Huntoon F** (1923). *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins Co: Baltimore, USA.
- Bernardet JF, Nakagawa Y** (2006). An Introduction to the Family *Flavobacteriaceae*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer: New York. pp 455-480.
- Biebl H, Wagner-Döbler I** (2006). Growth and bacteriochlorophyll *a* formation in taxonomically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in chemostat culture: influence of light regimen and starvation. *Process Biochemistry* **41**: 2153-2159.
- Biers EJ, Sun S, Howard EC** (2009). Prokaryotic genomes and diversity in surface ocean waters: interrogating the global ocean sampling metagenome. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 2221-2229.
- Boeuf D, Cottrell MT, Kirchman D, Lebaron P, Jeanthon C** (2013a). Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean. *FEMS Microbiology Ecology (in press)*.
- Boeuf D, Lami R, Cunnington E, Lebaron P, Jeanthon C** (2013b). Ecological Significance of Proteorhodopsin-containing Bacteria in the Arctic Ocean (submitted).
- Bogomolni RA, Spudich JL** (1982). Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**: 6250-6254.
- Boichenko VA, Wang JM, Antón J, Lanyi JK, Balashov SP** (2006). Functions of carotenoids in xanthorhodopsin and archaerhodopsin, from action spectra of photoinhibition of cell respiration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1757**: 1649-1656.
- Borneman J, Triplett EW** (1997). Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2647-2653.

- Bowman J** (2006). The Marine Clade of the Family *Flavobacteriaceae*: The Genera *Aequorivita*, *Arenibacter*, *Cellulophaga*, *Croceibacter*, *Formosa*, *Gelidibacter*, *Gillisia*, *Maribacter*, *Mesonina*, *Muricauda*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychroserpens*, *Robiginitalea*, *Salegentibacter*, *Tenacibaculum*, *Ulvibacter*, *Vitellibacter* and *Zobellia*. In: Springer, Dworkin M (eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*: New York. pp 677-694.
- Bowman JS, Rasmussen S, Blom N, Deming JW, Rysgaard S, Sicheritz-Ponten T** (2012). Microbial community structure of Arctic multiyear sea ice and surface seawater by 454 sequencing of the 16S RNA gene. *The ISME journal* **6**: 11-20.
- Brinkhoff T, Giebel H-A, Simon M** (2008). Diversity, ecology, and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. *Archives of Microbiology* **189**: 531-539.
- Brinkmeyer R, Knittel K, Jurgens J, Weyland H, Amann R, Helmke E** (2003). Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6610.
- Brinkmeyer R, Glöckner FO, Helmke E, Amann R** (2004). Predominance of β -proteobacteria in summer melt pools on Arctic pack ice. *Limnology and Oceanography* **49**: 1013-1021.
- Britschgi TB, Giovannoni SJ** (1991). Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 1707-1713.
- Brown MV, Fuhrman JA** (2005). Marine bacterial microdiversity as revealed by internal transcribed spacer analysis. *Aquatic Microbial Ecology* **41**: 15-23.
- Brown MV, Lauro FM, DeMaere MZ, Muir L, Wilkins D, Thomas T et al** (2012). Global biogeography of SAR11 marine bacteria. *Molecular Systems Biology* **8**.
- Buchan A, Gonzalez JM, Moran MA** (2005). Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5665-5677.
- Buck K, Chavez F, Campbell L** (1996). Basin-wide distributions of living carbon components and the inverted trophic pyramid of the central gyre of the North Atlantic Ocean, summer 1993. *Aquatic Microbial Ecology* **10**: 283-298.
- Button D, Schut F, Quang P, Martin R, Robertson BR** (1993). Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 881-891.
- Cadotte MW, Carscadden K, Mirotchnick N** (2011). Beyond species: functional diversity and the maintenance of ecological processes and services. *Journal of Applied Ecology* **48**: 1079-1087.
- CAFF** (2001). *Arctic Flora and Fauna: Status and Conservation*. Edita: Helsinki.
- Camill P** (2005). Permafrost thaw accelerates in boreal peatlands during late-20th century climate warming. *Climatic Change* **68**: 135-152.
- Campbell BJ, Waidner LA, Cottrell MT, Kirchman DL** (2008). Abundant proteorhodopsin genes in the North Atlantic Ocean. *Environmental Microbiology* **10**: 99-109.
- Carmack E, Barber D, Christensen J, Macdonald R, Rudels B, Sakshaug E** (2006). Climate variability and physical forcing of the food webs and the carbon budget on panarctic shelves. *Progress in Oceanography* **71**: 145-181.
- Carmack E, Wassmann P** (2006). Food webs and physical-biological coupling on pan-Arctic shelves: Unifying concepts and comprehensive perspectives. *Prog Oceanogr* **71**: 446-477.
- Carmack EC, MacDonald RW** (2002). Oceanography of the Canadian Shelf of the Beaufort Sea: a setting for marine life. *Arctic* **55**: 29-45.
- Carmack EC, Macdonald RW, Jasper S** (2004). Phytoplankton productivity on the

Canadian Shelf of the Beaufort Sea. *Marine Ecology Progress Series* **277**: 37-50.

Cauwet G, Sidorov I (1996). The biogeochemistry of Lena River: organic carbon and nutrients distribution. *Marine Chemistry* **53**: 211-227.

Cavaliere DJ, Gloersen P, Parkinson CL, Comiso JC, Zwally HJ (1997). Observed Hemispheric Asymmetry in Global Sea Ice Changes. *Science* **278**: 1104-1106.

Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen TJ (2005). A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology Letters* **8**: 148-159.

Chen F, Wang K, Kan J, Suzuki MT, Wommack KE (2006). Diverse and unique picocyanobacteria in Chesapeake Bay, revealed by 16S-23S rRNA internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2239-2243.

Chernyak BV, Dibrov PA, Glagolev AN, Sherman MY, Skulachev VP (1983). A novel type of energetics in a marine alkali-tolerant bacterium: $\Delta\mu$ -Na-driven motility and sodium cycle. *FEBS Letters* **164**: 38-42.

Chisholm SW, Olson RJ, Zettler ER, Goericke R, Waterbury JB, Welschmeyer NA (1988). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone.

Chisholm SW, Frankel SL, Goericke R, Olson RJ, Palenik B, Waterbury JB et al (1992). Prochlorococcus marinus nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll a and b. *Archives of Microbiology* **157**: 297-300.

Cho BC, Azam F (1990). Biogeochemical significance of bacterial biomass in the ocean's euphotic zone. *Marine ecology progress series Oldendorf* **63**: 253-259.

Cho JC, Giovannoni SJ (2004). Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 432-440.

Cho JC, Stapels MD, Morris RM, Vergin KL, Schwalbach MS, Givan SA et al (2007a). Polyphyletic photosynthetic reaction centre genes in oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Environ Microbiol* **9**: 1456-1463.

Cho JC, Stapels MD, Morris RM, Vergin KL, Schwalbach MS, Givan SA et al (2007b). Polyphyletic photosynthetic reaction centre genes in oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Environmental Microbiology* **9**: 1456-1463.

Christie-Oleza JA, Piña-Villalonga JM, Bosch R, Nogales B, Armengaud J (2012). Comparative Proteogenomics of Twelve Roseobacter Exoproteomes Reveals Different Adaptive Strategies Among These Marine Bacteria. *Molecular & Cellular Proteomics* **11**.

Church MJ, Ducklow HW, Karl DM (2004). Light dependence of [3 H] leucine incorporation in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 4079-4087.

Church MJ, Ducklow HW, Letelier RM, Karl DM (2006). Temporal and vertical dynamics in picoplankton photoheterotrophic production in the subtropical North Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* **45**: 41-53.

Church MJ (2008). Resource control of bacterial dynamics in the sea. In: Kirchman DL (ed). *Microbial Ecology of the Oceans*, 2nd edn. Wiley-Blackwell: New York. pp 335-382.

Ciccarelli FD, Doerks T, von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P (2006). Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life. *Science* **311**: 1283-1287.

Coachman LK, Aagaard K (1974). Physical Oceanography of Arctic and Subarctic Seas. DTIC Document.

Cohan FM (2002). What are bacterial species? *Annual Reviews in Microbiology* **56**: 457-487.

Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB (1973). Construction of biologically

functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **70**: 3240-3244.

Collins RE, Rocap G, Deming JW (2010). Persistence of bacterial and archaeal communities in sea ice through an Arctic winter. *Environmental Microbiology* **12**: 1828-1841.

Comeau AM, Li WKW, Tremblay JÉ, Carmack EC, Lovejoy C (2011). Arctic Ocean microbial community structure before and after the 2007 record sea ice minimum. *PLoS ONE* **6**: e27492.

Connon SA, Giovannoni SJ (2002). High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3878-3885.

Cooney MJ, Johnston WA, Pohl S, Bidigare RR (2006). Influence of photoperiod on pigmentation and metabolic efficiency of the marine aerobic anoxygenic photosynthetic bacterium *Erythrobacter longus* Strain NJ 3 Y. *Aquatic Microbial Ecology* **43**: 303-309.

Cota G, Pomeroy L, Harrison W, Jones E, Peters F, Sheldon WJ et al (1996). Nutrients, primary production and microbial heterotrophy in the southeastern Chukchi Sea: Arctic summer nutrient depletion and heterotrophy. *Marine Ecology Progress Series* **135**: 247-258.

Cottrell MT, Kirchman DL (2004). Single-cell analysis of bacterial growth, cell size, and community structure in the Delaware estuary. *Aquatic Microbial Ecology* **34**: 139-149.

Cottrell MT, Mannino A, Kirchman DL (2006). Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mid-Atlantic Bight and the North Pacific Gyre. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 557-564.

Cottrell MT, Michelou VK, Nemcek N, DiTullio G, Kirchman DL (2008). Carbon cycling by microbes influenced by light in the Northeast Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* **50**: 239-250.

Cottrell MT, Kirchman DL (2009). Photoheterotrophic microbes in the Arctic Ocean in summer and winter. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 4958-4966.

Cottrell MT, Ras J, Kirchman DL (2010). Bacteriochlorophyll and community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in a particle-rich estuary. *The ISME journal* **4**: 945-954.

Csotonyi JT, Swiderski J, Stackebrandt E, Yurkov V (2010). A new environment for aerobic anoxygenic phototrophic bacteria: biological soil crusts. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 651-656.

Csotonyi JT, Stackebrandt E, Swiderski J, Schumann P, Yurkov V (2011). *Chromocurvus halotolerans* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterial obligately aerobic anoxygenic phototroph, isolated from a Canadian hypersaline spring. *Archives of Microbiology* **193**: 573-582.

Curson ARJ, Rogers R, Todd JD, Brearley CA, Johnston AWB (2008). Molecular genetic analysis of a dimethylsulfoniopropionate lyase that liberates the climate-changing gas dimethylsulfide in several marine α -proteobacteria and *Rhodobacter sphaeroides*. *Environmental Microbiology* **10**: 757-767.

Curtis TP, Sloan WT, Scannell JW (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 10494-10499.

de la Torre JR, Christianson LM, Béjà O, Suzuki MT, Karl DM, Heidelberg J et al (2003). Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 12830-12835.

De Wit R, Bouvier T (2006). 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology* **8**: 755-758.

DeLong EF, Franks DG, Alldredge AL (1993). Phylogenetic diversity of aggregate-

attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography* **38**: 924-934.

DeLong EF, Wu KY, Prézelin BB, Jovine RV (1994). High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* **371**: 695-697.

DeLong EF, Preston CM, Mincer T, Rich V, Hallam SJ, Frigaard NU et al (2006). Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science* **311**: 496-503.

Dice LR (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26**: 297-302.

Díez B, Bergman B, Pedrós-Alió C, Antó M, Snoeijjs P (2012). High cyanobacterial *nifH* gene diversity in Arctic seawater and sea ice brine. *Environmental Microbiology Reports* **4**: 360-366.

Dorigo U, Volatier L, Humbert JF (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* **39**: 2207-2218.

Doxaran D, Ehn J, Bélanger S, Matsuoka A, Hooker S, Babin M (2012). Optical characterisation of suspended particles in the Mackenzie River plume (Canadian Arctic Ocean) and implications for ocean colour remote sensing. *Biogeosciences* **9**: 3213-3229.

Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C et al (2012). Geneious v5.6. Available from <http://www.geneious.com>.

Du H, Jiao N, Hu Y, Zeng Y (2006). Real-time PCR for quantification of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria based on *pufM* gene in marine environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **329**: 113-121.

Ducklow H, Shiah F (1993). Bacterial production in estuaries. In: TE F (ed). *Aquatic Microbiology: An Ecological Approach*. Blackwell: London. pp 261-284.

Dupont CL, Rusch DB, Yooseph S, Lombardo M-J, Alexander Richter R, Valas R et al (2012). Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage. *The ISME journal* **6**: 1186-1199.

Dyda RY, Suzuki MT, Yoshinaga MY, Rodger Harvey H (2009). The response of microbial communities to diverse organic matter sources in the Arctic Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **56**: 1249-1263.

Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* **17**: 7843-7853.

Eiler A (2006). Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: implications and consequences. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 7431-7437.

Eilers H, Pernthaler J, Peplies J, Glöckner FO, Gerdts G, Amann R (2001). Isolation of Novel Pelagic Bacteria from the German Bight and Their Seasonal Contributions to Surface Picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5134-5142.

Elifantz H, Dittel AI, Cottrell MT, Kirchman DL (2007). Dissolved organic matter assimilation by heterotrophic bacterial groups in the western Arctic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* **50**: 39.

Fandino LB, Riemann L, Steward GF, Azam F (2005). Population dynamics of Cytophaga-Flavobacteria during marine phytoplankton blooms analyzed by real-time quantitative PCR. *Aquatic Microbial Ecology* **40**: 251-257.

Ferrari V, Hollibaugh J (1999). Distribution of microbial assemblages in the Central Arctic Ocean Basin studied by PCR/DGGE: analysis of a large data set. *Hydrobiologia* **401**: 55-68.

Ferrera I, Gasol JM, Sebastián M, Hojerová E, Koblížek M (2011). Comparison of Growth Rates of Aerobic Anoxygenic

- Phototrophic Bacteria and Other Bacterioplankton Groups in Coastal Mediterranean Waters. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 7451-7458.
- Field KG** (1997). Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 63-70.
- Fioletov VE, Evans WFJ** (1997). The influence of ozone and other factors on surface radiation. In: Wardle DI, Kerr JB, McElroy CT, Francis DR (eds). *Ozone Science: a Canadian Perspective on the Changing Ozone Layer*. Environment Canada Report CARD 97-3. pp 73-90.
- Fischer SG, Lerman LS** (1979). Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* **16**: 191-200.
- Fisher M, Klug J, Lauster G, Newton M, Triplett E** (2000). Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity. *Microbial Ecology* **40**: 125-138.
- Fong N, Burgess M, Barrow K, Glenn D** (2001). Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**: 750-756.
- Frey KE, McClelland JW** (2009). Impacts of permafrost degradation on arctic river biogeochemistry. *Hydrological Processes* **23**: 169-182.
- Frias-Lopez J, Shi Y, Tyson GW, Coleman ML, Schuster SC, Chisholm SW et al** (2008). Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 3805.
- Frigaard NU, Martinez A, Mincer TJ, DeLong EF** (2006). Proteorhodopsin lateral gene transfer between marine planktonic Bacteria and Archaea. *Nature* **439**: 847-850.
- Fuchs BM, Spring S, Teeling H, Quast C, Wulf J, Schattenhofer M et al** (2007). Characterization of a marine gammaproteobacterium capable of aerobic anoxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 2891-2896.
- Fuhrman J, Azam F** (1982). Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Marine Biology* **66**: 109-120.
- Fuhrman JA, Hagström Å** (2008). Bacterial and archaeal community structure and its patterns. In: Kirchman DL (ed). *Microbial Ecology of the Oceans*, 2nd edn. Wiley-Blackwell: New York. pp 45-90.
- Fuhrman JA, Schwalbach MS, Stingl U** (2008). Proteorhodopsins: an array of physiological roles? *Nat Rev Micro* **6**: 488-494.
- Galand PE, Lovejoy C, Vincent WF** (2006). Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* **44**: 115-126.
- Galand PE, Lovejoy C, Pouliot J, Garneau ME, Vincent WF** (2008a). Microbial community diversity and heterotrophic production in a coastal Arctic ecosystem: A stamukhi lake and its source waters. *Limnology and Oceanography* **53**: 813-823.
- Galand PE, Lovejoy C, Pouliot J, Vincent WF** (2008b). Heterogeneous archaeal communities in the particle-rich environment of an arctic shelf ecosystem. *Journal of Marine Systems* **74**: 774-782.
- Galand PE, Casamayor EO, Kirchman DL, Lovejoy C** (2009a). Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 22427.
- Galand PE, Lovejoy C, Hamilton AK, Ingram RG, Pedneault E, Carmack EC** (2009b). Archaeal diversity and a gene for ammonia oxidation are coupled to oceanic circulation. *Environmental Microbiology* **11**: 971-980.
- Galand PE, Potvin M, Casamayor EO, Lovejoy C** (2010). Hydrography shapes bacterial

biogeography of the deep Arctic Ocean. *The ISME journal* **4**: 564-576.

García-Martínez J, Rodríguez-Valera F (2000). Microdiversity of uncultured marine prokaryotes: the SAR11 cluster and the marine Archaea of Group I. *Molecular Ecology* **9**: 935-948.

Garneau M, Vincent WF, Terrado R, Lovejoy C (2009). Importance of particle-associated bacterial heterotrophy in a coastal Arctic ecosystem. *Journal of Marine Systems* **75**: 185-197.

Garneau MÈ, Vincent WF, Alonso-Sáez L, Gratton Y, Lovejoy C (2006). Prokaryotic community structure and heterotrophic production in a river-influenced coastal arctic ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology* **42**: 27-40.

Garneau MÈ, Roy S, Lovejoy C, Gratton Y, Vincent WF (2008). Seasonal dynamics of bacterial biomass and production in a coastal arctic ecosystem: Franklin Bay, western Canadian Arctic. *Journal of Geophysical Research* **113**: C07S91.

Ghiglione J, Murray A (2012). Pronounced summer to winter differences and higher wintertime richness in coastal Antarctic marine bacterioplankton. *Environmental Microbiology* **14**: 617-629.

Ghiglione JF, Galand PE, Pommier T, Pedrós-Alió C, Maas EW, Bakker K et al (2012). Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 17633-17638.

Gibbons SM, Caporaso JG, Pirrung M, Field D, Knight R, Gilbert JA (2013). Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Giovannoni S, Rappé M (2000). Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In: Kirchman DL (ed). *Microbial Ecology of the Oceans*, 1st edn. Wiley-Liss: New York. pp 47-84.

Giovannoni S, Stingl U (2007). The importance of culturing bacterioplankton in the 'omics' age. *Nat Rev Micro* **5**: 820-826.

Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60-63.

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

Giovannoni SJ, Stingl U (2005). Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* **437**: 343-348.

Giovannoni SJ, Tripp HJ, Givan S, Podar M, Vergin KL, Baptista D et al (2005b). Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* **309**: 1242-1245.

Giraud E, Fleischman D (2004). Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynthesis Research* **82**: 115-130.

Glöckner FO, Fuchs BM, Amann R (1999). Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3721-3726.

Glöckner FO, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A et al (2000). Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5053-5065.

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

Gómez-Consarnau L, Akram N, Lindell K, Pedersen A, Neutze R, Milton DL et al (2010). Proteorhodopsin Phototrophy Promotes Survival of Marine Bacteria during Starvation. *PLoS Biology* **8**: e1000358.

- Gomila M, Bowien B, Falsen E, Moore ERB, Lalucat J** (2008). Description of *Roseateles aquatilis* sp. nov. and *Roseateles terrae* sp. nov., in the class *Betaproteobacteria*, and emended description of the genus *Roseateles*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**: 6-11.
- González JM, Kiene RP, Moran MA** (1999). Transformation of Sulfur Compounds by an Abundant Lineage of Marine Bacteria in the α -Subclass of the Class *Proteobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3810-3819.
- González JM, Simó R, Massana R, Covert JS, Casamayor EO, Pedrós-Alió C et al** (2000). Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4237-4246.
- González JM, Fernández-Gómez B, Fernández-Guerra A, Gómez-Consarnau L, Sánchez O, Coll-Lladó M et al** (2008). Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (Flavobacteria). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 8724.
- Gordeev VV, Martin JM, Sidorov IS, Sidorova MV** (1996). A reassessment of the Eurasian river input of water, sediment, major elements, and nutrients to the Arctic Ocean. *American Journal of Science* **296**: 664-691.
- Gosselin M, Levasseur M, Wheeler PA, Horner RA, Booth BC** (1997). New measurements of phytoplankton and ice algal production in the Arctic Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **44**: 1623-1644.
- Gradinger R, Lenz J** (1989). Picocyanobacteria in the high Arctic. *Marine ecology progress series Oldendorf* **52**: 99-101.
- Gradinger R** (2009). Sea-ice algae: Major contributors to primary production and algal biomass in the Chukchi and Beaufort Seas during May/June 2002. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **56**: 1201-1212.
- Green PN** (2006). *Methylobacterium*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer: New York. pp 257-265.
- Grote J, Bayindirli C, Bergauer K, de Moraes PC, Chen H, D'Ambrosio L et al** (2011). Draft genome sequence of strain HIMB100, a cultured representative of the SAR116 clade of marine *Alphaproteobacteria*. *Standards in genomic sciences* **5**: 269-278.
- Guo L, Ping CL, Macdonald RW** (2007). Mobilization pathways of organic carbon from permafrost to arctic rivers in a changing climate. *Geophys Res Lett* **34**: L13603.
- Häkkinen S, Rhines PB** (2009). Shifting surface currents in the northern North Atlantic Ocean. *J Geophys Res* **114**: C04005.
- Häkkinen S, Rhines PB, Worthen DL** (2011). Atmospheric blocking and Atlantic multidecadal ocean variability. *Science* **334**: 655-659.
- Harashima K, Shiba T, Totsuka T, Simidu U, Taga N** (1978). Occurrence of bacteriochlorophyll *a* in a strain of an aerobic heterotrophic bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry* **42**: 1627-1628.
- Harashima K, Nakagawa M, Murata N** (1982). Photochemical activities of bacteriochlorophyll in aerobically grown cells of aerobic heterotrophs, *Erythrobacter* species (OCh 114) and *Erythrobacter longus* (OCh 101). *Plant and Cell Physiology* **23**: 185-193.
- Harashima K, Kawazoe K, Yoshida I, Kamata H** (1987). Light-Stimulated Aerobic Growth of *Erythrobacter* Species OCh 114. *Plant and Cell Physiology* **28**: 365-374.
- Hauruseu D, Koblížek M** (2012). Influence of Light on Carbon Utilization in Aerobic Anoxygenic Phototrophs. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 7414-7419.
- Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S** (1977). Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **33**: 1225-1228.

- Holmes RM, McClelland JW, Peterson BJ, Shiklomanov IA, Shiklomanov AI, Zhulidov AV et al** (2002). A circumpolar perspective on fluvial sediment flux to the Arctic ocean. *Global Biogeochemical Cycles* **16**: 45-41-45-14.
- Hopcroft R, Bluhm B, Gradinger R, Whitlege T, Weingartner T, Norcross B et al** (2008). Arctic ocean synthesis: Analysis of climate change impacts in the Chukchi and beaufort seas with strategies for future research. *Fairbanks, AK: University of Alaska, Fairbanks, Institute of Marine Science*.
- Hu Y, Du H, Jiao N, Zeng Y** (2006). Abundant presence of the γ -like Proteobacterial *pufM* gene in oxic seawater. *FEMS Microbiology Letters* **263**: 200-206.
- Huang S, Wilhelm SW, Harvey HR, Taylor K, Jiao N, Chen F** (2012). Novel lineages of Prochlorococcus and Synechococcus in the global oceans. *The ISME journal* **6**: 285-297.
- Hubbard R, Kropf A** (1958). The Action of Light on Rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **44**: 130-139.
- Huggett MJ, Rappé MS** (2012). Genome sequence of strain HIMB55, a novel marine Gammaproteobacterium of the OM60/NOR5 Clade. *Journal of Bacteriology* **194**: 2393-2394.
- Hutalle-Schmelzer KML, Zwirnmann E, Krüger A, Grossart HP** (2010). Enrichment and cultivation of pelagic bacteria from a humic lake using phenol and humic matter additions. *FEMS Microbiology Ecology* **72**: 58-73.
- Hyman ED** (1988). A new method of sequencing DNA. *Analytical Biochemistry* **174**: 423-436.
- Igarashi N, Harada J, Nagashima S, Matsuura K, Shimada K, Nagashima KVP** (2001). Horizontal transfer of the photosynthesis gene cluster and operon rearrangement in purple bacteria. *Journal of Molecular Evolution* **52**: 333-341.
- IPCC** (2007). *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, vol. 446. IPCC: Geneva, Switzerland.
- Jang Y, Oh H-M, Kang I, Lee K, Yang S-J, Cho J-C** (2011). Genome sequence of strain IMCC3088, a proteorhodopsin-containing marine bacterium belonging to the OM60/NOR5 clade. *Journal of Bacteriology* **193**: 3415-3416.
- Jeanthon C, Boeuf D, Dahan O, Le Gall F, Garczarek L, Bendif EM et al** (2011). Diversity of cultivated and metabolically active aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **8**: 1955-1970.
- Jeanthon C, Boeuf D** (in prep.). Ecological Significance of Proteorhodopsin-containing Bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea.
- Jiao N, Zhang Y, Zeng Y, Hong N, Liu R, Chen F et al** (2007). Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean. *Environmental Microbiology* **9**: 3091-3099.
- Jiao N, Herndl GJ, Hansell DA, Benner R, Kattner G, Wilhelm SW et al** (2010). Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat Rev Micro* **8**: 593-599.
- Jiao N, Azam F** (2011). Microbial carbon pump and its significance for carbon sequestration in the ocean. In: Jiao N, Azam F, Sanders S (eds). *Microbial Carbon Pump in the Ocean*. Science/AAAS: Washington, DC. pp 41-45.
- Johnson PW, Sieburth JM** (1979). Chroococcoid cyanobacteria in the sea: a ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and Oceanography* **24**: 928-935.
- Johnson ZI, Zinser ER, Coe A, McNulty NP, Woodward EMS, Chisholm SW**

- (2006). Niche partitioning among Prochlorococcus ecotypes along ocean-scale environmental gradients. *Science* **311**: 1737-1740.
- Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS** (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**: 1127-1129.
- Kaneko T, Atlas RM, Krichevsky M** (1977). Diversity of bacterial populations in the Beaufort Sea. *Nature* **270**: 596-599.
- Kang I, Kang D, Oh H-M, Kim H, Kim H-J, Kang T-W et al** (2011). Genome sequence of strain IMCC2047, a novel marine member of the Gammaproteobacteria. *Journal of Bacteriology* **193**: 3688-3689.
- Karl DM** (1979). Measurement of microbial activity and growth in the ocean by rates of stable ribonucleic acid synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **38**: 850-860.
- Karl DM** (2002). Hidden in a sea of microbes. *Nature* **415**: 590-591.
- Karr EA, Sattley WM, Jung DO, Madigan MT, Achenbach LA** (2003). Remarkable diversity of phototrophic purple bacteria in a permanently frozen Antarctic lake. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 4910-4914.
- Katoh K, Toh H** (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* **9**: 286-298.
- Katoh K, Asimenos G, Toh H** (2009). Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods in Molecular Biology* **537**: 39-64.
- Kellogg CT, Deming JW** (2009). Comparison of free-living, suspended particle, and aggregate-associated bacterial and archaeal communities in the Laptev Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **57**: 1-18.
- Kerstens K, De Vos P, Gillis M, Swings J, Vandamme P, Stackebrandt E** (2006). Introduction to the Proteobacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer: New York. pp 3-37.
- Khachane AN, Timmis KN, dos Santos VAPM** (2005). Uracil content of 16S rRNA of thermophilic and psychrophilic prokaryotes correlates inversely with their optimal growth temperatures. *Nucleic Acids Research* **33**: 4016-4022.
- Kim JY, Jo BH, Jo Y, Cha HJ** (2012). Improved production of biohydrogen in light-powered *Escherichia coli* by co-expression of proteorhodopsin and heterologous hydrogenase. *Microbial Cell Factories* **11**: 2.
- Kimura M** (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* **217**: 624-626.
- Kimura M** (1983). The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press (Cambridge Cambridgeshire and New York).
- Kinnard C, Zdanowicz CM, Fisher DA, Isaksson E, de Vernal A, Thompson LG** (2011). Reconstructed changes in Arctic sea ice over the past 1,450 years. *Nature* **479**: 509-512.
- Kirchman DL** (2002). The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* **39**: 91-100.
- Kirchman DL, Elifantz H, Dittel AI, Malmstrom RR, Cottrell MT** (2007). Standing stocks and activity of Archaea and Bacteria in the western Arctic Ocean. *Limnology and Oceanography* **52**: 495-507.
- Kirchman DL** (2008). New light on an important microbe in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 8487.
- Kirchman DL, Morán XAG, Ducklow H** (2009). Microbial growth in the polar oceans — role of temperature and potential impact of climate change. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 451-459.
- Kirchman DL, Cottrell MT, Lovejoy C** (2010). The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by

- pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Environmental Microbiology* **12**: 1132-1143.
- Kirchman DL, Hanson TE** (2012). Bioenergetics of photoheterotrophic bacteria in the oceans. *Environmental Microbiology Reports*: n/a-n/a.
- Kirk JTO** (2011). *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge Univ Pr: New York.
- Kling GW, Kipphut GW, Miller MC** (1991). Arctic lakes and streams as gas conduits to the atmosphere: Implications for tundra carbon budgets. *Science* **251**: 298-301.
- Koblížek M, Bèjà O, Bidigare RR, Christensen S, Benitez-Nelson B, Vetriani C et al** (2003). Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean. *Archives of Microbiology* **180**: 327-338.
- Koblížek M, Stoń-Egiert J, Sagan S, Kolber ZS** (2005). Diel changes in bacteriochlorophyll a concentration suggest rapid bacterioplankton cycling in the Baltic Sea. *FEMS Microbiology Ecology* **51**: 353-361.
- Koblížek M, Mašín M, Ras J, Poulton AJ, Prášil O** (2007). Rapid growth rates of aerobic anoxygenic phototrophs in the ocean. *Environmental Microbiology* **9**: 2401-2406.
- Koblížek M** (2011). Role of photoheterotrophic bacteria in the marine carbon cycle. In: Jiao N, Azam F, Sanders S (eds). *Microbial Carbon Pump in the Ocean*. Science/AAAS: Washington, DC. pp 49-51.
- Koh EY, Atamna-Ismaeel N, Martin A, Cowie ROM, Beja O, Davy SK et al** (2010). Proteorhodopsin-bearing bacteria in Antarctic sea ice. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 5918.
- Koh EY, Phua W, Ryan KG** (2011). Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in Antarctic sea ice and seawater. *Environmental Microbiology Reports* **3**: 710-716.
- Koh EY, Cowie ROM, Simpson AM, O'Toole R, Ryan KG** (2012). The origin of cyanobacteria in Antarctic sea ice: marine or freshwater? *Environmental Microbiology Reports*.
- Kolber ZS, Van Dover CL, Niederman RA, Falkowski PG** (2000). Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. *Nature* **407**: 177-179.
- Kolber ZS** (2001). Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* **292**: 2492-2495.
- Kolber ZS, Gerald F, Plumley, Lang AS, Beatty JT, Blankenship RE et al** (2001). Contribution of Aerobic Photoheterotrophic Bacteria to the Carbon Cycle in the Ocean. *Science* **292**: 2492-2495.
- Kwon S-K, Kim BK, Song JY, Kwak M-J, Lee CH, Yoon J-H et al** (2013). Genomic makeup of the marine flavobacterium *Nonlabens (Donghaeana) dokdonensis* DSW-6 and identification of a novel class of rhodopsins. *Genome Biology and Evolution* **5**.
- Labrenz M, Tindall B, Lawson PA, Collins MD, Schumann P, Hirsch P** (2000). *Staleyia guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., alpha-3-Proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 303-313.
- Lami R, Cottrell MT, Ras J, Ulloa O, Obernosterer I, Claustre H et al** (2007). High abundances of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in the South Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 4198.
- Lami R, Cottrell MT, Campbell BJ, Kirchman DL** (2009). Light-dependent growth and proteorhodopsin expression by Flavobacteria and SAR11 in experiments with Delaware coastal waters. *Environmental Microbiology* **11**: 3201-3209.
- Lamy D, Jeanthon C, Cottrell MT, Kirchman DL, Van Wambeke F, Ras J et al** (2011). Ecology of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **8**: 973-985.

- Lancaster CRD, Michel H** (1996). Three-dimensional structures of photosynthetic reaction centers. *Photosynthesis Research* **48**: 65-74.
- Lane DJ** (1991). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons.
- Lanyi JK, Balashov SP** (2011). Xanthorhodopsin. In: Ventosa A, Oren A, Ma Y (eds). *Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends*. Springer-Verlag: Berlin. pp 319-340.
- Lauro FM, McDougald D, Thomas T, Williams TJ, Egan S, Rice S et al** (2009). The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 15527-15533.
- Lee D-H, Zo Y-G, Kim S-J** (1996). Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3112-3120.
- Lehours AC, Cottrell MT, Dahan O, Kirchman DL, Jeanthon C** (2010). Summer distribution and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mediterranean Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology* **74**: 397-409.
- Li W** (1998). Annual average abundance of heterotrophic bacteria and *Synechococcus* in surface ocean waters. *Limnology and Oceanography* **43**: 1746-1753.
- Li WKW** (1994). Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eucaryotic ultraphytoplankton: measurements from flow cytometric sorting. *Limnology and Oceanography*: 169-175.
- Li WKW** (2009). From cytometry to macroecology: a quarter century quest in microbial oceanography. *Aquatic Microbial Ecology* **57**: 239-251.
- Lin L, He J, Zhao Y, Zhang F, Cai M** (2012). Flow cytometry investigation of picoplankton across latitudes and along the circum Antarctic Ocean. *Acta Oceanologica Sinica* **31**: 134-142.
- Lindell D, Sullivan MB, Johnson ZI, Tolonen AC, Rohwer F, Chisholm SW** (2004). Transfer of photosynthesis genes to and from *Prochlorococcus* viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 11013-11018.
- Lindell D, Jaffe JD, Johnson ZI, Church GM, Chisholm SW** (2005). Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature* **438**: 86-89.
- Liotenberg S, Steunou A-S, Picaud M, Reiss-Husson F, Astier C, Ouchane S** (2008). Organization and expression of photosynthesis genes and operons in anoxygenic photosynthetic proteobacteria. *Environmental Microbiology* **10**: 2267-2276.
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ** (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4516-4522.
- Loeng H, Brander K, Carmack E, Denisenko S, Drinkwater K, Hansen B et al** (2005). Marine systems. *Arctic climate impact assessment*: 439-538.
- Longhurst AR** (1991). Role of the Marine Biosphere in the Global Carbon Cycle. *Limnology and Oceanography* **36**: 1507-1526.
- Lovejoy C, Vincent WF, Bonilla S, Roy S, Martineau MJ, Terrado R et al** (2007). Distribution, phylogeny, and growth of cold-adapted picoprasinophytes in Arctic Seas. *Journal of Phycology* **43**: 78-89.
- Lovejoy C, Potvin M** (2011). Microbial eukaryotic distribution in a dynamic Beaufort Sea and the Arctic Ocean. *Journal of Plankton Research* **33**: 431-444.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H** (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**: 1363-1371.

- Macdonald R, Wong C, Erickson P** (1987). The distribution of nutrients in the southeastern Beaufort Sea: Implications for water circulation and primary production. *Journal of Geophysical Research* **92**: 2939-2952.
- Macdonald RW, Solomon SM, Cranston RE, Welch HE, Yunker MB, Gobeil C** (1998). A sediment and organic carbon budget for the Canadian Beaufort Shelf. *Marine Geology* **144**: 255-273.
- Macdonald RW, Harner T, Fyfe J** (2005). Recent climate change in the Arctic and its impact on contaminant pathways and interpretation of temporal trend data. *Science of the Total Environment* **342**: 5-86.
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP** (2010a). Microbial Growth. In: Cummings B (ed). *Brock Biology of Microorganisms*, 13th edn. Pearson Education: San Francisco. pp 117-149.
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP** (2010b). Phototrophy, Chemolithotrophy, and Major Biosyntheses. In: Cummings B (ed). *Brock Biology of Microorganisms*, 13th edn. Pearson Education: San Francisco. pp 340-371.
- Malmström RR, Kiene RP, Cottrell MT, Kirchman DL** (2004a). Contribution of SAR11 bacteria to dissolved dimethylsulfoniopropionate and amino acid uptake in the North Atlantic ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 4129-4135.
- Malmström RR, Kiene RP, Kirchman DL** (2004b). Identification and Enumeration of Bacteria Assimilating Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the North Atlantic and Gulf of Mexico. *Limnology and Oceanography* **49**: 597-606.
- Malmström RR, Kiene RP, Vila M, Kirchman DL** (2005). Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) assimilation by *Synechococcus* in the Gulf of Mexico and northwest Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography*: 1924-1931.
- Malmström RR, Straza TRA, Cottrell MT, Kirchman DL** (2007). Diversity, abundance, and biomass production of bacterial groups in the western Arctic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* **47**: 45-55.
- Man D, Wang W, Sabehi G, Aravind L, Post AF, Massana R et al** (2003). Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. *EMBO Journal* **22**: 1725-1731.
- Mann NH, Cook A, Millard A, Bailey S, Clokie M** (2003). Marine ecosystems: bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature* **424**: 741-741.
- Manson MD, Tedesco P, Berg HC, Harold FM, Van der Drift C** (1977). A protonmotive force drives bacterial flagella. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 3060-3064.
- Marchant HJ, Davidson AT, Wright SW** (1987). *The distribution and abundance of chroococcoid cyanobacteria in the Southern Ocean*. National Institute of Polar Research.
- Margoliash E** (1963). Primary structure and evolution of cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **50**: 672-679.
- Margulis L** (ed) (1981) *Symbiosis in cell evolution: Life and its environment on the early Earth*. WH Freeman: San Francisco.
- Marie D, Shi XL, Rigaut-Jalabert F, Vaulot D** (2010). Use of flow cytometric sorting to better assess the diversity of small photosynthetic eukaryotes in the English Channel. *FEMS Microbiology Ecology* **72**: 165-178.
- Martinez-Garcia M, Swan BK, Poulton NJ, Gomez ML, Masland D, Sieracki ME et al** (2012). High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton. *The ISME journal* **6**: 113-123.
- Mašín M, Zdun A, Ston-Egiert J, Nausch M, Labrenz M, Moulisova V et al** (2006). Seasonal changes and diversity of aerobic anoxygenic phototrophs in the Baltic Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **45**: 247-254.

- Matsuno-Yagi A, Mukohata Y** (1977). Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **78**: 237-243.
- Matsuno-Yagi A, Mukohata Y** (1980). ATP synthesis linked to light-dependent proton uptake in a red mutant strain of *Halobacterium* lacking bacteriorhodopsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **199**: 297-303.
- Matsuoka A, Hill V, Huot Y, Babin M, Bricaud A** (2011). Seasonal variability in the light absorption properties of western Arctic waters: Parameterization of the individual components of absorption for ocean color applications. *Journal of Geophysical Research* **116**: C02007.
- Maxam AM, Gilbert W** (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 560-564.
- McCarren J, DeLong EF** (2007). Proteorhodopsin photosystem gene clusters exhibit co-ancestry among diverse marine microbial phyla. *Environmental Microbiology* **9**: 846-858.
- McClelland J, Holmes RM, Dunton KH, Macdonald RW** (2012). The Arctic Ocean Estuary. *Estuaries and Coasts* **35**: 353-368.
- McClelland JW, Déry SJ, Peterson BJ, Holmes RM, Wood EF** (2006). A pan-arctic evaluation of changes in river discharge during the latter half of the 20th century. *Geophysical Research Letters* **33**: L06715.
- McEvoy JP, Brudvig GW** (2006). Water-splitting chemistry of photosystem II. *Chemical Reviews* **106**: 4455-4483.
- McGuire AD, Anderson LG, Christensen TR, Dallimore S, Guo L, Hayes DJ et al** (2009). Sensitivity of the carbon cycle in the Arctic to climate change. *Ecological Monographs* **79**: 523-555.
- Melchior DL, Bruggemann EP, Steim JM** (1982). The physical state of quick-frozen membranes and lipids. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **690**: 81-88.
- Meon B, Amon RMW** (2004). Heterotrophic bacterial activity and fluxes of dissolved free amino acids and glucose in the Arctic rivers Ob, Yenisei and the adjacent Kara Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **37**: 121-135.
- Michelou VK, Cottrell MT, Kirchman DL** (2007). Light-stimulated bacterial production and amino acid assimilation by cyanobacteria and other microbes in the North Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5539.
- Mikkat S, Effmert U, Hagemann M** (1997). Uptake and use of the osmoprotective compounds trehalose, glucosylglycerol, and sucrose by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Archives of Microbiology* **167**: 112-118.
- Molloy S** (2012). Marine microbiology: SAR86: streamlined for success. *Nat Rev Micro* **10**: 82-83.
- Montesinos ML, Herrero A, Flores E** (1997). Amino acids and transporters: taxonomically diverse cyanobacteria and identification of two genes encoding elements of a neutral amino acid permease putatively involved in recapture of leaked hydrophobic amino acids. *Journal of Bacteriology* **179**: 853-862.
- Moore LR, Goericke R, Chisholm SW** (1995). Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Marine ecology progress series Oldendorf* **116**: 259-275.
- Moran MA, Belas R, Schell MA, Gonzalez JM, Sun F, Sun S et al** (2007). Ecological genomics of marine Roseobacters. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 4559-4569.
- Moraru C, Lam P, Fuchs BM, Kuypers MMM, Amann R** (2010). GeneFISH – an *in situ* technique for linking gene presence and cell identity in environmental microorganisms. *Environmental Microbiology* **12**: 3057-3073.

- Morgan-Kiss RM, Priscu JC, Pockock T, Gudynaite-Savitch L, Huner NPA** (2006). Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 222-252.
- Morris R, Longnecker K, Giovannoni S** (2006). *Pirellula* and OM43 are among the dominant lineages identified in an Oregon coast diatom bloom. *Environmental Microbiology* **8**: 1361-1370.
- Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA et al** (2002). SAR 11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* **420**: 806-810.
- Morris RM, Vergin KL, Cho JC, Rappé MS, Carlson CA, Giovannoni SJ** (2005). Temporal and spatial response of bacterioplankton lineages to annual convective overturn at the Bermuda Atlantic Time-series Study site. *Limnology and Oceanography* **50**: 1687-1696.
- Morris RM, Nunn BL, Frazar C, Goodlett DR, Ting YS, Rocap G** (2010). Comparative metaproteomics reveals ocean-scale shifts in microbial nutrient utilization and energy transduction. *The ISME journal* **4**: 673-685.
- Mou X, Moran MA, Stepanauskas R, González JM, Hodson RE** (2005). Flow-cytometric cell sorting and subsequent molecular analyses for culture-independent identification of bacterioplankton involved in dimethylsulfoniopropionate transformations. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1405-1416.
- Mukohata Y, Kaji Y** (1981). Light-induced membrane-potential increase, ATP synthesis, and proton uptake in *Halobacterium halobium* R_{1mR} catalyzed by halorhodopsin: Effects of *N*, *N'*-dicyclohexylcarbodiimide, triphenyltin chloride, and 3, 5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidenemalononitrile (SF6847). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **206**: 72-76.
- Mullins TD, Britschgi TB, Krest RL, Giovannoni SJ** (1995). Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnology and Oceanography* **40**: 148-158.
- Mullis KB, Faloona FA** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**: 335-350.
- Murphy L, Haugen E** (1985). The distribution and abundance of phototrophic ultraplankton in the North Atlantic. *Limnology and Oceanography*: 47-58.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG** (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695-700.
- Muyzer G, Smalla K** (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 127-141.
- Napolitano MJ, Shain DH** (2005). Distinctions in adenylate metabolism among organisms inhabiting temperature extremes. *Extremophiles* **9**: 93-98.
- Nellemann C, Corcoran E, Duarte CM, Valdès L, De Young C, Fonseca L et al** (2009). Blue Carbon. A Rapid Response Assessment. United Nations Environment Programme, GRID-Arendal.
- Nelson DL, Cox MM** (2008). Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In: Lehninger (ed). *Principles of Biochemistry*, 5th edn. W. H. Freeman and company: New York. pp 707-772.
- Nelson FE** (2003). (Un) frozen in time. *Science* **299**: 1673-1675.
- Nghiem SV, Rigor IG, Perovich DK, Clemente-Colón P, Weatherly JW, Neumann G** (2007). Rapid reduction of Arctic perennial sea ice. *Geophysical Research Letters* **34**: L19504.

- Niederberger TD, Perreault NN, Tille S, Lollar BS, Lacrampe-Couloume G, Andersen D et al** (2010). Microbial characterization of a subzero, hypersaline methane seep in the Canadian High Arctic. *The ISME journal* **4**: 1326-1339.
- Nishimura K, Shimada H, Ohta H, Masuda T, Shioi Y, Takamiya K** (1996). Expression of the *puf* operon in an aerobic photosynthetic bacterium, *Roseobacter denitrificans*. *Plant and Cell Physiology* **37**: 153-159.
- Noble RT, Fuhrman JA** (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* **14**: 113-118.
- Not F, Massana R, Latasa M, Marie D, Colson C, Eikrem W et al** (2005). Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas. *Limnology and Oceanography* **50**: 1677-1686.
- O'Brien M, Macdonald R, Melling H, Iseki K** (2006). Particle fluxes and geochemistry on the Canadian Beaufort Shelf: implications for sediment transport and deposition. *Continental Shelf Research* **26**: 41-81.
- O'Sullivan LA, Fuller KE, Thomas EM, Turley CM, Fry JC, Weightman AJ** (2004). Distribution and culturability of the uncultivated 'AGG58 cluster' of the *Bacteroidetes* phylum in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* **47**: 359-370.
- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA** (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Oda Y, Star B, Huisman LA, Gottschal JC, Forney LJ** (2003). Biogeography of the Purple Nonsulfur Bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5186-5191.
- Oesterhelt D, Stoekenius W** (1971). Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature* **233**: 149-152.
- Ogawa H, Amagai Y, Koike I, Kaiser K, Benner R** (2001). Production of Refractory Dissolved Organic Matter by Bacteria. *Science* **292**: 917-920.
- Oh H-M, Kwon KK, Kang I, Kang SG, Lee J-H, Kim S-J et al** (2010). Complete genome sequence of "Candidatus *Puniceispirillum marinum*" IMCC1322, a representative of the SAR116 clade in the *Alphaproteobacteria*. *Journal of Bacteriology* **192**: 3240-3241.
- Oh H-M, Kang I, Lee K, Jang Y, Lim S-I, Cho J-C** (2011a). Complete Genome Sequence of Strain IMCC9063, Belonging to SAR11 Subgroup 3, Isolated from the Arctic Ocean. *Journal of Bacteriology* **193**: 3379-3380.
- Oh H-M, Lee K, Jang Y, Kang I, Kim H-J, Kang T-W et al** (2011b). Genome Sequence of Strain IMCC9480, a Xanthorhodopsin-Bearing Betaproteobacterium Isolated from the Arctic Ocean. *Journal of Bacteriology* **193**: 3421-3421.
- Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA** (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Reviews in Microbiology* **40**: 337-365.
- Opsahl S, Benner R, Amon RMW** (1999). Major flux of terrigenous dissolved organic matter through the Arctic Ocean. *Limnology and Oceanography* **44**: 2017-2023.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K** (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**: 874-879.
- Ortega-Retuerta E, Jeffrey W, Ghiglione J, Joux F** (2012a). Evidence of heterotrophic prokaryotic activity limitation by nitrogen in the Western Arctic Ocean during summer. *Polar Biology* **35**: 785-794.
- Ortega-Retuerta E, Jeffrey WH, Babin M, Bélanger S, Benner R, Marie D et al** (2012b). Carbon fluxes in the Canadian Arctic: patterns and drivers of bacterial abundance, production and respiration on the Beaufort Sea margin. *Biogeosciences* **9**: 3679-3692.

- Ortega-Retuerta E, Joux F, Jeffrey WH, Ghiglione JF** (2012c). Spatial variability of particle-attached and free-living bacterial diversity in surface waters from the Mackenzie River to the Beaufort Sea (Canadian Arctic). *Biogeosciences Discuss* **9**: 17401-17435.
- Overmann J, Garcia-Pichel F** (2006). The Phototrophic Way of Life. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer: New York. pp 32-85.
- Overpeck J, Hughen K, Hardy D, Bradley R, Case R, Douglas M et al** (1997). Arctic Environmental Change of the Last Four Centuries. *Science* **278**: 1251-1256.
- Oz A, Sabehi G, Koblizek M, Massana R, Beja O** (2005). Roseobacter-like bacteria in Red and Mediterranean Sea aerobic anoxygenic photosynthetic populations. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 344-353.
- Paerl HW** (1991). Ecophysiological and trophic implications of light-stimulated amino acid utilization in marine picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 473-479.
- Page KA, Connon SA, Giovannoni SJ** (2004). Representative freshwater bacterioplankton isolated from Crater Lake, Oregon. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6542-6550.
- Painchaud J, Therriault J, Legendre L** (1995). Assessment of salinity-related mortality of freshwater bacteria in the Saint Lawrence estuary. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 205-208.
- Palenik B, Brahamsha B, Larimer F, Land M, Hauser L, Chain P et al** (2003). The genome of a motile marine Synechococcus. *Nature* **424**: 1037-1042.
- Partensky F, Blanchot J, Vaultot D** (1999a). Differential distribution and ecology of Prochlorococcus and Synechococcus in oceanic waters: a review. *BULLETIN-INSTITUT OCEANOGRAPHIQUE MONACO-NUMERO SPECIAL-*: 457-476.
- Partensky F, Hess W, Vaultot D** (1999b). Prochlorococcus, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 106-127.
- Pedrós-Alió C** (2006). Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* **14**: 257-263.
- Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R** (2002). Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3094-3101.
- Pernthaler A, Pernthaler J** (2005). Diurnal variation of cell proliferation in three bacterial taxa from coastal North Sea waters. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4638-4644.
- Pernthaler J** (2005). Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 537-546.
- Perovich DK** (2011). The changing Arctic sea ice cover. *Oceanography-Oceanography Society* **24**: 162-173.
- Petersen J, Brinkmann H, Bunk B, Michael V, Päuker O, Pradella S** (2012). Think pink: photosynthesis, plasmids and the Roseobacter clade. *Environmental Microbiology* **14**: 2661-2672.
- Peterson BJ, Holmes RM, McClelland JW, Vörösmarty CJ, Lammers RB, Shiklomanov AI et al** (2002). Increasing river discharge to the Arctic Ocean. *Science* **298**: 2171-2173.
- Pidwirny M** (2006). Introduction to the Oceans. *Fundamentals of Physical Geography*.
- Pomeroy LR** (1974). The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. *Bioscience* **24**: 499-504.
- Pomeroy LR, Deibel D** (1986). Temperature regulation of bacterial activity during the spring bloom in Newfoundland coastal waters. *Science* **233**: 359-361.

- Pomeroy LR, Macko S, Ostrom P, Dunphy J** (1990). The microbial food web in Arctic seawater: Concentration of dissolved free amino acids and bacterial abundance and activity in the Arctic Ocean and in Resolute Passage. *Marine ecology progress series Oldendorf* **61**: 31-40.
- Pomeroy LR, Wiebe WJ** (2001). Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* **23**: 187-204.
- Pommier T, Canbäck B, Riemann L, Boström KH, Simu K, Lundberg P et al** (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Molecular Ecology* **16**: 867-880.
- Porcher C, Malinge M, Picat C, Grandchamp B** (1992). A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer. *BioTechniques* **13**: 106-114.
- Poretsky RS, Hewson I, Sun S, Allen AE, Zehr JP, Moran MA** (2009). Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre. *Environmental Microbiology* **11**: 1358-1375.
- Porter K, Feig YS** (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* **25**: 943-948.
- Powell L, Bowman J, Skerratt J, Franzmann P, Burton H** (2005). Ecology of a novel Synechococcus clade occurring in dense populations in saline Antarctic lakes. *Marine Ecology Progress Series* **291**: 65-80.
- Pradella S, Allgaier M, Hoch C, Päuker O, Stackebrandt E, Wagner-Döbler I** (2004). Genome organization and localization of the *pufLM* genes of the photosynthesis reaction center in phylogenetically diverse marine Alphaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3360-3369.
- Rachold V, Grigoriev MN, Are FE, Solomon S, Reimnitz E, Kassens H et al** (2000). Coastal erosion vs riverine sediment discharge in the Arctic Shelf seas. *International Journal of Earth Sciences* **89**: 450-460.
- Rachold V, Eicken H, Gordeev V, Grigoriev M, Hubberten HW, Lisitzin A et al** (2004). Modern terrigenous organic carbon input to the Arctic Ocean. *The Organic Carbon Cycle in the Arctic Ocean* **1**: 33-56.
- Rahmstorf S** (2002). Ocean circulation and climate during the past 120,000 years. *Nature* **419**: 207-214.
- Rappé MS, Kemp PF, Giovannoni SJ** (1997). Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. *Limnology and Oceanography* **42**: 811-826.
- Rappé MS, Vergin K, Giovannoni SJ** (2000). Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. *FEMS Microbiology Ecology* **33**: 219-232.
- Rappé MS, Cannon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ** (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR 11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**: 630-633.
- Rappé MS, Giovannoni SJ** (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology* **57**: 369-394.
- Rathgeber C, Beatty JT, Yurkov V** (2004). Aerobic phototrophic bacteria: new evidence for the diversity, ecological importance and applied potential of this previously overlooked group. *Photosynthesis Research* **81**: 113-128.
- Riedel T, Tomasch J, Buchholz I, Jacobs J, Kollenberg M, Gerdtts G et al** (2010). Constitutive expression of the proteorhodopsin gene by a Flavobacterium strain representative of the proteorhodopsin-producing microbial community in the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 3187.
- Riemann L, Steward GF, Azam F** (2000). Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm

diatom bloom. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 578-587.

Riemann L, Leitet C, Pommier T, Simu K, Holmfeldt K, Larsson U et al (2008). The native bacterioplankton community in the central Baltic Sea is influenced by freshwater bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 503-515.

Rippka R (1972). Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Archiv fur Mikrobiologie* **87**: 93-98.

Rippka R, Coursin T, Hess W, Lichtlé C, Scanlan DJ, Palinska KA et al (2000). *Prochlorococcus marinus* Chisholm et al. 1992 subsp. *pastoris* subsp. nov. strain PCC 9511, the first axenic chlorophyll *a2/b2*-containing cyanobacterium (Oxyphotobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1833-1847.

Robineau B, Legendre L, Michel C, Budéus G, Kattner G, Schneider W et al (1999). Ultraphytoplankton abundances and chlorophyll *a* concentrations in ice-covered waters of northern seas. *Journal of Plankton Research* **21**: 735-755.

Rocap G, Distel DL, Waterbury JB, Chisholm SW (2002). Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1180-1191.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.

Rosenberg G (1993). Environmental control and potential fate of size-fractionated phytoplankton production in the Greenland Sea (75° N). *Marine Ecology Progress Series* **98**: 297-313.

Rosselló (2004). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 39-67.

Rothrock DA, Yu Y, Maykut GA (1999). Thinning of the Arctic sea-ice cover. *Geophysical Research Letters* **26**: 3469-3472.

Rothrock DA, Zhang J, Yu Y (2003). The arctic ice thickness anomaly of the 1990s: A consistent view from observations and models. *Journal of Geophysical Research: Oceans* **108**.

Rudels B, Anderson L, Jones E (1996). Formation and evolution of the surface mixed layer and halocline of the Arctic Ocean. *Journal of Geophysical Research* **101**: 8807-8821.

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

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

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

Sabehi G, Kirkup BC, Rozenberg M, Stambler N, Polz MF, Béjà O (2007). Adaptation and spectral tuning in divergent marine proteorhodopsins from the eastern Mediterranean and the Sargasso Seas. *The ISME journal* **1**: 48-55.

Sakshaug E (2004). Primary and secondary production in the Arctic Seas. In: Stein R, Macdonald RW (eds). *The organic carbon cycle in the Arctic Ocean*. Springer-Verlag: Heidelberg. pp 57-82.

Salka I, Moulisova V, Koblizek M, Jost G, Jurgens K, Labrenz M (2008). Abundance, depth distribution, and composition of aerobic bacteriochlorophyll *a*-producing bacteria in four basins of the central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 4398-4404.

Salka I, Čuperová Z, Mašin M, Koblížek M, Grossart HP (2011). *Rhodospirillum rubrum*-related *pufM* gene cluster dominates the aerobic

anoxygenic phototrophic communities in German freshwater lakes. *Environmental Microbiology* **13**: 2865-2875.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5463-5467.

Sato K, Shiba T, Shioi Y (1989). Regulation of the Biosynthesis of Bacteriochlorophyll. In: Harashima K, Shiba T, Murata N (eds). *Aerobic photosynthetic bacteria*. Japan Scientific Societies Press. p 95.

Scanlan DJ, West NJ (2002). Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiology Ecology* **40**: 1-12.

Scheer H (1991). Structure and occurrence of chlorophylls. In: Scheer H (ed). *Chlorophylls*. CRC Press: Boca Raton. pp 3-30.

Schlegel HG, Jannasch HW (1967). Enrichment cultures. *Annual Reviews in Microbiology* **21**: 49-70.

Schlitzer R (2010). Ocean Data View, <http://odv.awi.de>.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB et al (2009). Introducing Mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7537-7541.

Schmidt TM, DeLong E, Pace N (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology* **173**: 4371-4378.

Schwalbach MS, Fuhrman JA (2005). Wide-ranging abundances of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence microscopy and quantitative PCR. *Limnology and Oceanography* **50**: 620-628.

Selje N, Simon M, Brinkhoff T (2004). A newly discovered *Roseobacter* cluster in

temperate and polar oceans. *Nature* **427**: 445-448.

Serreze M, Walsh J, Chapin FS, Osterkamp T, Dyrgerov M, Romanovsky V et al (2000). Observational evidence of recent change in the northern high-latitude environment. *Climatic Change* **46**: 159-207.

Serreze MC, Barrett AP, Slater AG, Woodgate RA, Aagaard K, Lammers RB et al (2006). The large-scale freshwater cycle of the Arctic. *Journal of Geophysical Research: Oceans (1978–2012)* **111**: C11010.

Shannon CE, Weaver W, Blahut RE, Hajek B (1949). *The mathematical theory of communication*, vol. 117. University of Illinois press Urbana.

Shannon CE (2001). A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review* **5**: 3-55.

Sharma AK, Zhaxybayeva O, Papke RT, Doolittle WF (2008). Actinorhodopsins: proteorhodopsin -like gene s predominantly in non -marine enviro *Environmental Microbiology* **10**: 1039-1056.

Sharma AK, Sommerfeld K, Bullerjahn GS, Matteson AR, Wilhelm SW, Jezbera J et al (2009). Actinorhodopsin genes discovered in diverse freshwater habitats and among cultivated freshwater Actinobacteria. *The ISME journal* **3**: 726-737.

Sharon I, Alperovitch A, Rohwer F, Haynes M, Glaser F, Atamna-Ismael N et al (2009). Photosystem I gene cassettes are present in marine virus genomes. *Nature* **461**: 258-262.

Shen Y, Fichot CG, Benner R (2012). Dissolved organic matter composition and bioavailability reflect ecosystem productivity in the Western Arctic Ocean. *Biogeosciences* **9**: 4993-5005.

Sherr E, Sherr B (1988). Role of Microbes in Pelagic Food Webs: A Revised Concept. *Limnology and Oceanography* **33**: 1225-1227.

- Sherr E, Sherr B** (2008). Understanding roles of microbes in marine pelagic food webs: a brief history. In: Kirchman DL (ed). *Microbial Ecology of the Oceans*, 2nd edn. Wiley-Blackwell: New York. pp 27-44.
- Shiba T, Simidu U, Taga N** (1979). Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *Applied and Environmental Microbiology* **38**: 43-45.
- Shiba T** (1984). Utilization of light energy by the strictly aerobic bacterium *Erythrobacter* sp. OCH 114. *Journal of General and Applied Microbiology* **30**: 239-244.
- Shiklomanov IA** (1998). World water resources. *A New Appraisal and Assessment for the 21st Century*.
- Shimada K** (1995). Aerobic Anoxygenic Phototrophs. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (eds). *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Springer Netherlands. pp 105-122.
- Sieracki ME, Gilg IC, Thier EC, Poulton NJ, Goericke R** (2006). Distribution of planktonic aerobic anoxygenic photoheterotrophic bacteria in the northwest Atlantic. *Limnology and Oceanography* **51**: 38-46.
- Simu K, Hagström Å** (2004). Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 2445-2451.
- Slamovits CH, Okamoto N, Burri L, James ER, Keeling PJ** (2011). A bacterial proteorhodopsin proton pump in marine eukaryotes. *Nature Communications* **2**: 183-189.
- Sowell SM, Wilhelm LJ, Norbeck AD, Lipton MS, Nicora CD, Barofsky DF et al** (2008). Transport functions dominate the SAR11 metaproteome at low-nutrient extremes in the Sargasso Sea. *The ISME journal* **3**: 93-105.
- Spencer-Cervato C, Thierstein HR** (1997). First appearance of *Globorotalia truncatulinoides*: cladogenesis and immigration. *Marine Micropaleontology* **30**: 267-291.
- Springer AM, McRoy CP** (1993). The paradox of pelagic food webs in the northern Bering Sea--III. Patterns of primary production. *Continental Shelf Research* **13**: 575-599.
- Spudich J, Jung K** (2005). Microbial rhodopsins: phylogenetic and functional diversity. In: Briggs WR, Spudich JL (eds). *Handbook of Photosensory Receptors*. Wiley-VCH: Weinheim. pp 1-24.
- Spudich JL, Yang CS, Jung KH, Spudich EN** (2000). Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**: 365-392.
- Stackebrandt E, Goebel B** (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846-849.
- Staley JT, Konopka A** (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Reviews in Microbiology* **39**: 321-346.
- Staley JT, Gosink JJ** (1999). Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* **53**: 189-215.
- Steemann-Nielsen E** (1952). The Use of Radio-active Carbon ¹⁴C for Measuring Organic Production in the Sea. *Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploitation de la Mer* **18**: 117-140.
- Stein R** (2008). Arctic Ocean Sediments: Processes, Proxies, and Paleoenvironment. In: Stein R (ed). *Developments in Marine Geology*. Elsevier. pp 1-592.
- Steindler L, Schwabach MS, Smith DP, Chan F, Giovannoni SJ** (2011). Energy Starved Candidatus *Pelagibacter Ubique* Substitutes Light-Mediated ATP Production for Endogenous Carbon Respiration. *PLoS ONE* **6**: e19725.

- Stingl U, Desiderio RA, Cho JC, Vergin KL, Giovannoni SJ** (2007a). The SAR92 clade: an abundant coastal clade of culturable marine bacteria possessing proteorhodopsin. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 2290-2296.
- Stingl U, Tripp HJ, Giovannoni SJ** (2007b). Improvements of high-throughput culturing yielded novel SAR11 strains and other abundant marine bacteria from the Oregon coast and the Bermuda Atlantic Time Series study site. *The ISME journal* **1**: 361-371.
- Stocker R** (2012). Marine Microbes See a Sea of Gradients. *Science* **338**: 628-633.
- Sullivan MB, Lindell D, Lee JA, Thompson LR, Bielawski JP, Chisholm SW** (2006). Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts. *PLoS Biology* **4**: e234.
- Sundby B, Gobeil C, Silverberg N, Mucci A** (1992). The phosphorus cycle in coastal marine sediments. *Limnology and Oceanography* **37**: 1129-1145.
- Suttle CA** (2005). Viruses in the sea. *Nature* **437**: 356-361.
- Suyama T, Shigematsu T, Takaichi S, Nodasaka Y, Fujikawa S, Hosoya H et al** (1999). *Roseateles depolymerans* gen. nov., sp. nov., a new bacteriochlorophyll *a*-containing obligate aerobe belonging to the β -subclass of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 449-457.
- Suyama T, Shigematsu T, Suzuki T, Tokiwa Y, Kanagawa T, Nagashima KVP et al** (2002). Photosynthetic Apparatus in *Roseateles depolymerans* 61A Is Transcriptionally Induced by Carbon Limitation. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1665-1673.
- Suzuki MT, Giovannoni SJ** (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 625-630.
- Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF** (2000). Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4605-4614.
- Swingley WD, Sadekar S, Mastrian SD, Matthies HJ, Hao J, Ramos H et al** (2007). The complete genome sequence of *Roseobacter denitrificans* reveals a mixotrophic rather than photosynthetic metabolism. *Journal of Bacteriology* **189**: 683-690.
- Takahashi S, Murata N** (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science* **13**: 178-182.
- Takahashi T, Tomioka H, Kamo N, Kobatake Y** (1985). A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium*. *FEMS Microbiology Letters* **28**: 161-164.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S** (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-2739.
- Thingstad TF** (2000). Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnology and Oceanography* **45**: 1320-1328.
- Ting CS, Rocap G, King J, Chisholm SW** (2002). Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. *Trends in Microbiology* **10**: 134-142.
- Tipping MJ, Steel BC, Delalez NJ, Berry RM, Armitage JP** (2012). Quantification of flagellar motor stator dynamics through in vivo proton-motive force control. *Molecular Microbiology*: n/a-n/a.
- Tomasch J, Gohl R, Bunk B, Diez MS, Wagner-Döbler I** (2011). Transcriptional response of the photoheterotrophic marine bacterium *Dinoroseobacter shibae* to changing light regimes. *The ISME journal* **5**: 1957-1968.

- Tremblay J-E, Gratton Y, Fauchot J, Price NM** (2002). Climatic and oceanic forcing of new, net, and diatom production in the North Water. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **49**: 4927-4946.
- Treusch AH, Vergin KL, Finlay LA, Donatz MG, Burton RM, Carlson CA et al** (2009). Seasonality and vertical structure of microbial communities in an ocean gyre. *The ISME journal* **3**: 1148-1163.
- Uphoff H, Felske A, Fehr W, Wagner-Döbler I** (2001). The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: a molecular screening of marine isolates. *FEMS Microbiology Ecology* **35**: 249-258.
- Vallières C, Retamal L, Ramlal P, Osburn CL, Vincent WF** (2008). Bacterial production and microbial food web structure in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *Journal of Marine Systems* **74**: 756-773.
- Van Trappen S, Mergaert J, Swings J** (2004). *Loktanella salsilacus* gen. nov., sp. nov., *Loktanella fryxellensis* sp. nov. and *Loktanella vestfoldensis* sp. nov., new members of the Rhodobacter group, isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1263-1269.
- Vancanneyt M, Schut F, Snauwaert C, Goris J, Swings J, Gottschal JC** (2001). *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 73-79.
- Vasiliev A, Kanevskiy M, Cherkashov G, Vanshtein B** (2005). Coastal dynamics at the Barents and Kara Sea key sites. *Geo-Marine Letters* **25**: 110-120.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA et al** (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.
- Vincent W, Bowman J, Rankin L, McMeekin T** (2000). Phylogenetic diversity of picocyanobacteria in Arctic and Antarctic ecosystems.
- Vincent W** (2002). Cyanobacterial Dominance in the Polar Regions. In: Whitton B, Potts M (eds). *The Ecology of Cyanobacteria*. Springer Netherlands. pp 321-340.
- Wagner-Döbler I, Biebl H** (2006). Environmental biology of the marine Roseobacter lineage. *Annual Review of Microbiology* **60**: 255-280.
- Wagner A, Lohmann G, Prange M** (2011). Arctic river discharge trends since 7 ka BP. *Global and Planetary Change* **79**: 48-60.
- Waidner LA, Kirchman DL** (2005). Aerobic anoxygenic photosynthesis genes and operons in uncultured bacteria in the Delaware River. *Environmental Microbiology* **7**: 1896-1908.
- Waidner LA, Kirchman DL** (2007). Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria attached to particles in turbid waters of the Delaware and Chesapeake estuaries. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3936-3944.
- Waidner LA, Kirchman DL** (2008). Diversity and distribution of ecotypes of the aerobic anoxygenic phototrophy gene, *pufM*, in the Delaware estuary. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 4012-4021.
- Waleron M, Waleron K, Vincent WF, Wilmotte A** (2007). Allochthonous inputs of riverine picocyanobacteria to coastal waters in the Arctic Ocean. *FEMS Microbiology Ecology* **59**: 356-365.
- Walsh JE** (2008). Climate of the Arctic marine environment. *Ecological Applications* **18**: 3-22.
- Wang X, Sahr F, Xue T, Sun B** (2007). *Methylobacterium salsuginis* sp. nov., isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 1699-1703.
- Watanabe E** (2011). Beaufort shelf break eddies and shelf-basin exchange of Pacific summer water in the western Arctic Ocean

- detected by satellite and modeling analyses. *Journal of Geophysical Research* **116**: C08034.
- Waterbury JB, Watson SW, Guillard RRL, Brand LE** (1979). Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature* **277**: 293-294.
- Waterbury JB, Watson SW, Valois FW, Franks DG** (1986). Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. In: Platt T, LI WK (eds). *Photosynthetic picoplankton*. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences. pp 71-120.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ** (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.
- Wells LE, Deming JW** (2003). Abundance of Bacteria, the Cytophaga-Flavobacterium cluster and Archaea in cold oligotrophic waters and nepheloid layers of the Northwest Passage, Canadian Archipelago. *Aquatic Microbial Ecology* **31**: 19-31.
- Welsh DT** (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 263-290.
- Wendell D, Todd J, Montemagno C** (2010). Artificial photosynthesis in ranspumin-2 based foam. *Nano Letters* **10**: 3231-3236.
- West NJ, Obernosterer I, Zemb O, Lebaron P** (2008). Major differences of bacterial diversity and activity inside and outside of a natural iron-fertilized phytoplankton bloom in the Southern Ocean. *Environmental Microbiology* **10**: 738-756.
- Wheeler P, Watkins J, Hansing R** (1997). Nutrients, organic carbon and organic nitrogen in the upper water column of the Arctic Ocean: implications for the sources of dissolved organic carbon. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **44**: 1571-1592.
- Wheeler PA, Gosselin M, Sherr E, Thibault D, Kirchman DL, Benner R et al** (1996). Active cycling of organic carbon in the central Arctic Ocean. *Nature* **380**: 697-699.
- White DC, Sutton SD, Ringelberg DB** (1996). The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Current Opinion in Biotechnology* **7**: 301-306.
- White PL, Wynn-Williams DD, Russell NJ** (2000). Diversity of thermal responses of lipid composition in the membranes of the dominant culturable members of an Antarctic fellfield soil bacterial community. *Antarctic Science* **12**: 386-393.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ** (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 6578-6583.
- Wiley JM, Sherwood LM, Woolverton CJ** (2008a). Biogeochemical Cycling and Introductory Microbial Ecology. In: Wiley JM, Sherwood LM, Woolverton CJ (eds). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*, 7th edn. McGraw-Hill: New York. pp 643-666.
- Wiley JM, Sherwood LM, Woolverton CJ** (2008b). Metabolism: Energy, Enzymes, and Regulation. In: Wiley JM, Sherwood LM, Woolverton CJ (eds). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*, 7th edn. McGraw-Hill: New York. pp 167-190.
- Wilhelm SW, Suttle CA** (1999). Viruses and Nutrient Cycles in the Sea. *Bioscience* **49**: 781-788.
- Williams TJ, Long E, Evans F, DeMaere MZ, Lauro FM, Raftery MJ et al** (2012a). A metaproteomic assessment of winter and summer bacterioplankton from Antarctic Peninsula coastal surface waters. *The ISME journal* **6**: 1883-1900.
- Williams TJ, Wilkins D, Long E, Evans F, DeMaere MZ, Raftery MJ et al** (2012b). The role of planktonic *Flavobacteria* in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environmental Microbiology*.
- Woese CR, Fox GE** (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain:

the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5088-5090.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**: 4576-4579.

Woyke T, Xie G, Copeland A, González JM, Han C, Kiss H et al (2009). Assembling the Marine Metagenome, One Cell at a Time. *PLoS ONE* **4**: e5299.

Yager PL, Connelly TL, Mortazavi B, Wommack KE, Bano N, Bauer JE et al (2001). Dynamic bacterial and viral response to an algal bloom at subzero temperatures. *Limnology and Oceanography* **46**: 790-801.

Yan S, Fuchs BM, Lenk S, Harder J, Wulf J, Jiao N-Z et al (2009). Biogeography and phylogeny of the NOR5/OM60 clade of *Gammaproteobacteria*. *Systematic and Applied Microbiology* **32**: 124-139.

Yooseph S, Sutton G, Rusch DB, Halpern AL, Williamson SJ, Remington K et al (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: expanding the universe of protein families. *PLoS Biology* **5**: e16.

Yooseph S, Nealson KH, Rusch DB, McCrow JP, Dupont CL, Kim M et al (2010). Genomic and functional adaptation in surface ocean planktonic prokaryotes. *Nature* **468**: 60-66.

Yoshizawa S, Kawanabe A, Ito H, Kandori H, Kogure K (2012). Diversity and functional analysis of proteorhodopsin in marine *Flavobacteria*. *Environmental Microbiology* **14**: 1240-1248.

Yurkov V, Stackebrandt E, Holmes A, Fuerst JA, Hugenholtz P, Golecki J et al (1994). Phylogenetic Positions of Novel Aerobic, Bacteriochlorophyll *a*-Containing Bacteria and Description of *Roseococcus thiosulfatophilus* gen. nov., sp. nov., *Erythromicrobium ramosum* gen. nov., sp. nov., and *Erythrobacter litoralis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 427-434.

Yurkov V, Schoepp B, Verméglio A (1998). Photoinduced electron transfer and cytochrome content in obligate aerobic phototrophic bacteria from genera *Erythromicrobium*, *Sandaracinobacter*, *Erythromonas*, *Roseococcus* and *Erythrobacter*. *Photosynthesis Research* **57**: 117-128.

Yurkov V (2006). Aerobic Phototrophic Proteobacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer: New York. pp 562-584.

Yurkov V, Csotonyi JT (2008). New light on aerobic anoxygenic phototrophs. In: Hunter NC, Daldai F, Thurnauer MC, Beatty JT (eds). *The Purple Phototrophic Bacteria*. Springer Netherlands. pp 31-55.

Yurkov VV, van Gernerden H (1993). Impact of light/dark regimen on growth rate, biomass formation and bacteriochlorophyll synthesis in *Erythromicrobium hydrolyticum*. *Archives of Microbiology* **159**: 84-89.

Yurkov VV, Beatty JT (1998). Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 695-724.

Yurkov VV, Krieger S, Stackebrandt E, Beatty JT (1999). *Citromicrobium bathyomarimum*, a novel aerobic bacterium isolated from deep-sea hydrothermal vent plume waters that contains photosynthetic pigment-protein complexes. *Journal of Bacteriology* **181**: 4517-4525.

Yurkov VV, Csotonyi JT (2003). Aerobic anoxygenic phototrophs and heavy metalloid reducers from extreme environments. In: Pandalai SG (ed). *Recent Research Developments in Bacteriology*. Transworld Research Network: Trivandrum. pp 247-300.

Yutin N, Suzuki MT, Beja O (2005). Novel primers reveal wider diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8958-8962.

Yutin N, Suzuki MT, Teeling H, Weber M, Venter JC, Rusch DB et al (2007). Assessing diversity and biogeography of aerobic

- anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling expedition metagenomes. *Environmental Microbiology* **9**: 1464-1475.
- Yutin N, Koonin E** (2012). Proteorhodopsin genes in giant viruses. *Biology Direct* **7**: 34.
- Zaballos M, López L, Bartual SG, D'Auria G, Alba JC et al** (2006). Comparison of prokaryotic diversity at offshore oceanic locations reveals a different microbiota in the Mediterranean Sea. *FEMS Microbiology Ecology* **56**: 389-405.
- Zengler K, Toledo G, Rappé M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM et al** (2002). Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 15681-15686.
- Zhang D-C, Yu Y, Chen B, Wang H-X, Liu H-C, Dong X-Z et al** (2006). *Glaciecola psychrophila* sp. nov., a novel psychrophilic bacterium isolated from the Arctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 2867-2869.
- Zhang J, Spitz YH, Steele M, Ashjian C, Campbell R, Berline L et al** (2010). Modeling the impact of declining sea ice on the Arctic marine planktonic ecosystem. *Journal of Geophysical Research: Oceans (1978–2012)* **115**: C10015.
- Zhao Y, Temperton B, Thrash JC, Schwabach MS, Vergin KL, Landry ZC et al** (2013). Abundant SAR11 viruses in the ocean. *Nature* **494**: 357-360.
- Zheng Q, Zhang R, Koblížek M, Boldareva EN, Yurkov V, Yan S et al** (2011). Diverse Arrangement of Photosynthetic Gene Clusters in Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria. *PLoS ONE* **6**: e25050.
- Zimmermann R, Meyer-Reil L** (1974). A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kiel Meeresforsch* **30**: 24-27.
- Zinger L, Amaral-Zettler LA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Huse SM, Welch DBM et al** (2011). Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS ONE* **6**: e24570.
- Zinger L, Gobet A, Pommier T** (2012). Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. *Molecular Ecology*.
- Zobell CE** (ed) (1946) *Marine-Löpez Alogyreas* A monograph on hydrobacteriology. Chronica Botánica Company: Waltham, USA, 240pp.
- Zotina T, Köster O, Jüttner F** (2003). Photoheterotrophy and light-dependent uptake of organic and organic nitrogenous compounds by *Planktothrix rubescens* under low irradiance. *Freshwater Biology* **48**: 1859-1872.
- Zubkov MV, Fuchs BM, Tarran GA, Burkill PH, Amann R** (2003). High rate of uptake of organic nitrogen compounds by *Prochlorococcus* cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic oceanic waters. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1299-1304.
- Zubkov MV, Tarran GA** (2005). Amino acid uptake of *Prochlorococcus* spp. in surface waters across the South Atlantic Subtropical Front. *Aquatic Microbial Ecology* **40**: 241-249.
- Zuckerandl E, Pauling L** (1962). Molecular disease, evolution and genetic heterogeneity. In: Kasha M, Pullman B (eds). *Horizons in Biochemistry*. Academic Press: New York. pp 189-225.
- Zuckerandl E, Pauling L** (1965a). Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* **8**: 357-366.
- Zuckerandl E, Pauling L** (1965b). Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V, Vogel HV (eds). *Evolving genes and proteins*. Academic Press: New York. pp 97-165.
- Zwart G, Crump BC, Kamst-van Agterveld MP, Hagen F, Han SK** (2002). Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from

plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology* **28**: 141-155.

Zwirgmaier K, Jardillier L, Ostrowski M, Mazard S, Garczarek L, Vaultot D et al (2008). Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a

distinct partitioning of lineages among oceanic biomes. *Environmental Microbiology* **10**: 147-161.

ANNEXES

*Changements climatiques, la place de l'homme*⁶⁸.

L'accélération des changements climatiques observés depuis les cinq dernières décennies est concomitante avec l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre (GES) imputable à l'activité humaine. Un point critique, très discuté depuis plus d'une décennie, est l'implication et la place de l'homme dans ces changements. Selon le groupe d'experts intergouvernementaux sur l'évolution du climat (GIEC), le changement climatique se définit comme une variation de l'état du climat que l'on peut déceler (par exemple au moyen de tests statistiques) par des modifications de la moyenne et/ou de la variabilité de ses propriétés et qui persiste pendant une longue période, généralement pendant des décennies ou plus. Il se rapporte à tous changements du climat dans le temps, qu'il soit dû à la variabilité naturelle ou à l'activité humaine. Cette définition diffère de celle figurant dans la Convention-cadre des Nations Unies sur les changements climatiques (CCNUCC), selon laquelle les changements climatiques désignent des changements qui sont attribués directement ou indirectement à une activité humaine altérant la composition de l'atmosphère mondiale et qui viennent s'ajouter à la variabilité naturelle du climat observée au cours de périodes comparables. Le choix d'une définition, loin d'être trivial, repose sur l'application et le domaine d'étude avec lequel on aborde le réchauffement climatique. Il dépend également de la considération que l'on apporte à la modification profonde des processus générant la variabilité climatique. Séparer les changements climatiques anthropiques à la variabilité naturelle est très complexe et revêt une importance différente dans un cadre décisionnel tentant d'évaluer l'impact de l'homme sur son environnement pour réguler son activité ou dans un cadre d'étude écologique tentant de comprendre comment, sous l'effet des modifications climatiques, se modifie l'environnement et les écosystèmes et quelles en sont les limites pour prédire leur réaction (pouvant notamment influencer sur des ressources utilisables par l'homme). Ainsi la définition du CCNUCC semble adaptée au premier cas alors que celle du GIEC est plus adaptée au second, ce que nous choisirons par la suite, même si les deux points de vue se rejoignent.

⁶⁸ Cette section est un complément d'information de la section 3.2.2

Les émissions mondiales de GES imputables aux activités humaines, notamment les GES à longue durée de vie et rejetés en grande quantité comme le dioxyde de carbone (CO₂, gaz majeur), le méthane (CH₄) et l'oxyde nitreux (NO₂), ont augmenté depuis l'époque préindustrielle. La hausse a été de 70 % pour les GES et 80 % de CO₂ entre 1970 et 2004. Depuis 1750, sous l'effet des activités humaines, les concentrations atmosphériques de CO₂, CH₄ et N₂O se sont fortement accrues et sont aujourd'hui bien supérieures aux valeurs historiques déterminées par l'analyse de carottes de glace portant sur de nombreux millénaires. En 2005, les concentrations atmosphériques de CO₂ (379 particules par millions) et de CH₄ (1 774 particules par milliards) ont largement excédé l'intervalle de variation naturelle des 650 000 dernières années. L'IPCC (2007) estime que la cause première de la hausse de la concentration de CO₂ est l'utilisation de combustibles fossiles, le changement d'affectation des terres y contribue aussi, mais dans une moindre mesure. La concentration atmosphérique mondiale de dioxyde de carbone est passée de 280 ppm environ à l'époque préindustrielle à 379 ppm en 2005. Le rythme d'accroissement annuel de la concentration de CO₂ a été plus rapide au cours des 10 dernières années (1,9 ppm par an en moyenne entre 1995 et 2005) qu'il ne l'a été depuis le début des mesures atmosphériques directes continues (1,4 ppm par an en moyenne entre 1960 et 2005), bien qu'il puisse varier d'une année à l'autre. Il est très probable que l'augmentation observée de la concentration de CH₄ provient surtout de l'agriculture et de l'utilisation de combustibles fossiles ; cette progression s'est toutefois ralentie depuis le début des années 1990, ce qui concorde avec le fait que les émissions totales (anthropiques et d'origine naturelle) ont été quasi constantes durant cette période. Quant à la hausse de la concentration de N₂O, elle est essentiellement due à l'agriculture. L'augmentation de la concentration des GES tend à réchauffer la surface, tandis que l'effet net de la hausse de concentration des aérosols tend à la refroidir par l'augmentation de l'albédo notamment. Les activités humaines menées depuis l'époque préindustrielle se sont soldées par un réchauffement de la planète correspondant à une hausse d'environ 1,6 W/m² (de 0,6 à 2,4). À titre de comparaison, on estime que la variation de l'éclairement énergétique du Soleil a eu un effet de réchauffement d'environ 0,12 W/m² (de 0,06 à 0,3) seulement.

Les oscillations climatiques influençant l'Arctique

La large variabilité du climat arctique peut être en partie expliquée par l'influence de nombreux processus atmosphériques oscillants à l'échelle de l'hémisphère Nord et d'un fort couplage océan-atmosphère. Le climat arctique est fortement lié à la force et à la localisation

des centres de hautes et basses pressions. Effet de la rotation de la Terre, de l'inclinaison de son axe et par l'expression de la force de Coriolis, en hiver les pressions sont faibles dans les régions des Aléoutiennes (Pacifique) et de l'Islande (Atlantique) alors qu'elles sont fortes au dessus de la Sibérie s'étendant alors sur l'Arctique. En été en revanche, les pressions sont fortes dans les régions subtropicales du Pacifique Nord-Est et de l'Atlantique Nord et sont diminuées dans les régions (sub-) polaires. Les pressions étant maximum en été et minimum en hiver aux moyennes latitudes alors qu'elles ont leur maximum à la fin du printemps (et un second plus faible à la fin de l'automne) et minimum en hiver dans les hautes latitudes polaires. Ces gradients de pression conditionnent vents (s'écoulant d'une haute vers une basse pression), précipitations et températures d'une région donnée et la localisation des hautes et basses pressions déterminent (en grande partie) la saisonnalité du climat. La variabilité interannuelle est également liée aux centres de hautes et basses pressions bien que ce soit des phénomènes distincts. L'Arctique est sous l'influence principale d'un phénomène climatique oscillatoire à l'échelle de l'hémisphère Nord, l'oscillation Arctique (AO), se traduisant dans le bassin Atlantique par l'oscillation Nord Atlantique (NAO). Ces phénomènes sont mesurés par des différences de pression atmosphérique entre l'anticyclone des Açores et la dépression d'Islande pour la NAO et dépressions et anticyclones entre l'Arctique et les moyennes latitudes (latitudes comprises entre 37° et 45° Nord) pour l'OA (Figure S1). Ces oscillations présentent deux phases très marquées : avec une pression atmosphérique plus élevée que la normale en Arctique et en contrebalance une pression plus faible dans les latitudes moyennes (index NAO ou AO négatif), le Jet Stream (vents d'Ouest) s'affaiblit et l'air froid arctique descend sur les plus basses latitudes, et génère une « phase froide » dans l'Eurasie du Nord et l'Amérique du Nord (climat sec et froid en Europe). A l'inverse, quand les pressions arctiques s'affaiblissent et les pressions des moyennes latitudes se renforcent (index NAO ou AO positif), le Jet Stream Polaire se renforce et cantonne l'air froid à l'Arctique, induisant une « phase chaude » (climat doux et pluvieux en Europe).

Si ces changements de pression influent sur les courants de vent, ils influent également sur les courants marins. En particulier, sur la force du *Gulf Stream*, courant marin chaud généré par la différence d'altitude (phénomène thermohalin) entre le golfe du Mexique et l'Atlantique Nord Est, et son relais, la dérive Nord Atlantique, entretenue par la force de Coriolis et les vents d'Ouest, se séparant en 2 branches dont le courant norvégien (et du Spitzberg, Figure 31). La quantité d'eau relativement chaude parvenant en Arctique va être en grande partie dépendante de la force des vents et de la différence de pression. En phase

chaude de AO/NAO, les courants Atlantiques, enrichis en chaleur et salinité par l'augmentation de l'influence des eaux subtropicales, s'accroissent et s'infiltrent plus dans les eaux intermédiaires arctiques (Häkkinen et Rhines 2009, Häkkinen *et al.* 2011). Deux phénomènes climatiques à l'échelle de plusieurs décennies peuvent également influencer sur la température des eaux Arctiques (et donc aussi sur son climat), l'oscillation décennale Pacifique (PDO, cycle de 20 à 30 ans) et l'oscillation Atlantique Multi-décennale (AMO, cycle de 40 à 80 ans). Ce sont des phénomènes liés au déplacement de masses d'eau de surface chaudes du Pacifique Nord et de l'Atlantique Nord. Les causes physiques de ces derniers restent encore mal comprises mais elles sont probablement en lien avec la circulation thermohaline dans l'Atlantique et connectées avec le phénomène El Niño/ La Niña (ENSO) dans le Pacifique. Elles seraient pourtant toutes deux liées, en mode chaud, à l'intrusion de masses d'eau plus chaudes dans l'océan arctique *via* les détroits de Fram et Béring.

La complexité des connexions et des processus climatiques en jeu dans l'Arctique et son océan rendent difficile la détermination de la part anthropique dans le réchauffement en cours. Toutefois, seuls les modèles basés sur l'état actuel des connaissances des variations climatiques influant sur l'Arctique et qui tiennent compte des forçages anthropiques parviennent à simuler les configurations du réchauffement observées alors qu'aucun modèle couplé du climat mondial ne tenant compte que des seuls forçages naturels n'a reproduit les tendances moyennes au réchauffement propres aux différents continents (à l'exception de l'Antarctique) pour la seconde moitié du XX^{ème} siècle. Compte-tenu également de la forte amplitude des réponses au réchauffement enregistrées en Arctique, il est extrêmement improbable que les changements climatiques observés les 50 dernières années puissent s'expliquer sans forçages externes, et ne soient dus qu'uniquement à des causes naturelles connues. Le forçage anthropique joue probablement un rôle important dans cette partie du globe.

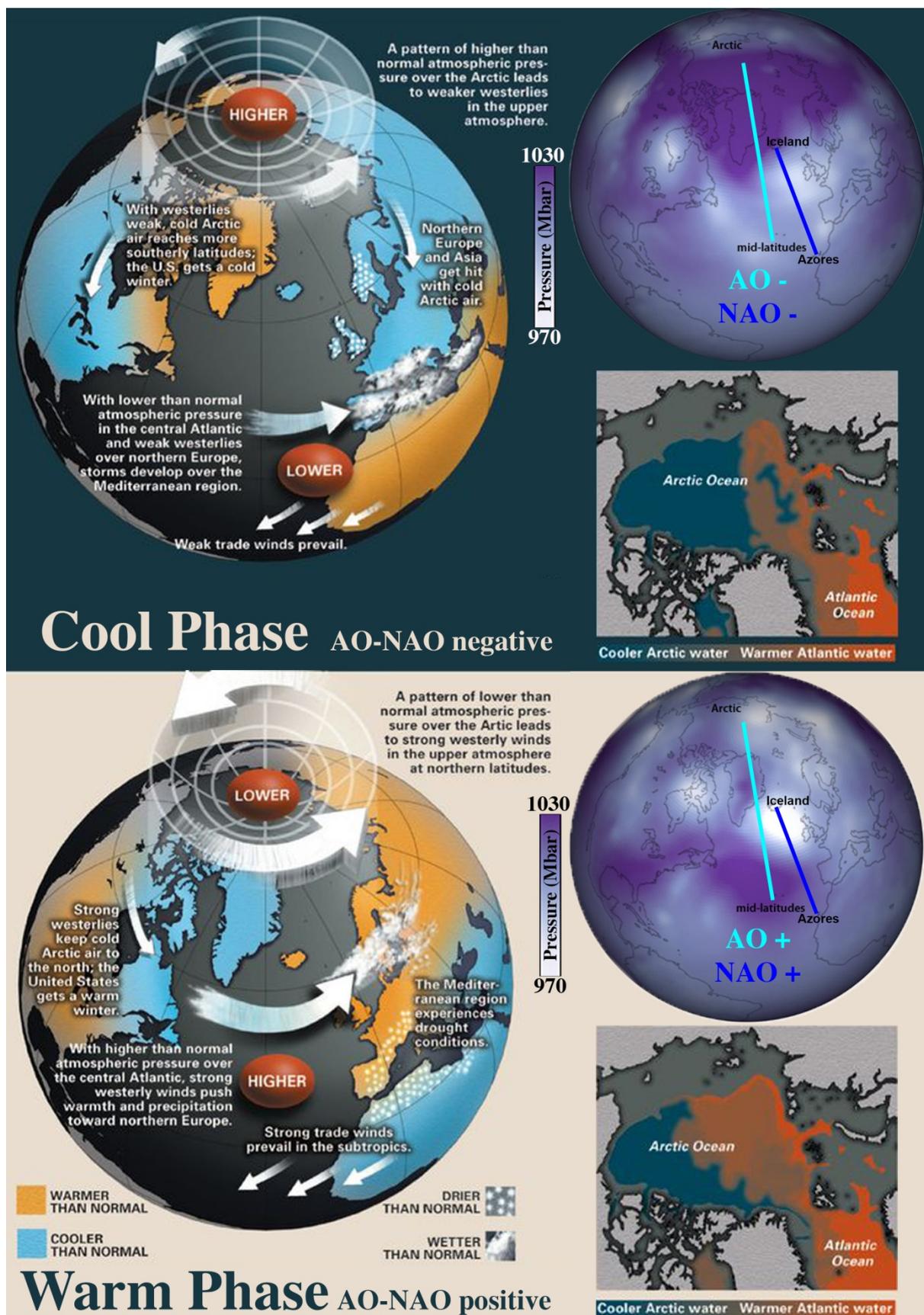


Figure S1. Phases froide et chaude des oscillations Arctique (AO) et Nord-Atlantique (NAO), impact sur le climat et sur l'intrusion d'eaux chaudes dans l'océan arctique. D'après les représentations artistiques issus du *National Geographic Magazine* (mars 2000) et *Climate Watch Magazine NOAA* (mars 2011).

Impacts des variabilités et du réchauffement climatiques en Arctique

Les oscillations Arctique et Nord Atlantique ont un fort impact sur la cryosphère notamment sur la vitesse de dérive ainsi que l'épaisseur et le volume de glace de mer. En phase négative de AO/NAO (phase froide), les vents et le jeu de pression renforcent le gyre de Beaufort et déplace la dérive transpolaire dans le bassin eurasien (Figure 37, gauche), la glace de mer de l'océan arctique ouest (mer de Beaufort) a tendance à être transportée vers les mers de Laptev et Kara *via* la mer des Tchouktches et la glace des mer de Laptev est directement transportée vers le détroit de Fram et la mer de Barents. En conditions de AO/NAO positive (Figure 37, droite), le gyre de Beaufort se réduit et se concentre en mer de Beaufort, il en résulte un renforcement de la dérive transpolaire (TPD) et la glace est transportée plus rapidement vers la mer du Groënland conduisant à une plus grande production de nouvelle glace côtière dans les mers sibériennes, en revanche moins de glace de l'océan arctique ouest est transportée vers l'est. Dans l'archipel canadien et le Groënland Nord-Ouest (régions concentrant le plus de glaces pérennes), une partie de la glace convoyée par la TPD s'accumule mais surtout moins de glaces âgées est arrachée par le gyre de Beaufort. La glace piégée dans le gyre de Beaufort est généralement bloquée en Arctique pour 5 à 10 ans ce qui implique que les glaces présentes en mers de Beaufort et des Tchouktches sont généralement âgées. Au contraire, les glaces des mers de Laptev et de Kara sont en général renouvelées d'une année à l'autre. Il est estimé que la mer de Laptev exporte le plus de glace vers le détroit de Fram avec $670 \text{ km}^3/\text{a}$ (23,5 %) suivie de la mer de Kara avec $240 \text{ km}^3/\text{a}$ (8,4 %) alors que la mer des Tchouktches ne fournit que $10 \text{ km}^3/\text{a}$ (0,4 %). Au total, $2\,850 \text{ km}^3/\text{a}$ de glaces sont exportés par le détroit Fram. Ainsi selon la mer considérée mais surtout selon les pressions atmosphériques (phase de AO/NAO), la glace ne présentera pas les mêmes caractéristiques, ce qui conditionnera en partie la longueur des périodes libres de glace (y compris leur étendue) et de production phytoplanctonique ainsi que la quantité d'eaux douces relâchées dans le milieu. La chaleur latente tant atmosphérique qu'apportée par les courants entrants en Arctique va également influencer sur ces paramètres faisant de la cryosphère, une composante très sensible au réchauffement (voir § 3.2.1).

Les oscillations climatiques jouent également un rôle important dans les précipitations et les débits des fleuves arctiques. Les changements dans les vents et les températures induits par

l'AO/NAO modifient le ratio précipitation/évaporation tant dans la quantité que dans la saisonnalité (Serreze *et al.* 2000). Dans le Canada Nord par exemple, les précipitations ont été augmentées de près de 40 % durant les dernières 4 décennies. Quand l'indice AO/NAO est fortement positif, le climat des bassins versants est plus doux et plus pluvieux que la moyenne (Figure S1) et la quantité d'eau déversée par les fleuves arctiques est augmentée avec un décalage de 6 à 8 mois. A l'inverse, en conditions fortement négatives de AO/NAO, les bassins versants sont plus froids et plus secs que la normale et le débit des fleuves est diminué (Figure 38, haut). Peterson *et al.* (2002) ont montré que les anomalies⁶⁹ de déversements des fleuves arctiques étaient fortement corrélées avec les oscillations climatiques et les températures atmosphériques de surface (Figure 38, milieu). Même si les tendances à relative courte échelle de temps montrent une forte corrélation avec les variations naturelles, en retraçant et modélisant les tendances de déversement à plus grande échelle, Wagner *et al.* (2011) ont montrés que depuis l'ère industrielle, le déversement (résultat de la précipitation à laquelle est retranchée l'évaporation) de tous les fleuves arctiques majeurs a été augmenté avec une rapidité sans précédent depuis 700 ans (Figure 38, bas). McClelland *et al.* (2006) estiment qu'entre 1964 et 2000, le déversement d'eaux douces dans l'océan arctique avait augmenté d'environ 5,6 km³/a/a. Cet apport supplémentaire en eaux douces, généralement chaudes en comparaison de l'océan dans lequel elles arrivent, augmentera probablement le caractère saumâtre de l'océan arctique et pourrait avoir, outre le fort impact sur les écosystèmes marins, des incidences non seulement sur l'hydrographie de ce dernier par la formation d'une plus forte et plus profonde halocline limitant les échanges avec la surface mais aussi sur l'hydrographie mondiale par la limitation de la formation d'eau profonde. Rahmstorf (2002) estime qu'un déversement d'eaux douces arctiques dans l'Atlantique de 0,06 à 0,15 Sv pourrait interrompre la formation d'eaux profondes et stopper la circulation thermohaline mondiale (*Global conveyor belt*), agent de régulation du climat à l'échelle du globe.

L'augmentation de la pluviométrie n'aura probablement pas qu'une incidence sur la quantité d'eaux douces transportée par les fleuves jusqu'en Arctique, en addition d'une température ambiante augmentée et de la fonte plus profonde de la couche superficielle du pergélisol qui en résulte, un plus grand lessivage des sols et une plus grande érosion des côtes

⁶⁹ Anomalie : variation dont la moyenne se maintient sur le long terme

augmenteraient en conséquence la quantité de carbone (organique et minéral) et de particules déversées dans l'océan arctique. Les eaux douces pourraient passer d'un système dominé par les eaux de surface, pauvres en minéraux, à un système dominé par les eaux souterraines, riches en ions tels que le phosphate, l'azote minéral (ammonium, nitrate) ou le silicate (Frey et McClelland 2009). De plus, un réchauffement du pergélisol pourrait provoquer la libération brutale de grandes quantités de gaz à effet de serre qu'il séquestre sous forme notamment de carbohydrates (voir § 3.1.3). Cette émanation massive principalement de CO₂ et de CH₄ pourrait, en rétroaction positive, amplifier le réchauffement local et global (Stein 2008). Les changements dans les régimes de glace, de matière carbonée et nutriments, de température, de salinité et d'illumination induites par le réchauffement sont suspectés d'avoir de forts impacts sur les écosystèmes marins et principalement sur les compartiments de base comme le bactérioplancton.

La vie bactérienne dans le froid

Le froid permanent exerce de fortes contraintes notamment thermodynamiques, sur les organismes et leur fonctionnement. En particulier le froid, outre la diminution de l'eau liquide disponible qu'il induit, joue sur la stabilité accrue et la flexibilité réduite des macromolécules telles que les glycolipides de la membrane, les acides nucléiques et les enzymes (Bakermans 2012). En effet, la chaleur est une énergie cruciale (enthalpie) pour le mouvement (que ce soit la vibration, la rotation ou la translation) des molécules comme des atomes, ce qui l'implique dans de nombreux processus cellulaires comme la conformation des enzymes et de leurs substrats (rendant une réaction chimique possible ou non), la diffusion ^{et/ou} le transport de solutés au travers de la membrane (réduction des changements de conformation pouvant entraîner des carences ; Pomeroy et Wiebe (2001)). Quand 50 à 90 % des lipides membranaires sont rigidifiés, la cellule peut cesser de fonctionner (Melchior *et al.* 1982). La solidification de l'eau diminue également la quantité d'eau liquide, solvant essentiel de nombreuses réactions enzymatiques. De plus, l'augmentation de la stabilité des structures secondaires de l'ADN et de l'ARN peut réduire voire inhiber la réplication, la transcription ^{et/ou} la traduction. Toutefois, la concentration en sel dans l'eau peut abaisser le point de glaciation de l'eau, permettant à l'eau de mer de ne geler qu'à -1,9°C (avec 3,5 % de sel dissout soit une salinité de 35) et à une eau saturée en sel (35 %) de ne geler qu'à -21°C. Ceci rend notamment possible la persistance de vie bactérienne en milieu terrestre dans des conditions drastiques de température (dans les -30°C).

Les bactéries vivant dans les milieux froids, appelées psychrophiles ou psychrotolérantes selon la température optimale de leur croissance, ont développée de multiples stratégies en réponse à ces contraintes, à l'échelle de la molécule jusqu'à celle de l'écosystème. L'adaptation, c.-à-d. les processus de changements génétiques qui s'accumulent au cours des générations en réponse aux spécificités de la niche écologique, se différencie toutefois de l'acclimatation qui est un ajustement physiologique à court terme en réponse à des changements transitoires de l'environnement (Morgan-Kiss *et al.* 2006). Pour limiter la formation de glace, de nombreux solutés compatibles comme la glycine bêtaïne, le glycérol, le tréhalose, le sucrose, la proline et le DMSP, peuvent être synthétisés. Ces composés ont différents rôles et sont impliqués dans les réponses à de nombreux stress autre que la température, ils peuvent empêcher la formation de cristaux de glace et palier au manque d'eau par différentes stratégies : en empêchant la nucléation, en se liant aux cristaux de glace, en abaissant la température de cristallisation de l'eau à l'intérieur de la cellule ou en limitant les liaisons entre protéines et glace (Welsh 2000). Pour la rigidité et la stabilité des macromolécules, les réponses sont multiples et interviennent à de multiples niveaux. Pour maintenir la fluidité de la membrane, les psychrophiles et psychrotolérants utilisent un mélange de la composition en acides gras principalement en augmentant la quantité d'acides gras polyinsaturés mais également en acides gras avec des chaînes courtes, branchées ou cycliques augmentant le désordre (viscosité) de la membrane (White *et al.* 2000).

Au niveau de la structure des protéines en général, une réponse générique est une augmentation du désordre protéique interne (c.-à-d. une proportion accrue de peptides non organisée en hélice alpha ou en feuillet beta) permettant une plus grande flexibilité. Les enzymes présentent également des adaptations de leur cinétique, leur permettant de fonctionner à basse température. En effet, elles présentent une plus grande plasticité du site actif ayant pour conséquence une augmentation du désordre de l'état fondamental enzyme-substrat (interaction plus faible) menant à une affinité et une stabilité plus faibles (plus fort K_m) mais également à une activité accrue (k_{cat} ou *turnover*, souvent augmenté par l'abaissement de l'énergie de réaction ΔG°). En compensation d'une affinité réduite, il semble que sont augmentées par de plus fortes expressions de gènes, les protéines permettant l'incorporation et le transport des substrats ainsi que les protéines chaperonnes, assurant la bonne conformation des enzymes (Bakermans 2012). Les chaperonnes sont également des composantes importantes de la réponse à l'augmentation de la stabilité des acides nucléiques induite par le froid. En effet, des chaperonnes et des hélicases spécialisées sont surexprimées

à basses températures permettent de déstabiliser les structures secondaires des acides nucléiques (la chaperonne CspA par exemple) ou d'éviter la dimérisation des ARNm et ARNr assurant une bonne traduction (l'hélicase DEAD-box par exemple). L'augmentation de l'abondance des facteurs d'élongation est également une réponse aux basses températures compensant l'activité et la spécificité réduite des enzymes processants l'ADN. Napolitano *et al.* (2005) ont montré que le niveau d'ATP contenu dans les psychrophiles est plus élevé que dans les méso- et thermophiles. Ces auteurs avancent que cela pourrait constituer une stratégie compensatoire pour maintenir les processus biochimiques à basse température (déplacement thermodynamique des réactions) qui reposerait sur une adaptation des protéines clés dans le métabolisme des adénylates comme l'ATP synthase ou l'AMP phosphatase/désaminase permettant une plus grande production d'ATP que de consommation.

Principalement dus aux contraintes thermodynamiques, les acides nucléiques sont également très affectés par la température et présentent des adaptations, comparables à celles des protéines. Si chez les thermophiles (vivants entre 40°C et 85°C) le pourcentage de Guanine et de Cytosine dans l'ADN (présentant 3 ponts hydrogènes contre 2 pour A et T) est augmenté pour stabiliser le duplex d'ADN, chez les psychrophiles en revanche, le pourcentage de GC ne semble ni plus faible ni corrélé avec la température optimale de croissance (Bakermans 2012). Cependant ce fait reste encore controversé et les mécanismes d'adaptation à la stabilité accrue des acides nucléiques chez les psychrophiles encore mal compris. En particulier, des exceptions semblent exister chez les mésophiles psychrotolérants présentant un abaissement du pourcentage de GC corrélé avec la température, dans les séquences de l'ARNr 16S des *Synechococcus* marins du clade I et IV (Khachane *et al.* 2005), ces tendances restant à être confirmées à plus grandes échelles génomiques. Comment la température contrôle la croissance bactérienne est une question très controversée et fait l'objet d'études conflictuelles. Basé sur une production bactérienne faible ainsi qu'un faible ratio production bactérienne/production primaire enregistrés dans les eaux froides, Pomeroy et Deibel (1986) ont proposé que la croissance bactérienne était très faible dans les zones polaires, hypothèse contestée notamment dans les eaux en permanence froides par de multiples études comme par exemple Wheeler *et al.* (1996) et Yager *et al.* (2001). Kirchman *et al.* (2009) ont également trouvé une production bactérienne significativement plus faible dans les océans polaires (Mers arctiques des Tchouktches / de Beaufort et mer antarctique de Ross) qu'à plus basses latitudes. Cependant ils trouvent également de fortes valeurs ponctuelles dans les environnements froids en permanence suggérant que d'autres facteurs que la

température jouent sur la production bactérienne notamment une variation dans les flux de la boucle microbienne (voir § 1.4.3) visualisable par le ratio production bactérienne/production primaire. Même si ce dernier est faible, il augmente très fortement avec la température entre -1,8°C et 4°C, au dessus l'augmentation est plus faible. Ces résultats ont été interprétés comme une très forte utilisation par les bactéries hétérotrophes du carbone organique issu de la production primaire insensible à la baisse de la température excepté en dessous de 4°C (température critique). Les auteurs avancent que les faibles abondances bactériennes en Arctique sont principalement liées à l'apport en MOD et en plus faible mesure à la température qui limite les taux de croissance.

IMPORTANCE ÉCOLOGIQUE des BACTÉRIES PHOTOHÉTÉROTROPHES dans l'Océan ARCTIQUE

Résumé

La photohétérotrophie est la capacité d'utiliser des substrats organiques et de capturer l'énergie lumineuse. Elle est pratiquée par les bactéries phototrophes anoxygéniques aérobies (BPAA), les bactéries contenant de la protéorhodopsine (BPR) et les picocyanobactéries (*Synechococcus*). Les augmentations de l'export fluvial de carbone organique et de l'exposition de l'océan aux radiations solaires s'intensifient en Arctique, rendant cette région intéressante pour étudier la place des photohétérotrophes dans l'utilisation du carbone et de la lumière. Par l'utilisation de multiples approches de quantification absolue, de diversité culturelle et moléculaire, notre étude est la première à caractériser à haute résolution les photohétérotrophes dans l'Océan Arctique. Les picocyanobactéries n'ont été détectées que dans l'estuaire du Mackenzie alors que BPAA et B-PR étaient présentes en mer de Beaufort. La communauté PAA était liée aux apports fluviaux contrairement à celle des B-PR principalement oligotrophe. Les distributions de ces communautés présentaient des patrons différents de celles du bactérioplancton suggérant un avantage écologique de la photohétérotrophie dans ces eaux. La communauté PAA était dominée par un clade nouveau de *Betaproteobacteria* et par les *Rhodobacterales*. Les *Alphaproteobacteria*, notamment des SAR11 et des clades endémiques de SAR116, dominaient la communauté de BPR. La majorité des BPR exprimait activement la PR suggérant de potentiels bénéfices. L'ensemble de nos résultats montre que la photohétérotrophie est répandue dans l'Océan Arctique et suggère que son rôle pourrait être différent en fonction des conditions environnementales rencontrées.

photohétérotrophie ; bactéries phototrophes anoxygéniques aérobies ; bactérie à protéorhodopsine ; écologie microbienne ; Océan Arctique ; fleuve Mackenzie

Abstract

The photoheterotrophy is the capacity to use both organic substrates and light energy. The aerobic anoxygenic phototrophic bacteria (AAPB), the proteorhodopsin-containing bacteria (PRB) and the picocyanobacteria (*Prochlorococcus*) practice it. Increases in organic carbon exported by rivers and in exposure of sea surface to solar radiations are intensifying in Arctic. Hence, this study area is particularly interesting to understand the role of these bacteria in carbon and light uses. Using multiple approaches in absolute quantification, cultural and molecular diversities, our study is the first to characterize at high resolution scale the photoheterotrophs in the Arctic Ocean. Picocyanobacteria were only detectable in the Mackenzie estuary whereas AAPB and PRB were present throughout the Beaufort Sea. AAPBs were strongly linked with river inputs contrasting to PRB, principally oligotrophs. Both distributions of AAPB and PRB exhibited different patterns of those of bacterioplankton suggesting an ecological advantage of the photoheterotrophy in these waters. The AAPB community was dominated by a new *Betaproteobacterial* clade and *Rhodobacterales*. *Alphaproteobacteria*, especially the SAR11 group and SAR116 endemic clades, dominated the PR community. The majority of PRB groups actively expressed the PR suggesting probable benefits. Together, our data highlight the photoheterotrophy is common in Arctic Ocean and suggest that his role could be different depending on the environmental conditions encountered.

photoheterotrophy ; aerobic anoxygenic phototrophic bacteria ; proteorhodopsin-containing bacteria ; microbial ecology ; Arctic Ocean ; Mackenzie River