



HAL
open science

Structure et diversité des communautés de picoeucaryotes en milieu marin

Fabrice Not

► **To cite this version:**

Fabrice Not. Structure et diversité des communautés de picoeucaryotes en milieu marin. Biodiversité et Ecologie. Paris 6, 2004. Français. NNT : . tel-01111001

HAL Id: tel-01111001

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01111001v1>

Submitted on 29 Jan 2015

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.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

Université Paris VI – Pierre & Marie Curie

Ecole doctorale des sciences de l'environnement d'Ile de France

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Pierre et Marie Curie.
Spécialité: **Océanologie biologique et environnement marin.**

Présentée par
Fabrice NOT

<p>STRUCTURE ET DIVERSITE DES COMMUNAUTES DE PICOEUCARYOTES EN MILIEU MARIN</p>

Thèse dirigée par le Dr D. Vaultot et co-dirigée par le Dr N. Simon
Soutenue le 28 mai 2004 devant le jury composé de :

Prof. Chantal Billard, Université de Caen	Rapporteur
Dr Yves Dandonneau, IRD – LODYC - Paris	Rapporteur
Prof. Philippe Lebaron, UPMC – Laboratoire Arago - Banyuls/mer	Examineur
Dr Ramon Massana, CMIMA - Institut de Ciències del Mar - Barcelone	Examineur
Dr Bruno de Reviers, MNHN - Paris	Examineur
Dr Nathalie Simon, UPMC – Station Biologique de Roscoff	Examineur
Dr Daniel Vaultot, CNRS – Station Biologique de Roscoff	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier Nathalie et Daniel qui ont su guider mes premiers pas dans la recherche, et mes premiers mots vers l'ensemble de la communauté scientifique. Je tiens à souligner ici la justesse et la pertinence de leurs conseils, et leur dire combien je suis ravi d'avoir été élevé dans une telle philosophie scientifique.

Ma gratitude va également vers les membres de cette petite famille que forme l'équipe plancton océanique. Aussi bien les membres actuels (Flo, Laure, Laurence, Fred, Domi, Alexis, Tof, Fran, Fabienne, Julia, Agnés, Ludo, Manon), que passés (Isa B., Isa M., Khadidja, Delphine, Céline, Pierre, Bastien, Antoine, Zhu, Stéphanie, Sam). Tous à leur manière font de cette famille un cadre idéal pour une croissance saine et équilibrée.

Je tiens également à remercier Wenche, Ramon, Mikel, Carlos, Klaus, Nick, Dave, Colomban, Alex, Jean, David. Tous amis de la famille, et qui ont participé activement à mon éducation.

Merci également à mes copains d'école (ils se reconnaîtront j'en suis certain). Ils ont fait de ce passage à Roscoff un moment extrêmement agréable, ponctué d'activités sportives diverses et variées (belote, surf, muscu, dîners arrosés et autre wizz party...). Qu'ils sachent que même si les chemins de la vie sont parfois sinueux, on n'oublie jamais ses copains d'enfance.

Je voudrais également profiter de cette occasion pour remercier sincèrement TOUT le personnel de la station. Des différents services techniques (informatique, mer, documentation, entretien, restauration, etc.....) aux chercheurs et ingénieurs.

Je voudrais enfin remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et par là même témoigner de mon accession à la "majorité scientifique".

Mille mercis à ma famille (dans la vraie vie cette fois) à qui l'on a trop peu souvent l'occasion d'exprimer toute sa reconnaissance et son admiration. Du fond du cœur, qu'il en soit ainsi par ces quelques mots. Un grand merci à mes amis (Parisiens, Gaillacois, Roscovites et ex-Roscovites).

Manue, merci pour tout.

SOMMAIRE

Chapitre I : Introduction

I-1 La diversité des organismes marins.....	p. 1
I-2 Le picoplancton dans les océans.....	p. 2
I-2-A Définition et histoire.....	p. 2
I-2-B Importance écologique du picoplancton.....	p. 3
I-2-C La diversité du picoplancton eucaryote	p. 4
I-2-D Approches méthodologiques pour l'étude de la structure des communautés de picoeucaryotes	p. 6
I-3 La classe des Prasinophyceae	p. 9
I-3-A Définition et systématique.....	p. 9
I-3-B L'ordre des Mamiellales	p. 11
I-4 Les autres taxons picoplanctoniques étudiés	p. 12
I-4-A Les Haptophyta.....	p. 12
I-4-A Les Pelagophyceae et Bolidophyceae (Ochrophyta).....	p. 13
I-5 Les régions océaniques étudiées.....	p. 13
I-5-A Le milieu côtier tempéré (Roscoff)	p. 13
I-5-B Les mers Arctiques du nord de l'Europe.....	p. 14
I-5-C L'océan Indien sub-équatorial.....	p. 14
I-6 Objectifs et approche du travail.....	p. 16

Chapitre II : Application de l'hybridation *in situ* fluorescente couplée avec l'amplification du signal par la tyramide (FISH-TSA) à l'étude de la diversité du picoplancton eucaryote

II-1 Résumé en français.....	p. 17
II-2 Article.....	p. 18

Chapitre III : *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), domine le picoplancton eucaryote en Manche occidentale

III-1 Résumé en français	p. 29
III-2 Article	p. 30

Chapitre IV : Composition du picoplancton dans l'océan Arctique

IV-1 Résumé en français	p. 43
IV-2 Article	p. 44

Chapitre V : Les communautés de picoeucaryotes de l'océan Indien sub-équatorial

V-1 Introduction	p. 57
V-2 Matériel et méthodes	p. 58
V-3 Résultats	p. 59
V-4 Discussion	p. 62

Chapitre VI : Conclusions et perspectives

VI-1 Considérations méthodologiques	p. 65
VI-1-A Limites	p. 65
VI-1-B Perspectives d'automatisation de la méthode	p. 66
VI-1-C Développements méthodologiques récents pour l'analyse de la diversité à grande échelle.....	p. 67
VI-2 Perspectives écologiques	p. 67
VI-2-A Les picoeucaryotes photosynthétiques sont plus nombreux mais moins divers que les hétérotrophes	p. 68
VI-2-B <i>Micromonas pusilla</i> , une espèce clé du picoplancton eucaryote	p. 69
VI-2-C Le microphytoplancton est brun et le picophytoplancton est vert	p. 70
VI-2-D Voies d'accès à la morphologie d'espèces non cultivables	p. 70
VI-3 Conclusions générales	p. 72

Bibliographie.....	p. 73
---------------------------	--------------

- Annexe I Biegala, I. C., **F. Not**, D. Vaultot, and N. Simon (2003) Quantitative assessment of picoeukaryotes in the natural environment using taxon specific oligonucleotide probes in association with TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification - Fluorescent *In Situ* Hybridization) and flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:5519-5529.
- Annexe II Vaultot, D., K. Romari, and **F. Not** (2002) Are autotrophes less diverse than heterotrophs in marine picoplankton? *Trends in Microbiology*. 10:266-267.
- Annexe III Valentin K., **F. Not**, K. Romari, R. Massana, D. Vaultot and L. Medlin. New algal group comes to light. Soumis à *Nature*.
- Annexe IV Houdan, A., C. Billard, D. Marie, **F. Not**, A. G. Saez, J. R. Young, and I. Probert (2004) Flow cytometric analysis of relative ploidy levels in holococcolithophore-heterococcolithophore (Haptophyta) life cycles. Sous presse dans *Systematics and Biodiversity*
- Annexe V Valentin K., K. Romari and **F. Not** (2001) Uncovering picoplankton biodiversity by sequencing of environmental rRNA genes. *QIAGEN NEWS* Issue N°5: 16-17.
- Annexe VI Liste des publications de l'auteur

ABBREVIATIONS

ADN	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
ADNr 18S	<u>A</u> DN codant pour la sous-unité <u>18S</u> de l'ARN <u>r</u> ibosomal
ARN	<u>A</u> cide <u>r</u> ibonucléique
ARNr 18S	Sous-unité <u>18S</u> de l' <u>A</u> RN <u>r</u> ibosomal
CCMP	<u>C</u> ulture <u>c</u> ollection of <u>m</u> arine <u>p</u> hytoplankton (Bigelow, U.S.A.)
Chl <i>a</i>	<u>C</u> hlorophylle <u>a</u>
Chl <i>b</i>	<u>C</u> hlorophylle <u>b</u>
CTD	Appareil d'enregistrement <i>in situ</i> de la conductivité, température et profondeur (<u>C</u> onductivity <u>T</u> emperature <u>D</u> epth)
DAPI	4',6- <u>d</u> iamidino-2-phenyl <u>i</u> ndole
DCM	Maximum profond de chlorophylle (<u>D</u> eep <u>C</u> hlorophyll <u>M</u> aximum)
DGGE	Gradient dénaturant sur gel d'électrophorèse (<u>D</u> enaturing <u>G</u> radient <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
EDTA	Acide <u>t</u> étra- <u>a</u> cétique <u>d</u> iamino <u>e</u> thylène
EtOH	<u>E</u> thanol
FISH	Hybridation <i>in situ</i> fluorescente (<u>F</u> luorescent <u>I</u> n <u>S</u> itu <u>H</u> ybridization)
FITC	<u>F</u> luorescéine <u>i</u> sothiocyanate
HRP	<u>H</u> orse <u>R</u> adish <u>P</u> eroxidase
HPLC	Chromatographie liquide haute performance (<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
ITSr	Séquence transcrite entre les gènes d'ADNr (<u>I</u> nternal <u>T</u> ranscribed <u>S</u> pacer)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PFA	<u>P</u> ara <u>f</u> ormal <u>d</u> éhyde
rbcl	Grande sous-unité de l'enzyme Ribulose 1,5 Bis-phosphate carboxylase oxygénase (<u>L</u> arge sub-unit of <u>R</u> ibulose 1,5 <u>B</u> is-phosphate <u>c</u> arboxylase)
RCC	Collection de culture de Roscoff (<u>R</u> oscoff <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection)
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
SSU	Petite sous unité du ribosome (<u>S</u> mall <u>S</u> ub- <u>U</u> nit)
TNT	Tampon <u>T</u> ris, <u>N</u> aCl, <u>T</u> ween
TSA	Amplification du signal par l'enzyme tyramide (<u>T</u> yramide <u>S</u> ignal <u>A</u> mplification)
UV	<u>U</u> ltra <u>V</u> iolet
w:v	Rapport poid/volume (<u>W</u> eight/ <u>V</u> olume)
19'hex	<u>19</u> ' <u>h</u> exanoyloxyfucoxanthin

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure I-1: Classes de taille des différents compartiments trophiques du plancton	p. 2
Figure I-2: Exemple d'organismes picoeucaryotiques observés en microscopie	p. 3
Figure I-3: Méthodes d'étude de la diversité du picoplancton en milieu naturel	p. 5
Figure I-4: Diversité des séquences de picoeucaryotes observée dans différentes masses d'eau	p. 6
Figure I-5: Arbre phylogénétique consensus des eucaryotes	p. 7
Figure I-6: Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence avec des sondes mono-marquées	p. 8
Figure I-7: Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence couplée au système TSA d'amplification du signal	p. 9
Figure I-8: Arbre phylogénétique de la classe des Prasinophyceae	p. 10
Figure I-9: Trois souches de <i>Micromonas pusilla</i> observées en microscopie électronique	p. 11
Figure I-10: Variation saisonnière de la diversité des séquences de picoeucaryotes à Roscoff	p. 14
Figure III-1: Arbre phylogénétique de la classe des Prasinophyceae et sondes spécifiques de clades	p. 35
Figure III-2: Variation saisonnière des paramètres hydrologiques à la station ASTAN (au large de Roscoff)	p. 38
Figure III-3: Variations des concentrations des pigments marqueurs à la station ASTAN au cours d'un cycle saisonnier	p. 39
Figure III-4: Taxons détectés par TSA-FISH au cours d'un cycle saisonnier à la station ASTAN	p. 40
Figure IV-1: Stations de prélèvement et circulation de surface dans l'océan Arctique (entre les mers de Norvège et de Barents)	p. 47
Figure IV-2: Variations des paramètres hydrologiques, densités de <i>Synechococcus</i> et concentrations de chlorophylle <i>a</i> le long de transects en Arctique	p. 50
Figure IV-3: Distribution de la chlorophylle <i>a</i> attribuée à divers groupes pigmentaires en Arctique	p. 51
Figure IV-4: Répartition des densités de picoeucaryotes en Arctique	p. 52
Figure IV-5: Les Prasinophyceae des mers Arctiques du nord de l'Europe	p. 53
Figure IV-6: Corrélation entre les densités d'Haptophyta détectés par TSA-FISH et les densités de cellules d'une taille de 3-4 µm dénombrés après marquage au DAPI	p. 54
Figure V-1: Circulation de surface et station de prélèvements dans l'océan Indien	p. 58
Figure V-2: Paramètres hydrologiques et concentrations de chlorophylle <i>a</i> dans l'océan Indien	p. 60

Figure V-3: Densités de <i>Prochlorococcus</i> , <i>Synechococcus</i> et picoeucaryotes détectés par cytométrie en flux dans l'océan Indien	p. 61
Figure V-4: Picoeucaryotes, Chlorophyta et Haptophyta dénombrés par TSA-FISH dans l'océan Indien	p. 62
Figure V-5: Profils verticaux typiques d'une station côtière et d'une station océanique de l'océan Indien	p. 63
Figure V-6: Distribution des genres et espèces de Mamiellales le long d'un transect dans l'océan Indien	p. 64
Figure VI-1: Eléments de biogéographie des espèces <i>Micromonas pusilla</i> , <i>Ostreococcus tauri</i> et <i>Bathycoccus prasinus</i> dans l'océan mondial	p. 68
Figure VI-2: Contribution des taxons étudiés dans cette thèse à la communauté de picoeucaryotes dans des masses d'eau présentant des teneurs en sels nutritifs variées	p. 69
Tableau I-1: Liste des espèces de picoeucaryotes formellement décrits	p. 4
Tableau III-1: Origine et conditions de culture des souches utilisées dans cette publication	p. 33
Tableau III-2: Sondes spécifiques d'ordres, de genres et d'espèces de Prasinophyceae	p. 34
Tableau III-3: Tests de spécificité des sondes d'ordres de Prasinophyceae mises au point au cours de cette thèse	p. 36
Tableau III-4: Tests de spécificité des sondes de genres et d'espèces de Prasinophyceae	p. 37
Tableau IV-1: Caractéristiques des stations échantillonnées dans l'Océan Arctique	p. 48
Tableau IV-2: Sondes utilisées dans cette publication	p. 49
Tableau IV-3: Espèces identifiées dans les cultures issues de nos prélèvements dans l'Océan Arctique	p. 55
Tableau V-1: Caractéristiques des stations échantillonnées dans l'Océan Indien	p. 59

Les figures et tableaux des articles publiés sont numérotés de façon indépendante

CHAPITRE I

INTRODUCTION

I-1 La diversité des organismes marins

Charles Darwin, dans "L'origine des espèces" en 1859, fut l'un des premiers à décrire puis à tenter d'expliquer la diversité du vivant et les relations entre les organismes dans leur environnement. Plus de 130 années après, en juin 1992 à Rio de Janeiro (Brésil), la conférence des Nations Unies sur l'Environnement et le Développement, soulignait l'importance de l'étude et de la conservation de la diversité biologique. Une définition du terme biodiversité a été proposée dans l'article 2 du texte sur la convention pour la diversité biologique (CDB) issu de cette conférence: « *La diversité biologique signifie la variabilité parmi les organismes vivants de toutes sortes, incluant les terrestres, les marins et ceux d'autres systèmes aquatiques ainsi que les complexes écologiques qu'ils forment; ceci inclus la diversité au sein de l'espèce aussi bien qu'entre différentes espèces et écosystèmes* »

Bien que les océans couvrent 71 % de la surface de la planète et qu'environ 40 % de la population mondiale vive à moins de 60 km des côtes (rapport du "United Nation Environment Program", 3 octobre 2002), la biodiversité en milieu marin a été bien moins étudiée qu'en milieu terrestre. Ainsi, alors que le milieu marin est bien plus diversifié en terme de phylums et lignées eucaryotes (Briggs 1994), seulement 15 % des espèces formellement décrites sont marines et parmi celles-ci 98 % sont benthiques et seulement 2 % pélagiques. Les deux principales raisons avancées pour expliquer cette relative faible diversité sont, d'une part la difficulté d'accès, et d'autre part le caractère dispersif du milieu marin pélagique (Andersen 1992). De plus, il a été démontré que l'écosystème pélagique, le plus vaste de la planète, est dominé par des organismes de très petite taille (Andersen 1992) dont l'étude nécessite des technologies de pointe. Enfin, ce compartiment abrite probablement un nombre important d'espèces cryptiques, c'est-à-dire distinguées seulement par de subtils caractères morphologiques, génétiques ou écologiques (de Vargas et al. 1999, Norris 2000).

Au-delà du simple référencement des êtres vivants, l'examen de la diversité et de la contribution respective de chaque espèce est la première étape nécessaire à la compréhension d'un écosystème. C'est dans ce contexte général que les résultats présentés au cours de cette thèse se doivent d'être appréhendés.

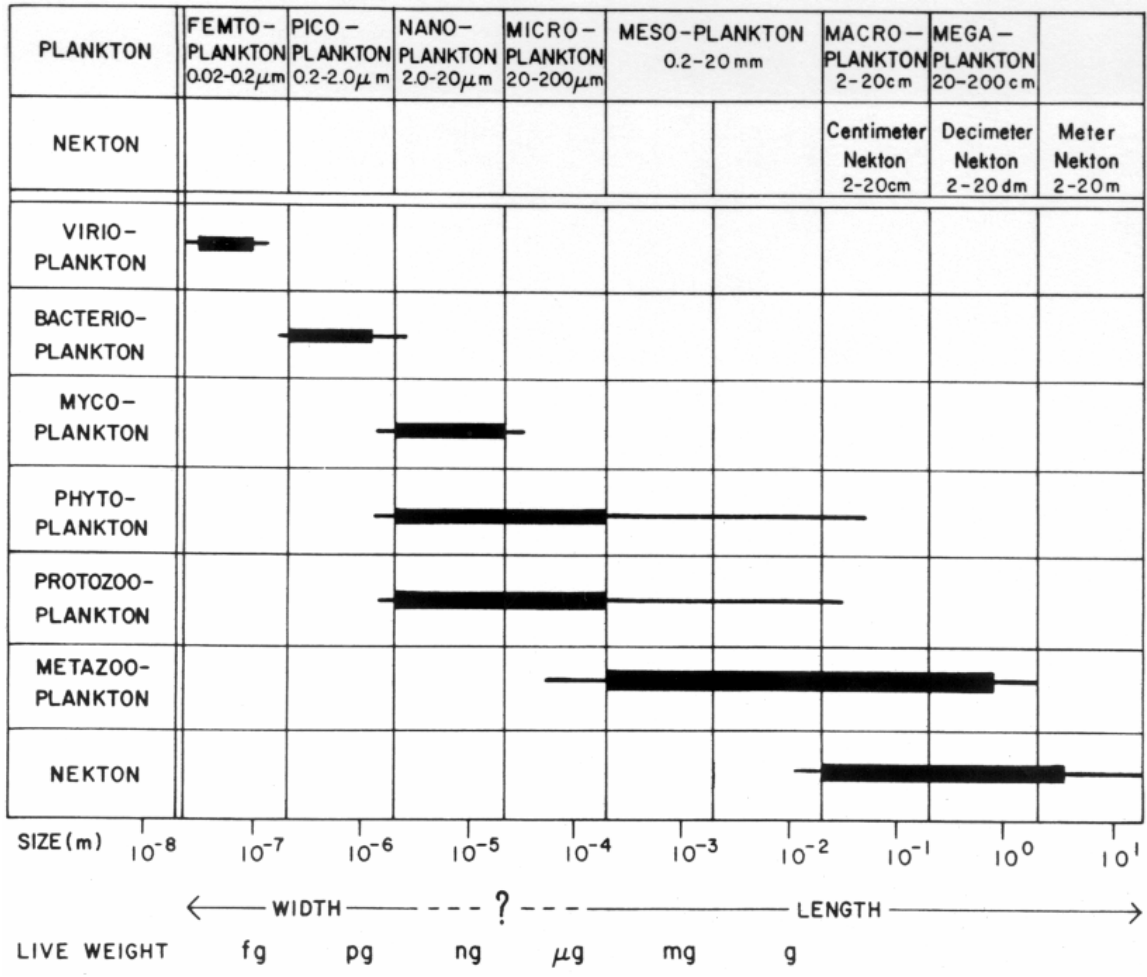


Figure I-1: Distribution des différents compartiments trophiques du plancton selon leur classe de taille. Pour comparaison, les classes de taille du nekton sont indiquées. D'après Sieburth et al. (1978)

I-2 Le picoplancton dans les océans

Le mot phytoplancton (étymologiquement de *Phuton* qui signifie "plantes" et *Planktos* qui signifie "vagabond") désigne des organismes photosynthétiques, le plus souvent unicellulaires, qui dérivent avec les courants. Le phytoplancton marin ne compte que pour 1 à 2 % du carbone végétal total sur terre. Pourtant ces organismes fixent environ 40 % du carbone assimilé chaque année par l'ensemble des producteurs primaires, dont environ 25 % sont séquestrés à long terme dans les profondeurs (Falkowski 1994). Outre l'implication majeure du phytoplancton dans le cycle biogéochimique du carbone (Falkowski 1994, Smetacek 1999) certains organismes tels que les coccolithophores contribuent par ailleurs à 30-50 % des flux de sulfure de la planète (Gibson et al. 1990). Paradoxalement, malgré le rôle de premier ordre que joue le phytoplancton dans des phénomènes globaux tel que la régulation du climat de la planète, sa diversité (richesse taxinomique et structure des peuplements) est encore mal connue. De nos jours, les dinoflagellés, les coccolithophores et les diatomées dominent les assemblages phytoplanctoniques eucaryotes, dont la taille excède 10 μm , dans les Océans. Ces trois groupes de microalgues ont en commun l'origine de leur plaste. Les plastes de la plupart des espèces de ces trois lignées dérivent en effet d'une endosymbiose secondaire avec une algue unicellulaire primitive (elle-même issue d'une endosymbiose primaire avec une cyanobactérie) de la lignée rouge. Ce constat a amené certains auteurs à affirmer une domination des océans actuels par la "lignée rouge" (Grzebyk et al. 2003). La composition du compartiment phytoplanctonique de petite taille étant beaucoup moins connue, cette affirmation n'est pas généralisable pour l'ensemble des producteurs primaires des Océans.

I-2-A Définition et histoire

C'est dans les années 70 que les travaux de Wauthy et al. (1967), Thronsen (1976) et Jeffrey (1976) entre autres, commencent à suggérer la contribution importante de très petits organismes photosynthétiques à la production primaire des zones océaniques, jusque là considérées comme de vastes déserts biologiques. Quelques années après, Sieburth et al. (1978) proposent le terme "picoplancton" (organismes ayant une taille comprise entre 0.2 et 2 μm) pour caractériser les bactéries hétérotrophes planctonique (Fig. I-1). Un peu plus tard la technique de microscopie à épifluorescence et de la microscopie électronique ont permis à

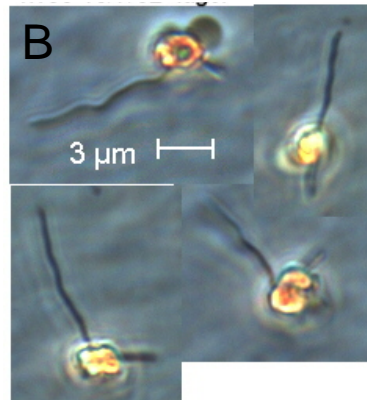
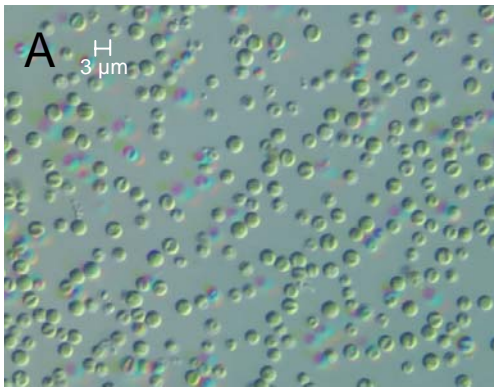


Figure I-2: Photographies obtenues à partir de souches présentes dans la Collection de Cultures de Roscoff. A) souche coccoïde RCC 444, *Pycnococcus* sp. (Prasinophyceae) en microscopie à contraste de phase et B) souche flagellée RCC 529, espèce non identifiée de Dictyochophyceae en microscopie à contraste interférentiel.

Waterbury et al. (1979) et Johnson & Sieburth (1979) de révéler l'importance de la cyanobactérie coccoïde *Synechococcus* (Waterbury et al. 1979) dans l'écosystème pélagique. Le terme de picoplancton est alors élargi aux espèces picoplanctoniques photosynthétiques. Bien que pratique d'emploi, ces limites sont évidemment artificielles et il existe un continuum de taille entre ces différentes catégories. En 1988, la cytométrie en flux bouleverse la connaissance du milieu océanique en permettant de détecter une cyanobactérie dépourvue de phycobiliprotéines et donc sans fluorescence orange, *Prochlorococcus* (Chisholm et al. 1992). Cette cyanobactérie est largement répandue et actuellement considérée comme l'organisme photosynthétique le plus abondant de la biosphère (Partensky et al. 1999). L'existence d'eucaryotes photosynthétiques marins de taille picoplanctonique est connue depuis plus d'une cinquantaine d'année (Butcher 1952), cependant, leur importance écologique n'a été mise en évidence que vers les années 1980 (Johnson & Sieburth 1982, Murphy & Haugen 1985).

I-2-B Importance écologique du picoplancton

La microscopie à épifluorescence ainsi que la cytométrie en flux ont permis de déterminer l'abondance et la distribution des cyanobactéries du genre *Prochlorococcus* et *Synechococcus*, ainsi que des picoeucaryotes photosynthétiques sans distinctions de taxons dans l'Océan. Ces études montrent que dans les zones oligotrophes des océans, les densités de *Prochlorococcus*, *Synechococcus* et picoeucaryotes atteignent typiquement 10^4 à 10^5 , 10^3 à 10^4 et 10^2 à 10^3 cellules.ml⁻¹ respectivement. Les facteurs principaux qui contrôlent la distribution de ces organismes planctoniques photosynthétiques sont l'intensité lumineuse, les concentrations en sels nutritifs, les phénomènes physiques de diffusion et d'advection et les facteurs biotiques influant sur la mortalité cellulaire tels que le broutage ou la lyse virale (Caron et al. 1999). Sur la base des données obtenues en cytométrie, des tendances quant à la répartition de ces groupes du picoplancton se dégagent. Globalement, *Prochlorococcus* domine dans les zones oligotrophes intertropicales (schématiquement 30°S-30°N) tandis que *Synechococcus* et les picoeucaryotes sont d'autant plus nombreux que la teneur en sels nutritifs augmente, notamment en milieu côtier (Partensky et al. 1999, Agawin et al. 2000).

Les picoeucaryotes, dont la densité est relativement faible en zones oligotrophiques, ont un volume cellulaire supérieur à celui des cyanobactéries et contribuent ainsi à une part plus importante de la biomasse totale du phytoplancton. Dans l'Atlantique Nord, William K. Li en 1995 attribue 61 % de la biomasse et 68 % de la productivité du picoplancton aux

Table I-1: Liste des espèces de protistes pour lesquels la taille minimum est plus petite ou égale à 3 µm. En gras, sont indiquées les espèces pour lesquelles la taille maximum est inférieure à 3 µm (espèces picoplanctonique strictes). D'après Vaillot et al. (2004).

Class	Genus	Species	Authority	Min. Length (µm)	Max. Length (µm)	Heterotrophic
Ancyromonadida	<i>Ancyromonas</i>	<i>sigmoides</i>	Kent	3	5	+
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros</i>	<i>tenuissimus</i>	Meunier	3	5	
	<i>Thalassiosira</i>	<i>pseudonana</i>	Hasle & Heimdal	2.3	5.5	
Bicosoecida	<i>Caecitellus</i>	<i>parvulus</i>	(Griessmann) Patterson et al.	3	10	+
	<i>Symbiomonas</i>	<i>scintillans</i>	Guillou & Chrétiennot-Dinet	1.2	1.5	+
Bolidophyceae	<i>Bolidomonas</i>	<i>mediterranea</i>	Guillou & Chrétiennot-Dinet	1	1.7	
	<i>Bolidomonas</i>	<i>pacifica</i>	Guillou & Chrétiennot-Dinet	1	1.7	
Cercomonadida	<i>Massisteria</i>	<i>marina</i>	Larsen & Patterson	3	7	+
Chlorophyceae	<i>Stichococcus</i>	<i>cylindricus</i>	Butcher	3	5	
Chrysophyceae	<i>Paraphysomonas</i>	<i>antarctica</i>	Takahashi	2	4.3	+
	<i>Paraphysomonas</i>	<i>imperforata</i>	Lucas	1.7	5.1	+
	<i>Paraphysomonas</i>	<i>sideriophora</i>	Thomsen	3	5	+
	<i>Picophagus</i>	<i>flagellatus</i>	Guillou & Chrétiennot-Dinet	1.4	2.5	+
	<i>Tetraparma</i>	<i>insecta</i>	Bravo-Sierra & Hernández-Becerril	2.8	3.8	
	<i>Tetraparma</i>	<i>pelagica</i>	Booth & Marchant	2.2	2.8	
	<i>Triparma</i>	<i>columacea</i>	Booth	2.3	4.7	
	<i>Triparma</i>	<i>laevis</i>	Booth	2.2	3.1	
	<i>Triparma</i>	<i>retinervis</i>	Booth	2.7	4.5	
Cryptophyceae	<i>Hillea</i>	<i>marina</i>	Butcher	2.5	2.5	
Dictyochophyceae	<i>Florenciella</i>	<i>parvula</i>	Eikrem et al.	3	5	
Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis</i>	<i>gaditana</i>	Lubián	2	4	
	<i>Nannochloropsis</i>	<i>granulata</i>	Karlson & Potter	2	4	
	<i>Nannochloropsis</i>	<i>limnetica</i>	Kriehnitz et al.	1.5	6	
	<i>Nannochloropsis</i>	<i>oculata</i>	(Droop) Hibberd	2	4	
	<i>Nannochloropsis</i>	<i>salina</i>	Hibberd	3	4	
Pelagophyceae	<i>Aureococcus</i>	<i>anophagefferens</i>	Hargraves & Sieburth	1.5	2	
	<i>Aureoumbra</i>	<i>lagunensis</i>	Stockwell et al.	2.5	5	
	<i>Pelagococcus</i>	<i>subviridis</i>	Norris	2.5	3	
	<i>Pelagomonas</i>	<i>calceolata</i>	Andersen & Saunders	2	3	
Pinguiophyceae	<i>Pinguiochrysis</i>	<i>pyriformis</i>	Kawachi	1	3	
	<i>Pinguiococcus</i>	<i>pyrenoidosus</i>	Andersen et al.	3	8	
Prasinophyceae	<i>Bathycoccus</i>	<i>prasinos</i>	Eikrem & Thronsdén	1.5	2.5	
	<i>Crustomastix</i>	<i>stigmatica</i>	Zingone	3	5	
	<i>Dolichomastix</i>	<i>eurylepidea</i>	Manton	3	3	
	<i>Dolichomastix</i>	<i>lepidota</i>	Manton	2.5	2.5	
	<i>Dolichomastix</i>	<i>tenuilepis</i>	Thronsdén & Zingone	3	4.5	
	<i>Mantoniella</i>	<i>squamata</i>	(Manton & Parke) Desikachary	3	5	
	<i>Marsupiomonas</i>	<i>pelliculata</i>	Jones et al.	3	3	
	<i>Micromonas</i>	<i>pusilla</i>	(Butcher) Manton & Parke	1	3	
	<i>Ostreococcus</i>	<i>tauri</i>	Courties & Chrétiennot-Dinet	0.8	1.1	
	<i>Picocystis</i>	<i>salinarum</i>	Lewin	2	3	
	<i>Prasinococcus</i>	<i>capsulatus</i>	Miyashita & Chihara	3	5.5	
	<i>Prasinoderma</i>	<i>coloniale</i>	Hasegawa & Chihara	2.5	5.5	
	<i>Pseudoscourfieldia</i>	<i>marina</i>	(Thronsdén) Manton	3	3.5	
	<i>Pycnococcus</i>	<i>provasolii</i>	Guillard	1.5	4	
	<i>Resultor</i>	<i>micron</i>	(Thronsdén) Moestrup	1.5	2.5	
Prymnesiophyceae	<i>Chrysochromulina</i>	<i>elegans</i>	Estep et al.	3	4	
	<i>Chrysochromulina</i>	<i>leadbeateri</i>	Estep et al.	1.5	4	
	<i>Chrysochromulina</i>	<i>simplex</i>	Estep et al.	2	6	
	<i>Chrysochromulina</i>	<i>tenuisquama</i>	Estep et al.	2	5	
	<i>Dicrateria</i>	<i>inornata</i>	Parke	3	5.5	
	<i>Imantonia</i>	<i>rotunda</i>	Reynolds	3	4	
	<i>Phaeocystis</i>	<i>cordata</i>	Zingone	3	3.5	
	<i>Trigonaspis</i>	<i>minutissima</i>	Thomsen	2	3.6	
Trebouxiophyceae	<i>Chlorella</i>	<i>nana</i>	Andreoli et al.	1.5	3	
	<i>Choricystis</i>	<i>minor</i>	(Skuja) Fott	1.5	3.5	
	<i>Nannochloris</i>	<i>atomus</i>	Butcher	2	3	
	<i>Nannochloris</i>	<i>eucaryotum</i>	(Wilhelm et al.) Menzel and Wild	3	3	
	<i>Nannochloris</i>	<i>maculata</i>	Butcher	3	3	

picoeucaryotes et ce même si les abondances de *Prochlorococcus* et *Synechococcus* sont plus importantes. La contribution des picoeucaryotes, globalement estimée à un tiers de la biomasse phytoplanctonique en zone océanique, est maximale au niveau du maximum profond de chlorophylle (Campbell et al. 1994, Li 1995). Sur la base d'incorporation de ^{14}C , suivi de tri par cytométrie en flux William K. Li en 1994 a démontré par ailleurs que les picoeucaryotes dominaient la production picoplanctonique en Atlantique Nord avec des valeurs de productivité bien supérieures (18 à 190 fg C /cellule/heure) à celles estimées pour les picoprocaryotes photosynthétiques *Synechococcus* et *Prochlorococcus* (0,03 à 8 fg C /cellule/heure) (Li 1994a).

Les picoeucaryotes photosynthétiques jouent donc un rôle fondamental au sein de la boucle microbienne décrite en 1983 par Azam et al.. Cependant, les peuplements de picoeucaryotes restent actuellement une "boîte noire" dont la composition taxinomique et l'abondance spécifique des différents taxons sont très mal connues à ce jour.

I-2-C Diversité du picoplancton eucaryote

La composante procaryotique du picoplancton se compose uniquement des deux genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus*. Elle est donc celle dont les études de taxinomie, de physiologie et d'écologie ont été les plus approfondies (Partensky et al. 1999).

Bien que certains picoeucaryotes présentent des caractères morphologiques distincts telles que des flagelles ou des écailles, la plupart ont une forme coccoïde qui leur permet d'avoir un rapport surface/volume minimal favorisant la diffusion des nutriments de l'eau de mer vers la cellule. Cela présente un avantage précieux en milieu oligotrophe (Raven 1998). Bien que l'on trouve également des organismes coccoïdes en milieu eutrophe (Courties et al. 1994), ceci pourrait expliquer en partie le succès écologique de ces organismes dans les écosystèmes pauvres en nutriments où ils ont été découverts. Potter et al. en 1997 ont émis l'hypothèse d'une convergence évolutive du picoplancton vers la forme coccoïde. En effet, la forme coccoïde a émergé au sein de quasiment toutes les lignées d'algues, ce qui indique que la diversité biologique est probablement masquée par la similarité morphologique de ces petites "boules vertes ou brunes" (Fig. I-2). Cette similarité de forme et leur très petite taille rendent d'autant plus difficile l'étude de la diversité du picoplancton avec des méthodes classiques.

Jusqu'à présent, la mise en culture et les techniques d'études telles que la microscopie électronique, les analyses pigmentaires ou encore la cytométrie en flux ont permis de mettre à

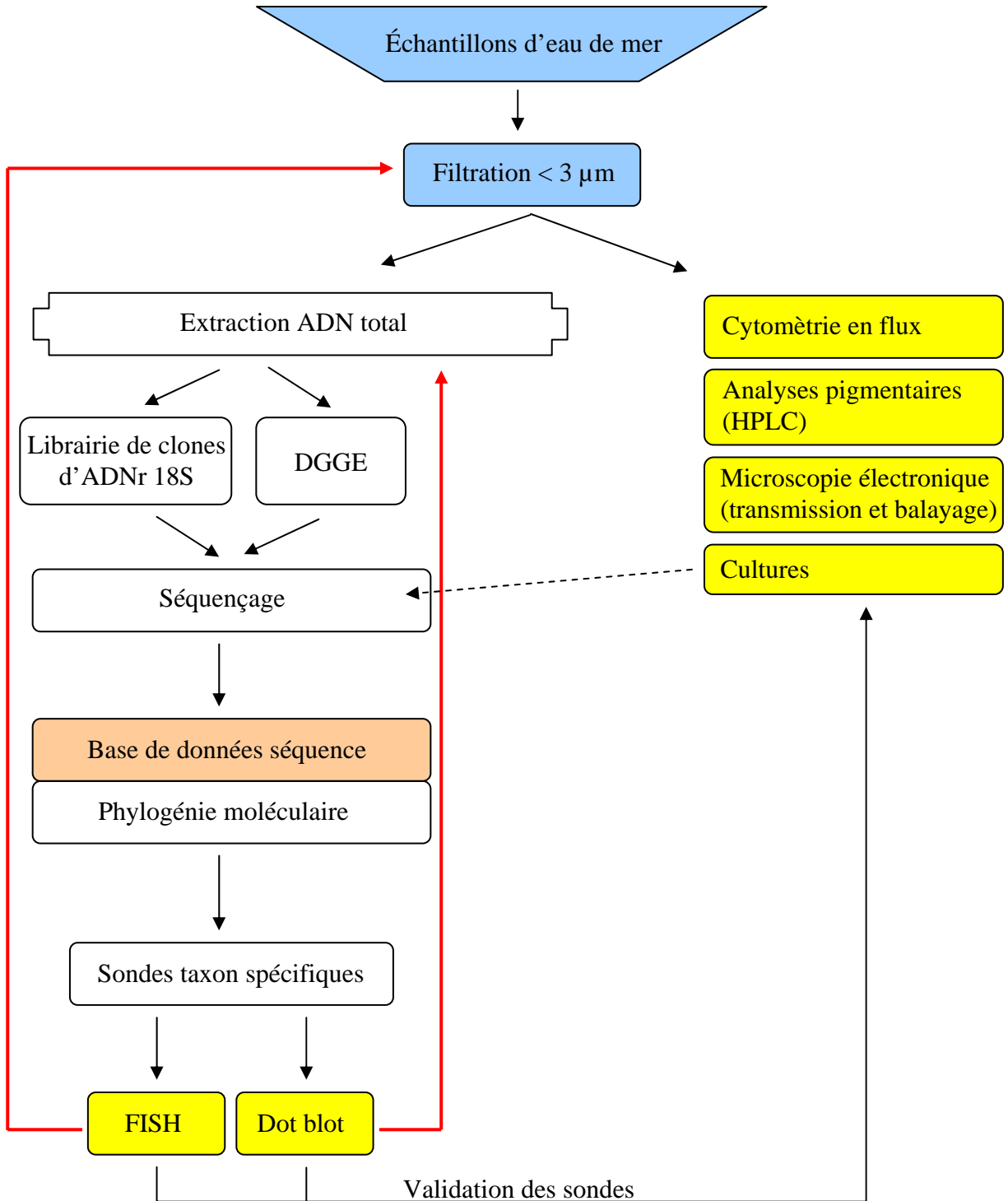


Figure I-3: Méthodologie de l'étude de la diversité du picoplancton à partir d'échantillons prélevés dans l'environnement. A droite sont mentionnées les techniques « classiques » d'étude de la diversité et à gauche l'approche moléculaire.

jour puis de caractériser formellement une quarantaine d'espèces, réparties dans plusieurs des lignées d'algues (Tableau I-1, Vaulot et al. 2004). Les descriptions récentes de nouveaux genres et même de nouvelles classes algales telles que les Pelagophyceae (Andersen et al. 1993), Bolidophyceae (Guillou et al. 1999a), Pinguiphyceae (Kawachi et al. 2002) et plus récemment l'espèce *Florenciella parvula* (Eikrem et al. soumis), appartenant aux eucaryotes picoplanctoniques laissent supposer qu'il en reste encore beaucoup à découvrir. D'ailleurs, les résultats récents obtenus par l'intermédiaire de techniques de biologie moléculaire viennent renforcer cette hypothèse.

Il y a à peine 10 ans, en 1996 Norton et al. notaient : "*Les techniques moléculaires ont difficilement commencé à montrer leur utilité, mais bientôt elles seront sans aucun doute un outil indispensable pour la taxinomie des algues et vont révolutionner la systématique des algues comme la microscopie électronique l'a fait précédemment*". Ces techniques, s'affranchissant de la nécessité de culture, sont particulièrement adaptées à l'étude de la diversité des organismes dépourvus de caractères morphologiques distinctifs tels que les organismes picoplanctoniques. L'application de ces techniques à l'étude de la diversité passe par le choix d'un marqueur moléculaire adéquat.

Le gène qui code pour la petite sous unité de l'ARN ribosomal (ADNr 18S pour les eucaryotes) s'est imposé comme un marqueur phylogénétique de premier choix pour de multiples raisons (Woese & Fox 1977). Le ribosome traduit les ARN messagers en protéines. Son rôle fondamental dans les mécanismes cellulaires a empêché tout transfert latéral entre espèces et induit sa présence chez l'ensemble des organismes eucaryotes. De plus, parmi les différents ARN ribosomaux, l'ADNr 18S présente le meilleur compromis en termes de taille et de variabilité de séquence, ce qui permet de discriminer les organismes à différents niveaux taxinomiques. Cependant il est important de noter que la variabilité de ce gène n'est pas suffisante lorsque l'on souhaite distinguer des organismes phylogénétiquement très proches telles que des souches d'une même espèce par exemple. Il est alors conseillé d'utiliser des marqueurs plus variables comme l'ADNr de la grande sous unité du ribosome (ADNr 28S), ou les séquences entre les gènes de l'opéron codant les ARN ribosomaux (ITSr). Un des avantages majeurs de l'ADNr 18S est la disponibilité d'importantes bases de données de séquences. Par exemple, la base de données maintenue à Roscoff compte environs 7 000 séquences, entières ou partielles, d'organismes eucaryotes.

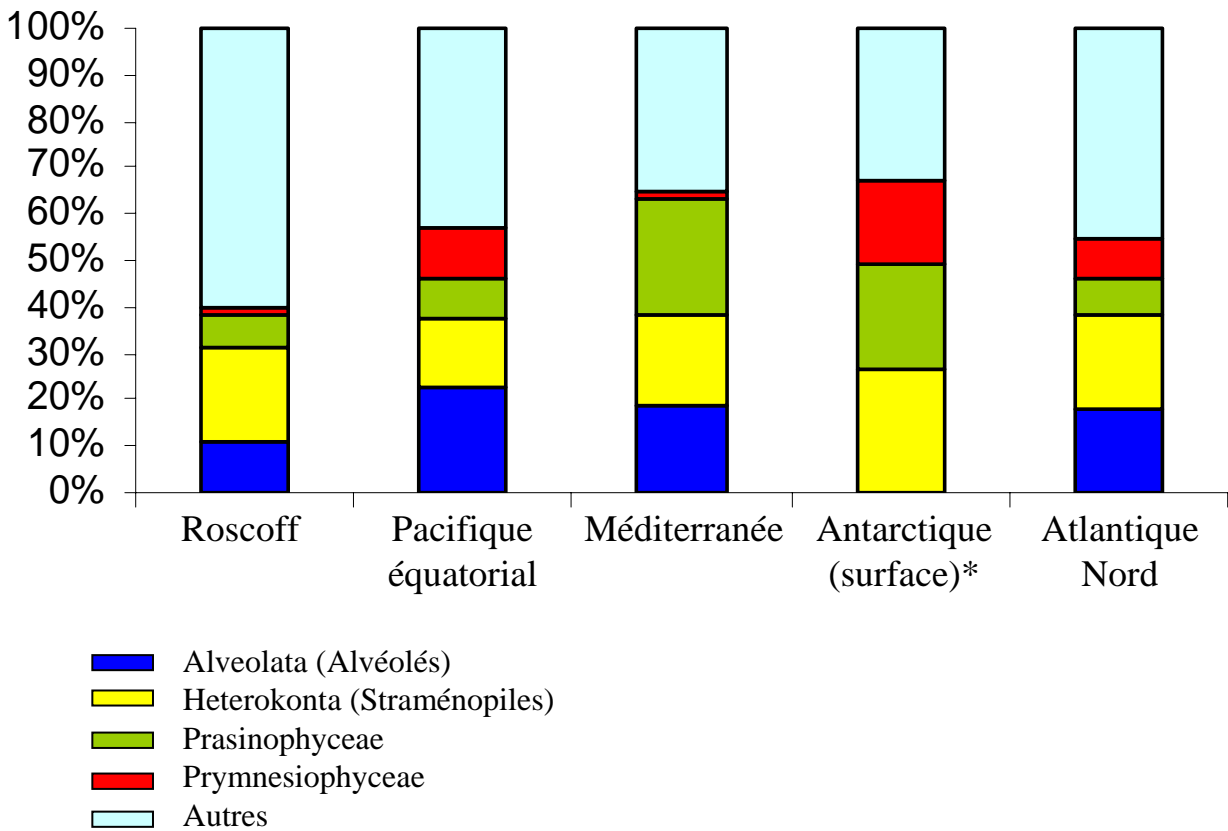


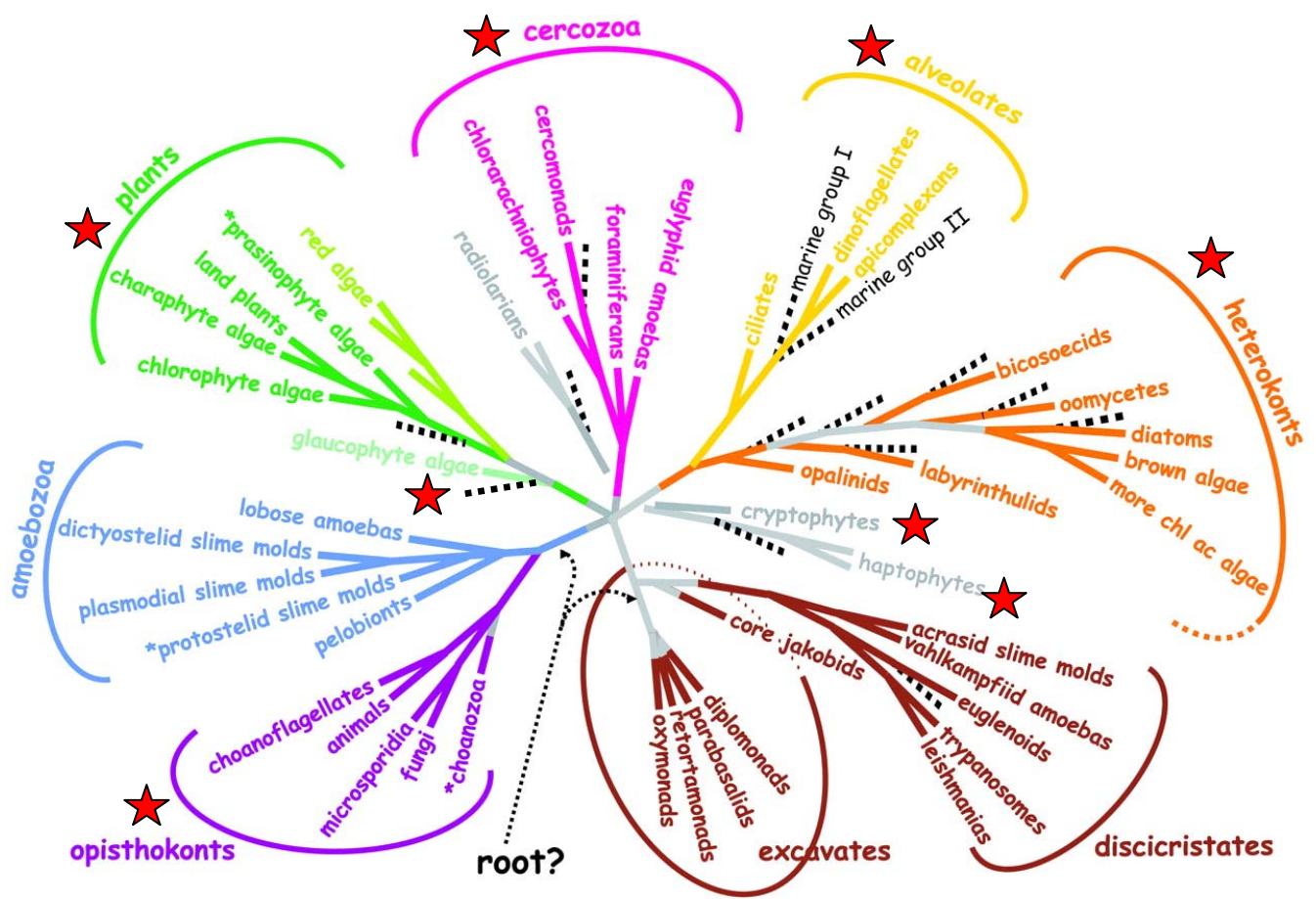
Figure I-4: Contribution du nombre de séquences appartenant aux Alvéolés, Straménopiles, Prasinophyceae et Prymnesiophyceae retrouvées dans les banques de séquences réalisées à partir d'échantillons provenant de différentes masses d'eau. Seul les groupes pour lesquels nous disposons d'informations comparables ont été pris en compte. * Les alvéolés représente 70 % des séquences d'échantillons prélevés plus en profondeur en Antarctique. D'après, (Romari & Vaultot 2004, Diez et al. 2001b, Lopez Garcia et al. 2001, Moon-van der Staay et al. 2001).

La biologie moléculaire appliquée à l'étude de la diversité dans le milieu naturel suit classiquement la procédure schématisée sur la Figure I-3. Après avoir démontré son utilité pour l'étude des procaryotes (Giovannoni et al. 1990), cette approche a permis ces dernières années de mettre en évidence une diversité insoupçonnée d'organismes eucaryotes.

Les études effectuées dans divers environnements ont toutes montré la présence de séquences affiliées à des taxons connus, parfois en nombre important comme pour la classe des Prasinophyceae (Diez et al. 2001b, Romari & Vaulot 2004). De façon plus inattendue les reconstructions phylogénétiques fondées sur ces séquences ont mis en évidence la présence, parfois abondante, de séquences appartenant à des groupes taxinomiques complètement nouveaux n'ayant que peu, voir aucuns liens avec les taxons connus actuellement. Ainsi des lignées nouvelles ont été révélées au sein des Alvéolés (Lopez Garcia et al. 2001, Moon-van der Staay et al. 2001) ou des Heterokonta (Massana et al. 2002) (Fig. I-4). Cette impressionnante diversité, a complètement changé notre vision de la diversité, de l'écologie et de l'évolution des organismes eucaryotes (Baldauf 2003) (Fig. I-5). Toutefois, la présence de certains organismes n'est actuellement connue que *via* leurs séquences issues du milieu naturel et le faible nombre d'espèces décrites en comparaison de la diversité des séquences montre l'importance des efforts à mettre en œuvre afin d'obtenir en culture puis de caractériser ces nouveaux taxons.

I-2-D Approches méthodologiques pour l'étude de la structure des communautés de picoeucaryotes

Très peu de techniques permettent de quantifier l'abondance des groupes taxinomiques dans le milieu naturel. Une de ces techniques est la mise en culture d'organismes par dilution sériée, suivie d'une estimation statistique du nombre de cellules présentes initialement dans l'environnement. Cette technique (Most Probable Number), bien que limitée aux organismes cultivables, a permis entre autre de mettre en évidence la présence en abondance de l'espèce *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) (Butcher 1952) dans les eaux côtières norvégiennes et méditerranéennes (Thronsen 1969, Thronsen & Zingone 1994). Cependant, la méthode la plus utilisée actuellement est fondée sur l'analyse pigmentaire des échantillons par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'analyse de la fraction picoplanctonique a ainsi montré une forte présence d'organismes possédants de la chlorophylle *b* en milieu côtier (Breton et al. 2000, Rodriguez et al. 2003) ainsi qu'une contribution significative des pigments caractéristiques des Haptophyta en milieu plus



★ Lignées dans lesquelles se trouvent des picoeucaryotes

Figure I-5: Arbre phylogénétique consensus des eucaryotes, construit à partir de données moléculaires et ultrastructurales. Les lignes pointillées correspondent aux nouveaux taxa mis en évidence par des méthodes moléculaires indépendantes de la mise en culture. Les astérisques qui précèdent les noms de taxons indiquent les groupes paraphylétiques. Modifié d'après (Baldauf 2003).


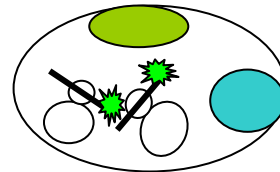
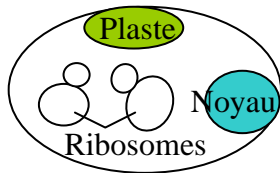
oligotrophe (Letelier et al. 1993, Bidigare & Ondrusek 1996). Toutefois l'étude de la composition pigmentaire ne permet pas de distinguer les groupes taxinomiques au delà de la classe, et la quantification de la contribution de chaque classe à la Chl *a* totale dépend du contenu pigmentaire, qui est variable selon les espèces d'un même taxon et selon les conditions environnementales telle que l'intensité d'éclairement (Jeffrey et al. 1999).

En ce qui concerne l'étude des peuplements picoeucaryotiques par l'approche moléculaire, plusieurs techniques sont actuellement utilisées. La technique des librairies de clones, après amplification spécifique de l'ADNr 18S, permet de générer un nombre important de séquences directement à partir d'ADN extrait du milieu naturel. Ces dernières années, cette technique a été très largement employée et les reconstructions phylogénétiques effectuées à partir des séquences obtenues ont permis de mettre à jour l'existence de groupes d'organismes totalement nouveaux (cf. Chapitre I-2-C). Si cette technique permet d'accéder à la diversité d'espèces non cultivables et dans le même temps d'accroître considérablement le nombre de séquences disponibles dans les bases de données, elle reste strictement qualitative car le nombre de séquences obtenues dépend de multiples facteurs liés à l'affiliation taxinomique des séquences rencontrées. Par exemple, il est reconnu que selon les espèces, l'efficacité d'extraction de l'ADN (Guillou et al. soumis) et le nombre d'opérons de l'ARN ribosomal ne sont pas identiques.

La technique de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) quant à elle, (Muyzer 1999) après amplification d'une partie choisie de l'ADN environnemental (ex: 300 à 500 pb de l'ADNr18S) et migration sur un gel dénaturant, permet d'obtenir un profil de bandes pour différents échantillons du milieu naturel. Ces profils peuvent être comparés et ont permis de mettre en évidence des variations de la diversité au sein des communautés picoeucaryotiques (Diez et al. 2001a, Diez et al. 2001b). Certaines bandes peuvent être découpées puis séquencées afin d'être identifiées. Des séquences présentant une seule paire de bases de différence peuvent être distinguées. Cette technique délicate à mettre en œuvre est complémentaire de l'approche par librairie de clone mais donne ici encore, une approche qualitative de la diversité génétique du milieu naturel.

Une approche différente de la structure des communautés consiste en l'hybridation de sondes radioactives, spécifiques (d'un taxon cible), sur une membrane où a été déposé au préalable l'ADN extrait du milieu naturel (technique du Dot Blot). La quantité de radioactivité émise permet de quantifier le nombre de sondes s'étant hybridées sur l'échantillon et par conséquent le nombre de cibles présentes. Cette technique permet donc à la fois la détection de l'organisme ciblé mais également une estimation semi quantitative de

Sondes spécifiques
Fluorochrome

Detailed description: Two black lines representing DNA probes are shown, each with a green starburst representing a fluorophore.

Mélanges de
cellules sur filtre ①

Sondes hybridées sur
l'ARNr 18S des cellules
cibles ②

Figure I-6: Schématisation de la technique d'hybridation *in situ* fluorescente à l'aide de sondes mono-marquées

son abondance. Cette technique a permis l'étude de la répartition des différents clades de la cyanobactérie *Synechococcus* dans différentes masses d'eau (Fuller et al. 2003).

L'ensemble des techniques présentées ci-dessus fait intervenir une ou des étapes d'extraction et d'amplification du matériel génétique présentant des biais désormais bien identifiés (Wintzingerode et al. 1997, Mohran et al. 1998). Par ailleurs, ces techniques ne donnent qu'une information limitée quant au nombre et à la distribution spatiale des organismes étudiés.

L'hybridation *in situ* fluorescente sur cellules entières est à l'heure actuelle l'une des techniques les plus efficaces afin d'identifier et de quantifier les cellules recherchées grâce à l'utilisation de sondes oligonucléotidiques spécifiques. L'hybridation *in situ* fluorescente utilise une sonde ADN d'environ 18-20 nucléotides (spécifique d'un taxon cible) couplées avec une molécule fluorescente. Cette sonde mise en présence d'un assemblage complexe de cellules va s'hybrider avec sa séquence complémentaire sur l'ARNr 18S de l'organisme ciblé (Fig. I-6). Les cellules hybridées sont alors fluorescentes et peuvent être détectées puis dénombrées par microscopie à épifluorescence, confocale ou par cytométrie en flux pour une analyse automatisée (Amann et al. 1992, Wallner et al. 1993). Cette technique permet de s'affranchir à la fois des biais dus à l'extraction d'ADN ou de la PCR ainsi que de la mise en culture. C'est à la fois les caractéristiques de l'ADNr 18S ainsi que l'abondance des ribosomes au sein des cellules qui sont utilisés dans cette technique. L'introduction de cette méthode dans les sciences de l'environnement afin de détecter des bactéries date de 1989 (DeLong et al. 1989). En utilisant des sondes mono-marquées (c. à d. une sonde = un fluorochrome), elle s'est avérée très utile pour l'étude des communautés bactériennes hétérotrophes (Moter & Gobel 2000, Ravenschlag et al. 2001). Bien que satisfaisante sur des picoeucaryotes photosynthétiques en culture, l'application de cette technique sur des échantillons provenant du milieu naturel n'a pas permis l'obtention de signaux fluorescents suffisamment intenses pour l'étude de la diversité des communautés naturelles de picoeucaryotes (Simon et al. 2000). De plus, de fortes variations de l'intensité du signal fluorescent ont été observées en fonction du stade de croissance (directement corrélé au contenu en ribosomes) des cellules étudiées (Simon et al. 1995). Ceci introduit donc un biais en rendant impossible la détection des cellules présentant un état physiologique non optimal dans le milieu naturel, ce qui a pour conséquence de masquer toute une partie de la diversité. L'étude des communautés naturelles de picoeucaryotes photosynthétiques nécessite donc une amplification de la fluorescence permettant de s'affranchir de ces problèmes.

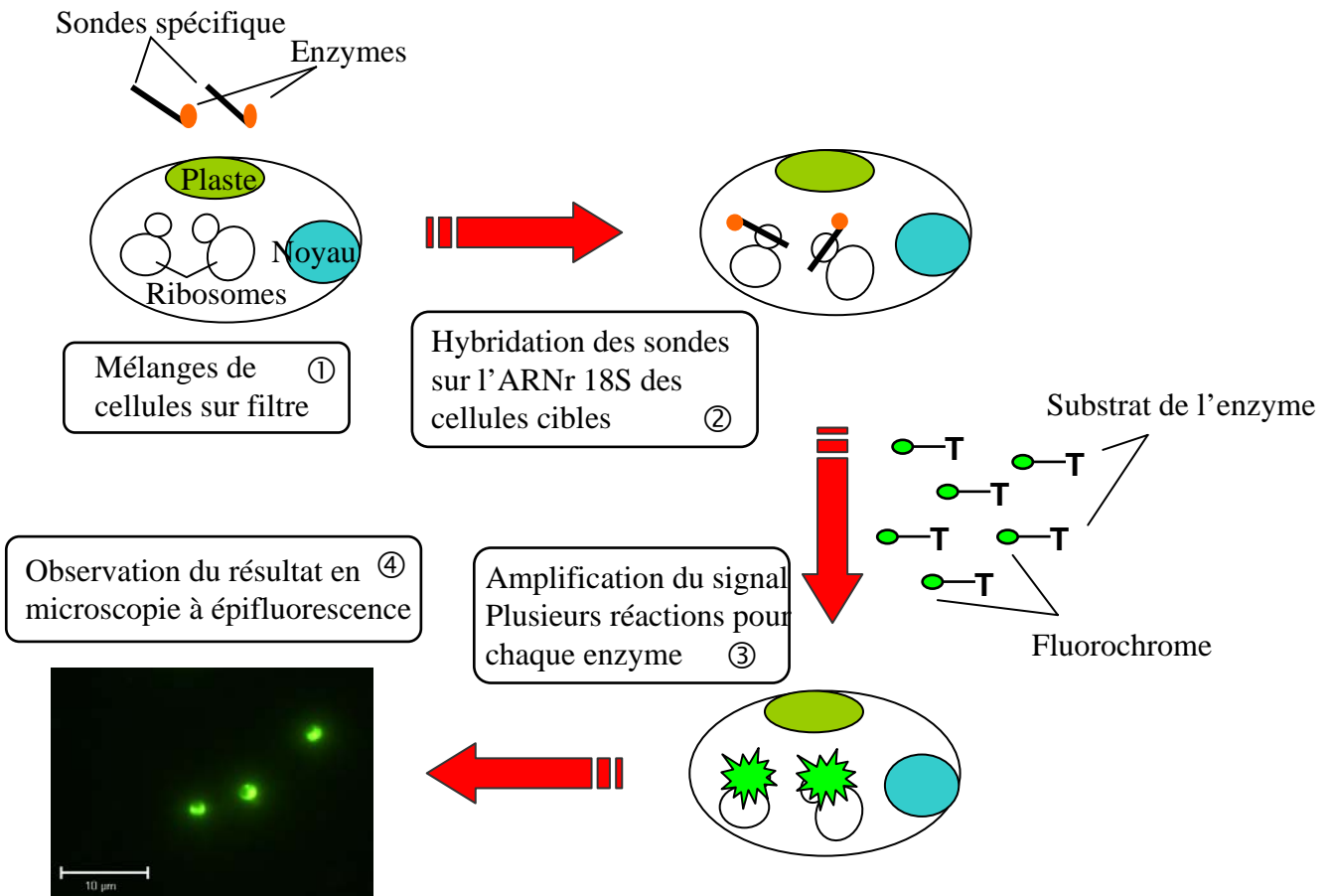


Figure I-7: Illustration des différentes étapes de l'hybridation *in situ* fluorescente couplée au système TSA d'amplification du signal par réaction enzymatique faisant intervenir l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxidase) et son substrat, la tyramide.

Il existe plusieurs techniques d'amplification du signal. Ces techniques impliquent des rapporteurs immunofluorescents (Lebaron et al. 1997), l'utilisation de longues sondes couplées à plusieurs molécules fluorescentes (sondes polynucléotidiques) (Pernthaler et al. 2002) ou des sondes couplées directement à une enzyme. C'est cette dernière solution d'amplification du signal via une réaction enzymatique (Tyramide Signal Amplification (TSA) couplé à l'enzyme "Horse Radish Peroxidase" (HRP)) (Fig. I-7), utilisée avec succès depuis une dizaine d'années sur les bactéries (Schönhuber 1997, Schönhuber et al. 1999) que nous avons choisie pour étudier les peuplements de picoeucaryotes photosynthétiques.

I-3 La classe des Prasinophyceae

I-3-A Définition et systématique

Parmi les picoeucaryotes, la classe des Prasinophyceae nous est apparue particulièrement intéressante à étudier plus en détail. En effet, de nombreuses espèces de Prasinophyceae sont de taille picoplanctonique. C'est d'ailleurs dans cette classe que l'on retrouve le plus petit organisme eucaryote connu à ce jour, *Ostreococcus tauri* (Courties et al. 1994). Les données de la littérature suggèrent l'ubiquité et l'abondance des organismes qui composent cette classe d'algues (Johnson & Sieburth 1982, Stockner & Antia 1986). Par ailleurs, quelques Prasinophyceae forment des kystes (les phycomes) pour survivre en conditions défavorables. Elles ont été retrouvées à l'état fossile et ont pu être datées de 600 millions d'années au moins. Ces Prasinophyceae fossiles sont le plus souvent regroupées sous le terme Achritarch (Mendelson 1993).

Les Prasinophyceae appartiennent à l'infra règne des Chlorophyta et au sous règne des Chlorobionta (qui inclut les Embryophyta). L'étymologie du nom Prasinophyceae, vient du grec *Prasinos* qui désigne la couleur "verte-poireaux". Les scientifiques s'accordent sur le fait que les différentes lignées de Prasinophyceae ont divergé précocement. Les Prasinophyceae actuelles sont considérées comme les algues vertes ayant conservé le plus de caractères primitifs. Elles sont probablement à l'origine des plantes supérieures (Sym & Pienaar 1993, An et al. 1999). La systématique de cette classe reste à ce jour très discutée. En effet, les Prasinophyceae représentent un groupe paraphylétique hétérogène où sont regroupés des taxons très divers. Leur phylogénie a d'abord été fondée sur des caractères ultrastructuraux

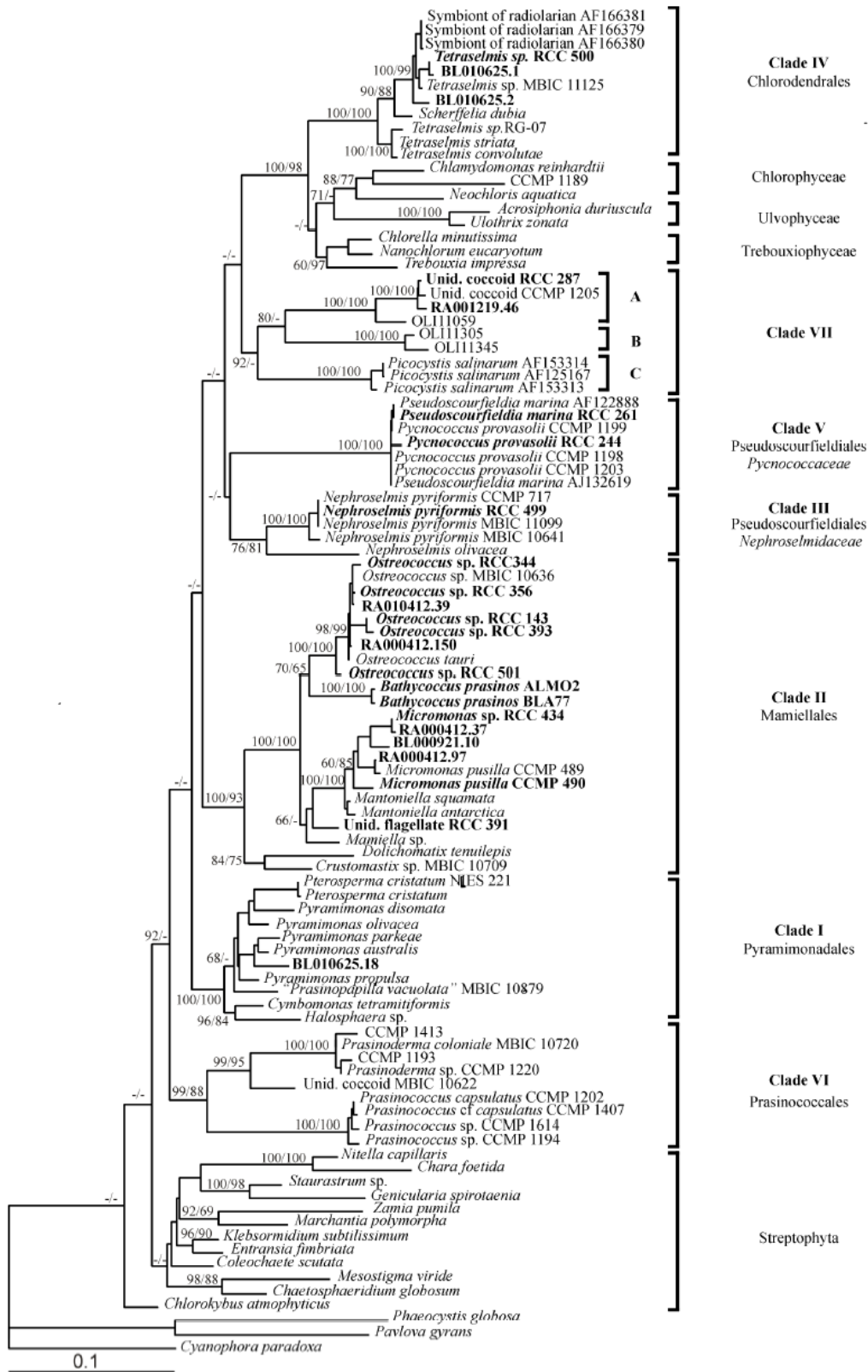


Figure I-8: Arbre phylogénétique des Prasinophyceae fondé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 18S. Les valeurs de bootstrap présentées correspondent respectivement aux méthodes « Neighbour Joining » et « Maximum Parsimony ». Les séquences en gras correspondent à celles obtenues dans la publication dont est issue cette figure. D'après Guillou et al. (2004).

tels que la présence de flagelles, d'écailles organiques ou encore la position des flagelles. Puis des études de biologie moléculaire fondées sur l'analyse des séquences de l'ADNr 18S (Nakayama et al. 1998) ou du gène chloroplastique *rbcL* (Daugbjerg et al. 1995) ont modifié cette classification en permettant l'insertion d'organismes ayant des caractéristiques morphologiques inhabituelles (sans flagelle, *Bathycoccus*), sans écailles (*Micromonas*), sans écailles ni flagelles (*Pycnococcus*), mais sans réellement clarifier la taxinomie à l'intérieur de ce groupe d'algues (Fawley et al. 2000). Etant donné la particularité de chacun des ordres présents au sein des Prasinophyceae, il y a actuellement un consensus pour les élever au rang de classe bien que cela n'ait pas encore été publié. La plus récente phylogénie des Prasinophyceae est présentée sur la Figure I-8 (Guillou et al. 2004).

Les Chlorodendrales (Clade IV) sont les moins primitives des Prasinophyceae. Cet ordre se compose essentiellement d'organismes symbiontes tel que l'espèce *Tetraselmis convolutae* (Parke & Manton 1967) en symbiose avec le ver *Convolvata roscoffensis*. Toutes les espèces sont de tailles supérieures à 2 μm .

Le clade VII, décrit très récemment, se divise en trois sous-groupes (Guillou et al. 2004). Le premier comprend l'espèce *Picocystis salinarum* (Lewin et al. 2000) nouvellement décrite à partir d'échantillons provenant d'un lac salé de Californie. Le deuxième se compose uniquement de séquences environnementales issues du Pacifique Equatorial (Moon-van der Staay et al. 2001). Le troisième groupe comprend des séquences environnementales du Pacifique, de Roscoff ainsi que les souches CCMP1205 et RCC287 disponibles en culture mais pas encore décrites formellement.

L'ordre des Pseudoscourfieldiales est divisé en deux clades: Pycnococcaceae et Nephroselmidaceae. La famille des Pycnococcaceae (clade V) où l'on retrouve les genres *Pycnococcus* (Guillard et al. 1991) décrit dans l'Atlantique Nord-Ouest et le golfe du Mexique, et *Pseudoscourfieldia* (Thronsen 1969, Manton 1975). Des séquences environnementales appartenant à cette famille ont pu être isolées dans les eaux côtières de Roscoff et de la mer du Nord. La famille des Nephroselmidaceae (clade III) se compose de l'unique genre *Nephroselmis* (Stein 1878) comprenant plusieurs espèces.

Le clade formant l'ordre des Pyramimonadales (clade I) est très bien individualisé par les analyses phylogénétiques réalisées à partir de l'ADNr 18S. Bien que certaines espèces soient de petite taille, la plupart sont de taille supérieure à 2-3 μm . Des séquences affiliées à ce clade ont été isolées au large de Roscoff.

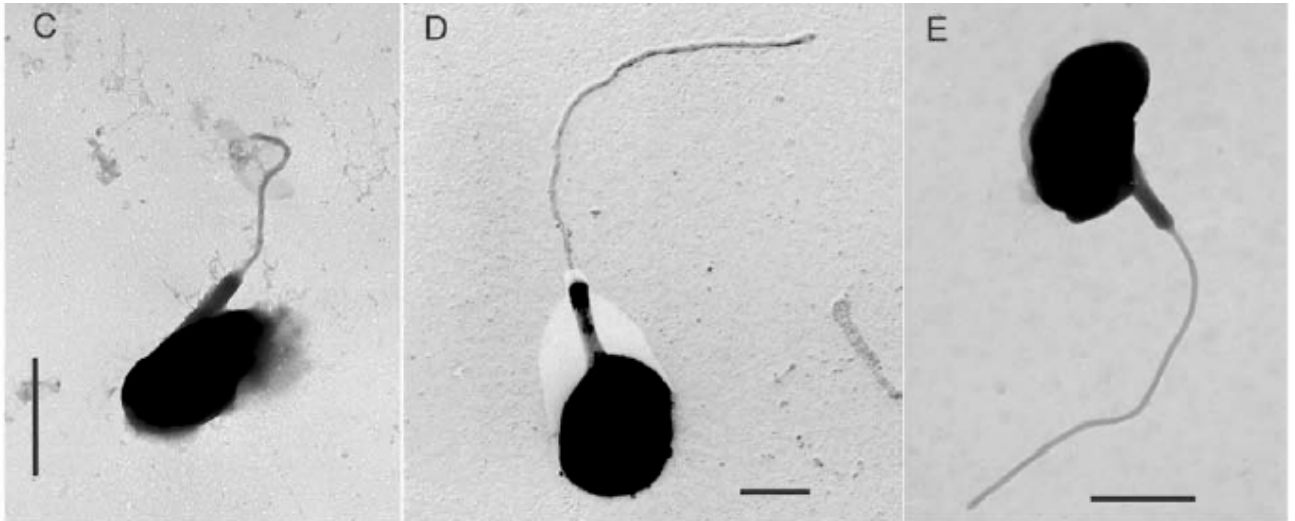


Figure I-9: Images en microscopie électronique à transmission de trois souches distinctes de l'espèce *Micromonas pusilla*. C, *Micromonas* sp. (CCMP 489). D, *Micromonas* sp. (RCC 434). E, *Micromonas* sp. (CCMP 490). Barre d'échelle = 1 μ m. D'après Guillou et al. (2004)

L'ordre des Prasinococcales (clade VI), décrit en 2000 (Fawley et al. 2000) se compose principalement des genres *Prasinoderma* (Hasegawa et al. 1996) et *Prasinococcus* (Miyashita et al. 1993), tous deux décrits de l'Ouest de l'Océan Pacifique. Le genre *Prasinococcus* semble être largement répandu dans les océans (Sieburth et al. 1999). Cependant aucune séquence affiliée à cet ordre n'a été rapportée par les auteurs des récentes approches moléculaires de la diversité phytoplanktonique.

I-3-B L'ordre des Mamiellales

On retrouve souvent des représentants de la classe des Prasinophyceae lors de mise en culture à partir d'eau de mer pré-filtré sur 3 μm . Ceci est particulièrement vrai pour des espèces appartenant à l'ordre des Mamiellales, telles que *Ostreococcus tauri* ou *Micromonas pusilla* pour lesquelles de nombreuses souches provenant de différentes régions océaniques sont disponibles en culture (Vaulot et al. 2004). Les espèces qui composent l'ordre des Mamiellales sont par ailleurs retrouvées fréquemment lors d'observations d'échantillons naturels d'eau de mer en microscopie électronique (Thronsen 1976) et dans les banques de séquences réalisées à partir du milieu naturel (Romari & Vaulot 2004). Au sein de ces genres et/ou espèces, on peut remarquer l'émergence d'une certaine hétérogénéité de séquences. Ainsi, le genre *Ostreococcus* se distingue en quatre clades et l'espèce *Micromonas pusilla* en trois clades (Fig. I-8 et Fig. I-9) (Guillou et al. 2004). Par ailleurs, cet ordre présente une certaine homogénéité en ce qui concerne sa signature pigmentaire, caractérisé par la présence systématique des caroténoïdes que sont la prasinoxanthine et l'uriolide (Latasa et al. soumis).

Micromonas pusilla est la première espèce du picoplancton eucaryote à avoir été observée puis décrite, d'abord sous le nom de *Chromulina pusilla*, en 1952 par Butcher. Cette espèce a été très fréquemment observée dans divers environnements, aussi bien dans des échantillons naturels par microscopie électronique (Hoepffner & Hass 1990) que dans des cultures (Thronsen & Kristiansen 1991). Les scientifiques s'accordent pour la considérer comme une espèce ubiquiste et pouvant être abondante (Thronsen 1976, Thomsen & Buck 1998).

Ostreococcus tauri, décrite dans l'étang de Thau en 1994 (Courties et al. 1994) est observée de plus en plus fréquemment dans divers environnements (Guillou et al. 2004, Worden et al. 2004). Certains auteurs ont même suggéré la formation de blooms dus à cette espèce (O'Kelly et al. 2003). Tout comme *M. pusilla*, cette espèce présente une importante

diversité génétique (Guillou et al. 2004, Rodriguez et al. soumis). Par ailleurs, le séquençage du génome de la souche type devrait très bientôt être disponible.

Bathycoccus prasinus (Eikrem & Throndsen 1990) est elle aussi une espèce décrite récemment, à partir de prélèvements réalisés en mer de Norvège et en mer Méditerranée. Très peu de données bibliographiques existent au sujet de cette espèce qui semble avoir une affinité particulière pour les faibles intensités lumineuses.

I-4 Les autres taxons picoplanctoniques étudiés

Les picoeucaryotes connus sont distribués dans une quinzaine de classes (Tableau I-1, p. 4). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés, en plus des Prasinophyceae à la division des Haptophyta (contenant les classes Prymnesiophyceae et Pavlovophyceae) ainsi qu'aux Pelagophyceae et Bolidophyceae, deux classes d'Ochromphyta.

I-4-A Les Haptophyta

Cette division est composée des deux classes Prymnesiophyceae et Pavlovophyceae (Edwardsen et al. 2000). La plus diversifiée de ces classes, celle des Prymnesiophyceae, comporte de nombreux représentants nanoplanctoniques, en particulier certaines coccolithophores telle que l'espèce *Emiliana huxleyi* (Lohmann) pouvant former des efflorescences massives (Iglesias-Rodriguez et al. 2002) mais également des espèces toxiques telles que *Prymnesium* ou *Chrysochromulina* (Gjosaeter et al. 2000). De nombreuses séquences picoplanctoniques appartenant à cette classe ont été isolées en milieu océanique (Moon-van der Staay et al. 2000) et les analyses pigmentaires effectuées sur la fraction picoplanctonique leurs attribuent souvent une contribution à la Chl *a* significative (Mackey et al. 1998).

I-4-B Les Pelagophyceae et Bolidophyceae (Ochrophyta)

Le terme Ochrophyta désigne l'ensemble des Heterokonta (ou Straménopiles) photosynthétiques. Les deux taxons que nous avons étudiés durant ce travail correspondent à deux classes décrites récemment et composées uniquement d'organismes picoplanctoniques.

La classe des Bolidophyceae, décrite en 1999 se compose de deux espèces, *Bolidomonas pacifica* et *Bolidomonas mediterranea* (Guillou et al. 1999a) isolées respectivement dans l'océan Pacifique équatorial et la mer Méditerranée. Le genre *Bolidomonas* ne représente pas plus de 1 % de l'ADN eucaryote dans le Pacifique équatorial et la Méditerranée, et moins de 4 % de la Chl *a* picoplanctonique dans le Pacifique équatorial (Guillou et al. 1999b). A ce jour, très peu de données sont disponibles concernant l'écologie et la biogéographie de ces espèces.

La classe des Pelagophyceae, dont l'espèce type est *Pelagomonas calceolata* (Andersen et al. 1993) a été décrite en 1993. Cette classe comprend actuellement deux ordres (Pelagomonadales et Sarcinochrysidales) et environ 13 espèces (Reviere 2003) qui pour certaines peuvent être néfastes (*Aureococcus*, *Aureoumbra*). Les représentants de cette classe sont souvent considérés comme des constituants importants de la communauté picoplanctonique en zone oligotrophe (Andersen et al. 1996, Bidigare & Ondrusek 1996).

I-5 Les régions océaniques étudiées

I-5-A Le milieu côtier tempéré (Roscoff)

La station ASTAN située à quelques miles nautiques de Roscoff est aisément accessible avec la Mysis (Navire Océanographique de la Station Biologique de Roscoff) et fait l'objet d'un suivi hydrologique régulier à long terme (<http://www.sb-roscoff.fr/Somlit/>). Cette zone peu profonde (50 m), soumise à de forts mélanges verticaux essentiellement dus aux courants de marée et aux vents, présente une colonne d'eau homogène toute au long de l'année. Les suivis saisonniers des espèces du microphytoplancton ont montré l'existence régulière d'un bloom de diatomées (le plus souvent *Guinardia delicatula*, (Cleve) Hasle) à la fin du printemps et en automne (Sournia et al. 1987, Sournia & Birrien 1995). La construction de banques de séquences d'ADNr 18S des échantillons provenant de ce site a montré une

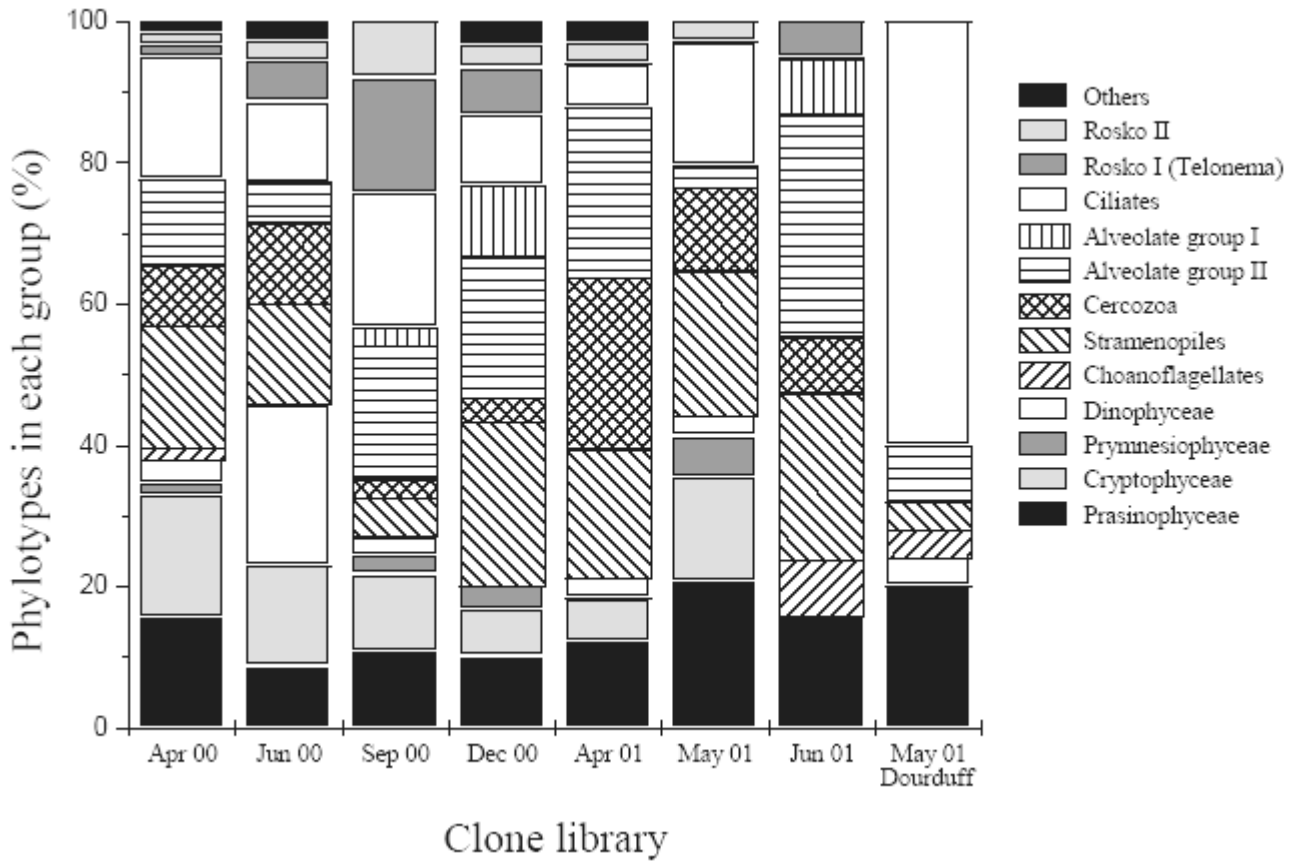


Figure I-10: Variation saisonnière des différents groupes de picoeucaryotes à Roscoff (station ASTAN). Pourcentages exprimés en fonction du total de phylotypes (séquences ayant une identité > 99,5%). D'après Romari & Vaultot (2004).

grande diversité taxinomique ainsi qu'une variation saisonnière des différents taxons picoeucaryotiques identifiés, notamment des organismes appartenant à la classe des Prasinophyceae (Fig. I-10).

I-5-B Les mers Arctiques du nord de l'Europe

Contrairement au pôle sud, le pôle nord de notre planète est recouvert par un océan (océan Arctique). Cette zone de l'Océan mondial, difficilement accessible, joue un rôle primordial dans la régulation du climat de la planète via la circulation océanique (enfouissement des eaux de surface vers les profondeurs) (Anderson et al. 1998), et depuis peu fait l'objet d'études attentionnées de la part des pays qui bordent cet océan (<http://www.arctic.noaa.gov/>). Les mers Arctiques du nord de l'Europe (mer du Groenland, mer de Norvège et mer de Barents) sont très influencées par l'extension la plus nordique du courant nord Atlantique, qui est le courant chaud qui apporte la douceur du climat de l'ouest européen. Notre zone d'étude s'est située en zone peu profonde, sur le plateau continental, à la frontière entre les trois mers citées ci-dessus. Cette zone, libre de glace en été, est le point de rencontre entre les eaux chaudes du courant nord Atlantique et les eaux froides qui descendent de l'océan Arctique, ce qui offre l'avantage de rencontrer des conditions hydrologiques contrastées dans un périmètre restreint. Cette zone, considérée comme une région océanique très productive (Kogeler & Rey 1999), présente des valeurs de chlorophylle aux alentours de 35-40 mg de Chl *a* m⁻² en fin d'été (Longhurst 1998). Le microphytoplancton se caractérise par une diversité importante de dinoflagellés (Okolodkov & Dodge 1996) et un bloom printanier de diatomées (Markowski & Wiktor 1998, Rat' kova et al. 1998). Pour ce qui est du nano- et picoplancton, des études précédentes impliquant des méthodes de mise en cultures, ont pu montrer la présence d'Haptophyta et de Prasinophyceae, notamment de l'espèce *Micromonas pusilla* qui semblerait très abondante (Thronsen 1970, Thronsen & Kristiansen 1991).

I-5-C L'océan Indien sub-équatorial

Parce que loin des grandes puissances économiques actuelles, l'océan Indien reste à ce jour le bassin océanique le moins étudié comparativement aux bassins Pacifique et Atlantique. Complètement fermé au nord par l'Asie, l'océan Indien peut se diviser schématiquement en deux zones distinctes. Au nord de 10° sud, une zone assez bien étudiée car fortement

influencée par le phénomène des moussons et les apports d'eau salée via les deux bassins de concentrations que sont la mer Rouge et le golfe Persique. Au sud de cette latitude, une zone beaucoup moins bien étudiée, ouverte sur l'océan Antarctique et essentiellement formée par un gyre océanique sub-équatorial. En traversant ce bassin sud de l'océan Indien, de l'Afrique du sud à l'Australie, plusieurs zones ayant des teneurs en nutriments très différentes sont rencontrées. Tout d'abord une zone riche en sels nutritifs qui correspond à la zone d'influence du courant des Aiguilles puis le gyre sub-équatorial qui présente, comme pour les gyres centraux de l'Atlantique et du Pacifique, des températures élevées et un fort caractère oligotrophe. Bien que l'on puisse supposer que les communautés picoplanctoniques du sud de cet océan soient semblables à celles rencontrées dans le centre des autres océans, elles n'ont pas encore fait l'objet d'études spécifiques.

I-6 Objectifs et approche du travail

Le premier pas pour passer de la description de la diversité d'un écosystème à son écologie est d'appréhender l'importance relative des espèces qui le composent. Ce travail de thèse s'articule autour des deux objectifs suivants :

- Le premier objectif a été d'identifier et quantifier les taxons qui composent la communauté picoeucaryotique dans l'environnement.
- Le second objectif a été d'établir la répartition des principaux taxons dans des régions contrastées de l'océan mondial.

Afin de pouvoir atteindre le premier objectif fixé nous avons adapté une technique déjà utilisée en microbiologie (l'hybridation *in situ* couplée à une amplification du signal fluorescent par la réaction enzymatique HRP-tyramide) à l'étude du picoplancton eucaryote (**Chapitre II**). Nous avons ensuite étudié la contribution de différents groupes taxinomiques au sein de trois masses d'eau présentant des caractéristiques variées. Nous nous sommes particulièrement intéressé à la classe des Prasinophyceae.

Nous avons tout d'abord observés les variations saisonnières de la composition du picoplancton dans les eaux côtières au large de Roscoff (**Chapitre III**). Nous avons ensuite étudié la diversité des communautés picoplanctoniques dans les mers Arctiques du nord de l'Europe (**Chapitre IV**) et enfin dans les eaux oligotrophes de l'océan Indien (**Chapitre V**).

Bien que la biologie moléculaire ait récemment permis de grandes avancées dans la connaissance de la diversité des picoeucaryotes et apparaisse aujourd'hui comme indispensable, les techniques plus "classiques" de mise en cultures, de microscopie électronique ou d'analyse pigmentaire restent nécessaires à la caractérisation des assemblages algaux du milieu naturel et à la description de nouvelles espèces. C'est ce type d'approche faisant appel à plusieurs techniques que nous avons voulu privilégier afin d'estimer au mieux la diversité des organismes dans l'environnement. Pour ce faire la participation aux programmes européen PICODIV et régional PICOMANCH a été déterminante, permettant de nombreuses collaborations avec des membres de l'équipe plancton océanique de Roscoff (cytométrie), des chercheurs espagnols (analyses pigmentaires, biologie moléculaire), norvégiens (microscopie électronique) ou encore allemands et anglais.

CHAPITRE II

Application de l'hybridation *in situ* fluorescente couplée avec l'amplification du signal par la tyramide (FISH-TSA) à l'étude de la diversité du picoplancton eucaryote

F. Not, N. Simon, I. C. Biegala and D. Vaultot (2002) Application of fluorescent *in situ* hybridization coupled with tyramide signal amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. **Aquatic Microbial Ecology** 28, 157-166.

II- 1 RESUME EN FRANÇAIS

Le picoplancton photosynthétique (les cellules du phytoplancton ayant un diamètre plus petit que 2-3 μm) contribue de façon significative à la biomasse et à la production primaire des zones oligotrophiques de l'océan et des eaux côtières à certaines périodes de l'année. L'identification de ces organismes est difficile à cause de leur petite taille et de leur morphologie simple. Par conséquent les études détaillées de leur distribution et de leur rôle dans les écosystèmes marins sont délicates. Ce travail démontre l'utilité de sondes (oligonucléotidiques) spécifiques de classes algales ou de groupes de niveaux taxinomiques inférieurs. Ces sondes utilisées en hybridation *in situ* fluorescente couplée à une amplification du signal par la tyramide permettent d'étudier la diversité du picophytoplancton eucaryote. Les cellules ciblées sont détectées et comptées par microscopie à épifluorescence. Dans le cadre de ce travail, la sensibilité de la technique et la spécificité des sondes ont été testées sur des souches pures et des mélanges de souches picoplanctoniques ainsi que sur des échantillons du milieu naturel provenant de la Manche. Dans ces échantillons, la communauté était dominée par des cellules appartenant à la division des Chlorophyta. Des Haptophyta, Bolidophyceae et Pelagophyceae ont également été détectées à de faibles abondances. La méthode du FISH-TSA est désormais applicable à l'étude de la diversité du picoplancton dans le milieu naturel.

[Lien vers l'article en pdf](#)

Application of fluorescent *in situ* hybridization coupled with tyramide signal amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition

Fabrice Not*, Nathalie Simon, Isabelle C. Biegala, Daniel Vaultot

Station Biologique, UMR 7127, CNRS, INSU et Université Pierre et Marie Curie, Place George Teissier, 29680 Roscoff, France

ABSTRACT: Photosynthetic picoeukaryotes (phytoplankton cells with a diameter smaller than 2 to 3 μm) contribute significantly to both biomass and primary production in the oligotrophic open ocean and coastal waters, at certain times of the year. The identification of these organisms is difficult because of their small size and simple morphology, therefore hindering detailed ecological studies of their distribution and role. In this paper, we demonstrate the use of oligonucleotide probes specific to algal classes or to lower order taxa in combination with fluorescent *in situ* hybridization and tyramide signal amplification (FISH-TSA) to determine eukaryotic picophytoplankton diversity. Target cells were detected and enumerated using epifluorescence microscopy. The sensitivity of the technique and the specificity of the probes were tested on pure and mixed picoplanktonic strains, as well as on natural samples from the English Channel. In these samples, the community was dominated by cells belonging to the division Chlorophyta. Haptophyta, Bolidophyceae and Pelagophyceae were also detected at low abundance. The FISH-TSA method is readily applicable to the study of picoplankton diversity in natural communities.

KEY WORDS: Fluorescent *in situ* hybridization · Tyramide signal amplification · Picoplankton · Eukaryotes · Coastal waters · Diversity

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

Cells smaller than 2 to 3 μm (picoplankton) are important in the marine environment (Li & Platt 1987). The eukaryotic component of the picoplankton has been recognized to contribute significantly to both biomass and primary production in oligotrophic areas of the world's oceans (Campbell et al. 1994, Li 1994) and can also be important in coastal waters (Courties et al. 1994, Campbell et al. 1998). Their small size and simple morphology (numerous picoeukaryotes have converged toward a coccoid form, particularly the photosynthetic ones, e.g. Potter et al. 1997) make their identification difficult and hinder diversity and eco-

logical studies. Today, fewer than 40 picoplanktonic species belonging to 10 algal classes have been described from environmental isolates. The classes Pelagophyceae (Andersen et al. 1993) and Bolidophyceae (Guillou et al. 1999a) have been erected based solely on picoplanktonic species, suggesting that this size class is a reservoir of new taxa. More than 50 yr after the first description of photosynthetic picoeukaryotes in coastal waters (Butcher 1952) and 20 yr after their importance in oceanic waters was established (Johnson & Sieburth 1979), we are still unable to determine the dominant taxonomic groups in the various oceanic environments.

The use of molecular tools is greatly improving our ability to explore natural picoplanktonic communities. Phylogenetic analyses based upon 18S rRNA gene sequences obtained from DNA extracted from natural

*E-mail: not@sb-roscoff.fr

samples permit culture-independent assessments of diversity and indicate that there is a considerable number of yet uncultured species in eukaryotic picoplankton communities (Lopez-Garcia et al. 2001, Moon-van der Staay et al. 2001). The enumeration of specific taxonomic groups and the estimation of their contribution to eukaryotic picoplankton, however, are more difficult. Photosynthetic pigments have been widely used to estimate the contribution of algal classes to total chlorophyll *a* (chl *a*) biomass (Latasa & Bidigare 1998). However, this method is limited for several reasons. First, it cannot resolve diversity below the class level. Second, it is based on the assumption that the relative cellular content of diagnostic pigments is constant for a given algal group. This assumption is invalid because pigment content varies between species, as well as within species. For a given strain, it is also affected by environmental conditions (e.g. Stolte et al. 2000).

Whole cell fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted nucleic acid probes has been used more and more extensively to detect bacteria (Amann 1995). This method, which combines identification with quantitative determination of cell number, has been successfully applied to complex bacteria communities such as biofilms (Brümmer et al. 2000), marine sediments (Llobet-Brossa et al. 1998) and soils (Ravenschlag et al. 2000). Fluorescent rRNA probes have not been used as widely for eukaryotic phytoplankton (Simon et al. 1995, Scholin et al. 1996). Attempts to use mono-labeled oligonucleotide probes for the study of photosynthetic picoplankton in marine waters have been unsuccessful (Simon et al. 1995) because signal intensity was too low to distinguish labeled cells from the auto-fluorescence of non-target cells and from background fluorescence. A number of signal amplification methods have been tested in recent years. Lim et al. (1993) combined a biotin-avidin system with rRNA probes and FISH to detect and quantify marine protists. Polyribonucleotide probes with multiple labels have been used to visualize and enumerate marine bacteria (Ludwig et al. 1994, DeLong et al. 1999). Schönhuber et al. (1997) described a hybridization method involving tyramide signal amplification (FISH-TSA). This technique appears very attractive since it increases fluorescence intensity 10 to 20 times over that of mono-labeled probes. Using horseradish peroxidase (HRP)-labeled probes and fluorescent tyramide as substrate for the enzyme, Schönhuber et al. (1999) and West et al. (2001) were able to use FISH for the detection and quantification of cyanobacteria both in cultures and in natural samples. In the present study, we adapted this method to eukaryotic picoplankton and we demonstrate its applicability to both cultured strains and natural communities.

MATERIALS AND METHODS

Cultures. Four uni-algal strains of nano- and pico-eukaryotes belonging to the Prasinophyceae, Pelagophyceae and Bolidophyceae were selected (Table 1). They were grown in Nalgene flasks at 20°C in K medium (Keller et al. 1987). For hybridization tests, cells were harvested during the mid-exponential phase. In order to estimate the detection limit of 1 target taxa among non-target cells, artificial mixtures were created from pure cultures of *Ostreococcus tauri* (Chrétiennot-Dinet et al. 1995) and *Bolidomonas pacifica* (Guillou et al. 1999a). Eighteen milliliters of each culture was harvested and fixed with 2 ml of 10% paraformaldehyde (PFA) for 1 h (1% PFA final concentration). Cell densities of fixed cultures were estimated using flow cytometry (Marie et al. 1999). Five mixtures of *B. pacifica* and *O. tauri* with 1, 5, 10, 20 and 50% of *B. pacifica* cells, respectively, were prepared. Ten milliliters of these mixtures was filtered onto 0.2 µm Anodisc filters (Whatman). Filters were dehydrated in an ethanol series (50, 80 and 100%, 3 min each) and stored at -80°C until further analysis.

Natural samples. Water samples were collected at 1 m depth, on 3 occasions (July 28, August 9 and August 24, 2000) off Roscoff, France (Stn ASTAN: 48°45' N; 4°00' W) in 5 l Niskin bottles. Water temperature at the time of collection was approximately 15°C. Samples were pre-filtered through 3 µm pore size Nuclepore filters (Whatman) and 180 ml of sea water was fixed with 20 ml of 10% PFA for 1 h. Exceeding this duration resulted in cell loss. Samples were then filtered onto Anodisc filters under 200 mm Hg pressure and dehydrated in an ethanol series (50, 80 and 100%, 3 min each), making sure that the filters never dried between filtrations. Filters were stored at -80°C until further analysis. For flow cytometry analyses, 1.5 ml of 3 µm pre-filtered water was fixed with 1% PFA and 0.1% glutaraldehyde (final concentrations), deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Flow cytometry. Total photosynthetic picoeukaryote cell counts were obtained by flow cytometry. Analyses were performed on fixed sea water samples with a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) following Marie et al. (1999). Photosynthetic picoeukaryotes were discriminated from cyanobacteria and enumerated using the Cytowin software (see www.sb-roscoff.fr/Phyto/cyto.html, Vaultot 1989).

Oligonucleotide probes. The probes used were chosen to encompass a range of picoplanktonic divisions and classes (Table 2). The theoretical specificity of the probes was checked on an rRNA database containing more than 14 000 sequences, using the probe match function of the ARB software (see www2.mikro.biologie.tu-muenchen.de/arb/). Oligonucleotide

Table 1. Origin and culture conditions of picoplankton strains tested. RCC: Roscoff Culture Collection

RCC number	Class	Species	Strain	Light ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Cell diameter (μm)	Origin
116	Prasinophyceae	<i>Ostreococcus tauri</i>	OTTH 0595	100	0.8	Thau Lagoon
261	Prasinophyceae	<i>Pseudocourfieldia marina</i>	TAK9801	40	4	Takapoto atoll
205	Bolidophyceae	<i>Bolidomonas pacifica</i>	OLI 31 SE3	100	1.5	Equatorial Pacific
100	Pelagophyceae	<i>Pelagomonas calceolata</i>	CCMP1214	4	2	North Pacific Central gyre

Table 2. Characteristics of oligonucleotide probes used in this study. The bold letters point to the single base change between the NCHLO01 and CHLO01 probes. MW: molecular weight; n: number of bases

Probe	Sequence (5' → 3')	n	%GC	MW (Da)	Target group	Source
EUK1209R	GGG CAT CAC AGA CCT G	16	62.5	5146	Eukaryote	Giovannoni et al. (1988)
NCHLO01	GCT CCA CTC CTG GTG GTC	18	66.7	5773	Non-Chlorophyta	Simon et al. (1995)
CHLO01	GCT CCA CGC CTG GTG GTC	18	62.5	5798	Chlorophyta	Simon et al. (1995)
CHLO02	CTT CGA GCC CCC AAC TTT	18	55	5661	Chlorophyta	Simon et al. (2000)
PRYM02	GGA ATA CGA GTG CCC CTG AC	20	60	6451	Haptophyta	Simon et al. (2000)
PELA01	ACG TCC TTG TTC GAC GCT	18	55	5732	Pelagophyceae	Simon et al. (2000)
BOLI02	TAC CTA GGT ACG CAA ACC	18	50	5743	Bolidophyceae	Guillou et al. (1999b)

probes were purchased with a 5' aminolink (C6) from Interactiva. The probes were then labeled with HRP (Roche Diagnostic Boehringer) according to Urdea et al. (1988) and Amann et al. (1992). CHLO02 was also purchased directly labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) at the 5' terminus and purified by HPLC (Genset) in order to compare the fluorescence intensity conferred by mono-labeled probes to that of HRP-labeled probes.

Fish. The protocol used for *in situ* hybridization with FITC mono-labeled probes was adapted from Amann et al. (1995). Our protocol for *in situ* hybridization with HRP-labeled probes, signal amplification and target cell detection is described by Biegala et al. (2002) and was adapted from Schönhuber et al. (1999). In both cases, dehydrated filter samples were thawed and cut into 12 equal pieces. The filter face that supports the cells was marked with a black pen.

In brief, for hybridization with FITC-labeled probes, filters were covered by 10 μl of 40% formamide hybridization buffer (40% deionized formamide, 0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.01% sodium dodecyl sulfate [SDS]) and 1 μl of oligonucleotide probes (stock at 50 ng μl^{-1}) and incubated at 46°C for 3 h. After 2 successive washing steps of 20 min at 46°C in a wash buffer (56 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.01% SDS, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5), the filters were dried before being mounted in antifading reagent (see below). For HRP-labeled probes, the hybridization step was slightly different and an additional signal amplification step was necessary. Ten percent (w:v) blocking reagent

(Roche Diagnostic Boehringer) was added to the hybridization buffer described above, and hybridization and washing steps were conducted at 35 and 37°C, respectively. Samples were then equilibrated in TNT buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, Tween 20) for 15 min at room temperature. TSA (Kit NEN Life Science Products) was performed for 30 min at room temperature in the dark in 10 μl of TSA mix (1:1 dextran sulfate and amplification diluent, 1:50 FITC tyramide with the mixture of dextran sulfate and amplification diluent). Filters were then transferred in 2 successive 5 ml TNT buffer baths at 55°C for 20 min each, in order to stop the enzymatic reaction and to remove dextran sulfate. Cells were briefly rinsed in 5 ml of distilled water and counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ during 7 min. Filters were finally rinsed in distilled water for 10 min and dried on a slide. Both the filters hybridized with mono-labeled probes and HRP-labeled probes were mounted in antifading reagent AF3 (Citifluor), and the coverslip was fixed to the slide with nail varnish to prevent evaporation of Citifluor. Slides could be stored in the dark at 4°C for 2 wk without significant loss of fluorescence.

Epifluorescence microscopy and image acquisition. The hybridized and DAPI-stained filters were observed with an Olympus BH-2 epifluorescence microscope (Olympus Optical) equipped with a mercury light source and a 40 \times UV fluorescence objective. Excitation/emission filters were 360/420 for DAPI and 490/515 for FITC. For each natural sample, cells in 10

randomly chosen microscopic fields were visually counted. For probes with a broad taxonomic specificity (e.g. EUK1209R), more than 2000 cells were counted. Images were acquired with an RT-Slider Spot cooled charge coupled device (CCD) digital camera (Diagnostic Instruments). For images of cells in culture, the exposure time and gain were constant for a given species. These values were determined by automatic exposure with the probe specific for the species (e.g. PELA01 for *Pelagomonas* sp.) and then used for the other probes. Images of natural samples were acquired using automatic exposure.

RESULTS

The EUK1209R probe was used in this study as a general eukaryotic probe. However, some species and entire clades such as the Rhodophyta division, as well as some Chlorophyta orders such as the Prasiolales and Dasycladales, which are all probably underrepresented in the picoplankton as suggested by environmental 18S rDNA clone libraries (Lopez-Garcia et al. 2001, Moon-van der Staay et al. 2001), are not targeted by this probe. The CHLO01 and NCHLO01 probes, which differ from each other by a single nucleotide, were initially designed to target the division Chlorophyta and all non-Chlorophyta algae, respectively (Simon et al. 1995). However, our current database search revealed that the CHLO01 probe does not recognize the Pseudoscourfieldiales and Pyramimonadales clades, nor the Prasiolales and Zygnematophyceae, all of which are members of the division Chlorophyta, and this probe cross-hybridizes to several taxa within the Cryptophyceae, Pavloales and Apicomplexa. Conversely, the NCHLO01 probe recognizes some Chlorophyta taxa such as the Pseudoscourfieldiales or the Pyramimonadales, but not the Rhodophyta, some Cryptophyceae, numerous Apicomplexa and even 1 *Chrysochromulina* clade within Haptophyta. When used in combination, and since they are complementary to each other, the CHLO01 and NCHLO01 probes target most eukaryotic sequences of the 18S rRNA gene database. The probe CHLO02, which was designed more recently (Simon et al. 2000), targets more Chlorophyta species than CHLO01 and has the advantage of not targeting any non-Chlorophyta taxa. The probes PRYM02, PELA01 and BOLI02 are specific for the division or the class they target (Haptophyta, Pelagophyceae, Bolidophyceae).

In order to test the specificity and the sensitivity of FISH-TSA for the detection and identification of picoplanktonic algae, we hybridized cultures of *Pseudoscourfieldia marina*, *Pelagomonas calceolata* and *Bolidomonas pacifica* with the 4 HRP-labeled

probes EUK1209R, CHLO01, PELA01 and BOLI02 (Fig. 1). Target species displayed a very bright fluorescence signal, while non-target species showed only a faint fluorescence. For a given probe, the fluorescence intensity of target species was 25 times higher than that of non-target species. Using DAPI counterstaining, we could verify that for a given probe, every target cell was labeled (see Fig. 1 for an example with *B. pacifica*). For all hybridizations, filter fluorescence background and cell auto-fluorescence were very weak and roughly equivalent to those of cells labeled with non-target probes. The signal conferred by HRP-labeled probes is much stronger than that by fluorescein mono-labeled oligonucleotides, as demonstrated for *P. marina* (Fig. 2), *B. pacifica* and *P. calceolata* (data not shown).

The aim of this study was not only to detect a given taxon within a complex community but also to estimate the abundance of the target organisms. As a first test, we analyzed artificial mixtures of 2 picoplanktonic species (*Bolidomonas pacifica* and *Ostreococcus tauri*). These cells were hybridized by FISH-TSA with the BOLI02 and CHLO01 probes (Table 2). Labeled cells were enumerated under epifluorescence microscopy. The fraction of cells hybridized with a given probe (e.g. BOLI02) corresponded very well with the theoretical fraction of cells belonging to the target taxon as determined by flow cytometry before mixing both species (Fig. 3). This was true for all mixtures including those where targeted cell numbers represented as little as 1% of the total population.

Given the improved sensitivity of this detection and identification system, the next step was to test it on complex communities from coastal sea waters. The picophytoplankton community in the English Channel, off Roscoff, includes *Synechococcus* sp. cyanobacteria and picoeukaryotes. In samples collected during the summer, photosynthetic picoeukaryote cell densities determined by flow cytometry ranged between 4293 and 5627 cell ml⁻¹ (Table 3). Using HRP-labeled probes and FISH-TSA combined with epifluorescence microscopy, we were able to detect and enumerate the cells belonging to every group targeted (Fig. 4). The fluorescence of labeled cells was very strong and background fluorescence was very low, as observed for cultures. The density of picoeukaryotic (both autotrophic and heterotrophic) cells hybridized by either the probe CHLO01 or the probe NCHLO01 ranged between 4234 and 5291 cell ml⁻¹ (Table 3). Comparatively, the density of cells labeled by the EUK1209R probes was slightly lower. The use of probes targeting lower taxonomic levels of primarily photosynthetic algae in the divisions Chlorophyta (probe CHLO02) and Haptophyta (probe PRYM02), and the classes Pelagophyceae (probe PELA01) and

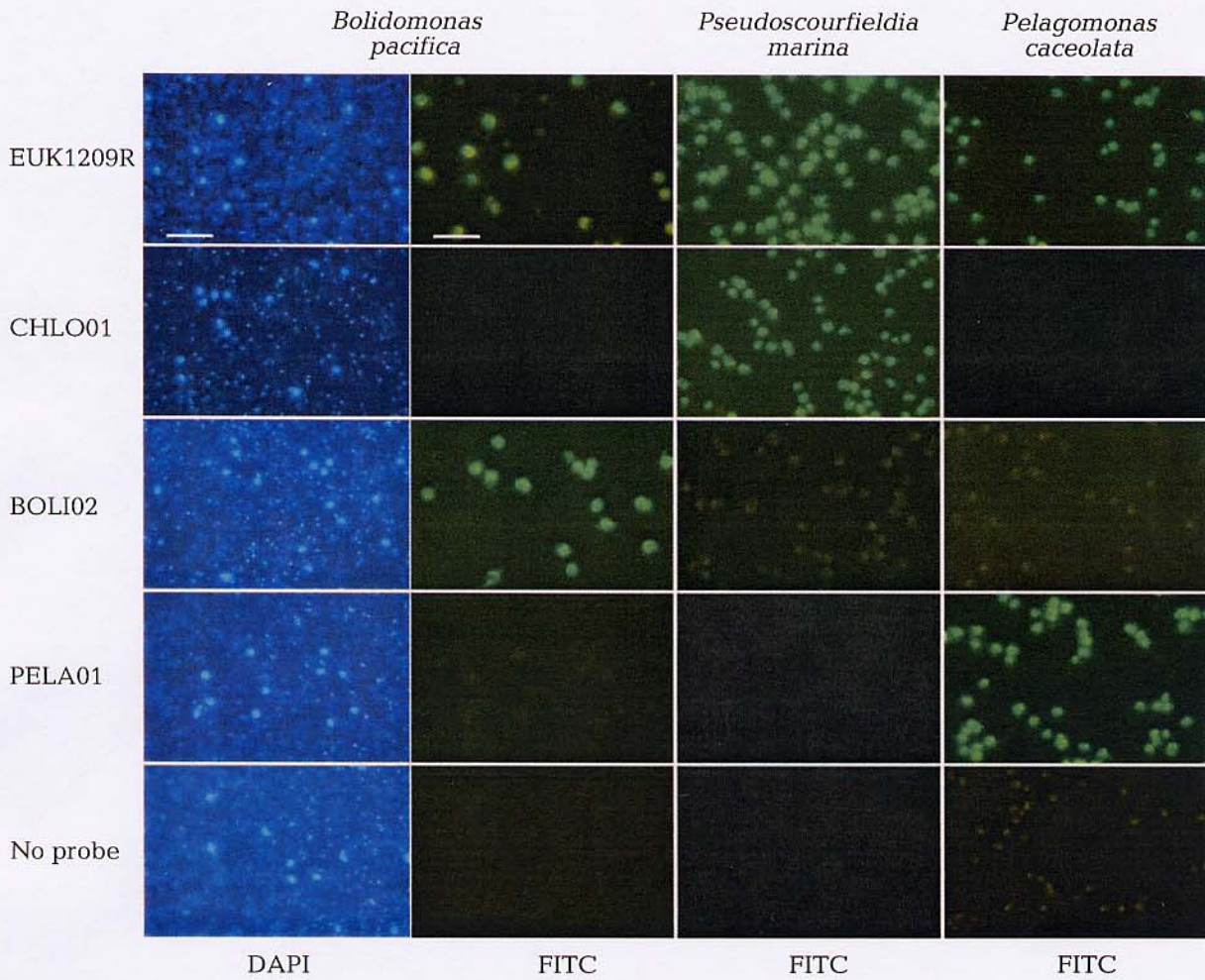


Fig. 1. Epifluorescence microscopy. Picoplanktonic isolates hybridized with taxa-specific probes. All samples were counter-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), but only results obtained for *Bolidomonas pacifica* are shown. Scale bar = 10 µm. FITC: fluorescein isothiocyanate

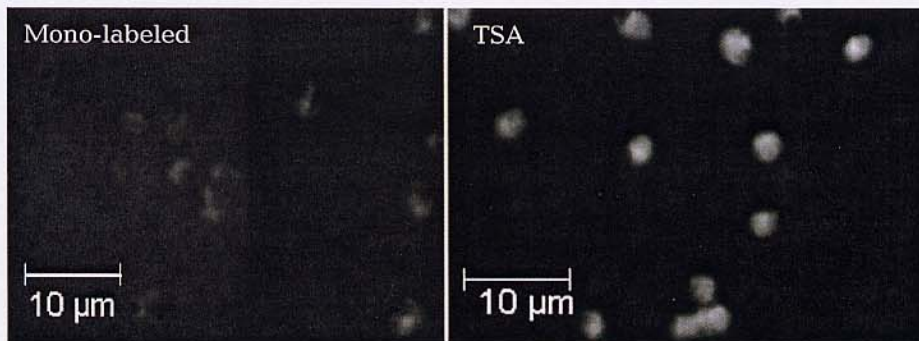


Fig. 2. Epifluorescence microscopy. *Pseudoscourfieldia marina* hybridized with the CHLO02 probe either mono-labeled (left) or horseradish peroxidase (HRP)-labeled (right) revealed by tyramide signal amplification (TSA). Exposure time for mono-labeled probe (left) was 17.5 times longer than for TSA (right)

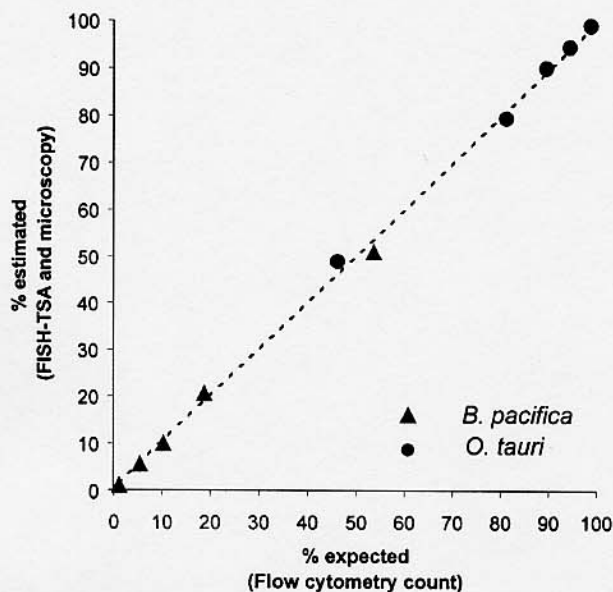


Fig. 3. Percentages of *Bolidomonas pacifica* and *Ostreococcus tauri* in an artificial mixture. Flow cytometry counts were obtained before mixing both species while microscopic counts were obtained from the mixed culture, after hybridization with the probes BOLI01 (specific for the genus *Bolidomonas*) and CHLO01 (specific for the Chlorophyta and targeting *Ostreococcus tauri*). The straight line corresponds to a 1:1 relationship. FISH: fluorescent *in situ* hybridization

Bolidophyceae (probe BOLI02) allowed the assessment of the contribution of specific groups. The CHLO02 probe targeted over 57% of the eukaryotes detected by the sum of CHLO01 + NCHLO01 (Table 3). In contrast, only a small fraction of cells were labeled by the class specific probes PRYM02, PELA01 and BOLI02 (Table 3).

DISCUSSION

The combination of HRP-labeled oligonucleotide probes and of the substrate fluorescein-tyramide has been used for the detection of cyanobacteria that possess strong background auto-fluorescence (Schönhuber et al. 1999, West et al. 2001). Intense and homogeneous fluorescence labeling of the target cells was achieved for these prokaryotic organisms provided that cells were permeabilized with lysozyme before hybridization. In the present study, this detection system (FISH-TSA) intensely labeled photosynthetic picoeukaryotic isolates (Fig. 1). TSA overcomes the problems linked to the low fluorescence levels from mono-labeled probes (Fig. 2). Target cells were easily detected and enumerated under epifluorescence microscopy provided that the following precautions were carefully observed. First, the fixation step should not exceed 1 h, beyond which there is significant cell loss (flow cytometry analyses of fresh vs PFA-fixed samples indicate 11, 30 and 45% of cells lost after 1, 5 and 24 h of fixation, respectively). The inadequacy of PFA to fix picoplankton cells has been recognized for quite a long time, and current protocols used for flow cytometry recommend the combined use of glutaraldehyde at 0.1% final concentration (Marie et al. 1999). However, the latter fixative is not compatible with FISH (Marie et al. 2000). Second, in order to achieve an intense labeling of all target cells, the filter must always remain wet during the filtration and dehydration steps.

Enzymatic permeabilization was not necessary to allow the penetration of the relatively large HRP molecule (molecular weight [MW] 40 000) into the picoeukaryote species tested. Indeed, the cell wall of these species either is lacking (*Bolidomonas pacifica*)

Table 3. Picoplankton abundance in natural samples determined either by flow cytometry or by fluorescent probes and epifluorescence microscopy. FISH-TSA: fluorescent *in situ* hybridization and tyramide signal amplification; dates given as dd/mm/yy

	24/07/00		09/08/00		24/08/00	
	Cell ml ⁻¹	% of CHLO01 + NCHLO01 ^a	Cell ml ⁻¹	% of CHLO01 + NCHLO01 ^a	Cell ml ⁻¹	% of CHLO01 + NCHLO01 ^a
Flow cytometry	5627		5472		4293	
FISH-TSA						
CHLO01 + NCHLO01 ^a	5291	100	5213	100	4234	100
EUK1209R	3673	69	3355	64	4187	99
CHLO01	2926	55	3203	61	2562	61
CHLO02	3899	74	4205	81	2400	57
NCHLO01	2365	45	2010	39	1672	39
PELA01	0	0	8	0.2	94	2
BOLI02	14	0.3	7	0.1	19	0.4
PRYM02	416	8	228	4	456	11

^aSum of the numbers of cells hybridized with CHLO01 and NCHLO01 probes

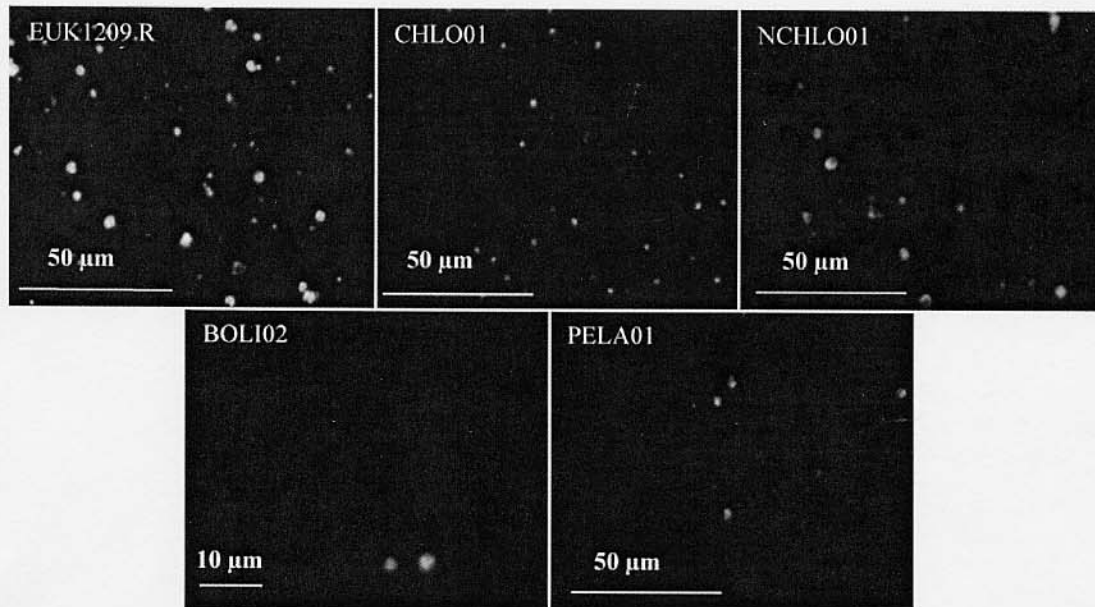


Fig. 4. Epifluorescence microscopy. Picoeukaryote sample from the English Channel in summer 2000. Cells were hybridized with the probes EUK1209R, CHLO01, NCHLO01, BOLI02 and PELA01

or consists of a very thin organic theca (*Pelagomonas calceolata*) or of organic scales (*Pseudoscurfieldia marina*). Yet, for cells with a thicker cell wall such as thecate dinoflagellates, Biegala et al. (2002) had no problem with HRP-labeled probe penetration. However, in the context of another study, we encountered some penetration problems with a few particular species such as *Pycnococcus provasolii* (unpubl.). Extensive tests would be necessary to validate this method on all phytoplankton cell types, and specific protocols will probably be needed for some species. Other parameters may reduce the fluorescence of target cells, in particular low rRNA content linked to low growth rate (Amann et al. 1995, Head et al. 1998). In our experiments, although phytoplankton cells hybridized in the stationary phase are not labeled as uniformly as in the exponential growth phase (data not shown), they are still easily detected. Under the conditions described above, the relative proportion of a target taxon in a mixture can be very accurately estimated (Fig. 3).

In our natural samples from the English Channel, the sum of cells targeted by the probes CHLO01 and NCHLO01, which are complementary to each other, was higher than the number of cells targeted by probe EUK1209R. Surprisingly, database matches revealed that EUK1209R targets more 18S sequences (3269) than the combination of CHLO01 + NCHLO01 (2305). However, the 18S database is not restricted to

picoplankton, and conversely many taxa from the picoplankton appear to correspond to novel lineages not yet represented in the databases (Lopez-Garcia et al. 2001, Moon-van der Staay et al. 2001). Therefore the combination of CHLO01 + NCHLO01 may, in reality, target more picoplankton species than EUK1209R. In addition, studies by Fuchs et al. (1998) on *in situ* accessibility of 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes suggest that the rRNA secondary structure could be more favorable for hybridization with the CHLO01 and NCHLO01 probes than with EUK1209R: CHLO01 + NCHLO01 and EUK1209R probes bind with regions of the rRNA molecule corresponding to Classes III and V, respectively, with Class I giving the brightest fluorescence and Class VI the lowest (Fuchs et al. 1998). Therefore some cells, although targeted by EUK1209R, could fluoresce very weakly and not be detected. One solution to circumvent this problem could be the use of helper probes that have been used to open inaccessible rRNA regions for FISH in bacteria and to increase the fluorescence signal (Fuchs et al. 2000). Our data therefore suggest that the combination of CHLO01 + NCHLO01 may be more adequate than EUK1209R to obtain total eukaryote counts in picoplankton samples.

The number of cells detected using either the probe EUK1209R or the combination of probes CHLO01 + NCHLO01 was, however, lower than the number of

photosynthetic cells detected by flow cytometry (Table 3). This latter estimate (at about 5000 cells ml^{-1}) fell into the range previously observed in the English Channel off Roscoff (1000 to 25 000 cells ml^{-1} over the year, Sournia & Birrien 1995, Vaultot & Marie unpubl.). This discrepancy is surprising since the probe EUK1209R and the combination of probes CHLO01 and NCHLO01 target both photosynthetic and non-photosynthetic eukaryotic taxa and therefore should provide higher cell numbers than flow cytometry. Several hypotheses can explain these results. One source of the discrepancy might be errors in counting. However, the standard deviation for microscopic counts was about 6% for the more general probes and therefore cannot explain this discrepancy. Second, heterotrophic cells may not contribute significantly to the picoplanktonic community. However, in general, heterotrophic taxa make up a sizable fraction of eukaryotic picoplankton (e.g. 18 to 38% in Andersen et al. 1996). Moreover, clone libraries established from Roscoff picoplanktonic samples yielded a large number of 18S rRNA sequences affiliated with heterotrophic taxa (K. R. Romari unpubl.). Third, some cells may be destroyed during fixation or during the treatments associated with FISH (ethanol series and detergents) and some taxa may be impermeable to the HRP-labeled probes (see above). Fourth, some picoeukaryote taxa present in abundance at the station sampled may not be labeled (or only weakly) by the probes used (see above). These last 2 reasons probably explain most of the discrepancy observed.

Among the cells recognized by the probes used on natural samples, those belonging to the division Chlorophyta dominated the coastal eukaryotic picoplankton in summer (2400 to 4205 cells ml^{-1} targeted by the probe CHLO02). This is in agreement with historical phytoplankton pigment data at this coastal site (Klein & Sournia 1987) and with more recent data showing the dominance of chl *b* in the <3 μm size fraction (M. L. Latasa unpubl.). In addition, this concurs with the large number of sequences attributed to members of the class Prasinophyceae (division Chlorophyta) retrieved from sea water samples in total extracted DNA (K. R. Romari unpubl.). Picoeukaryotic cells belonging to other groups targeted by the NCHLO01 probe are also abundant (1672 to 2365 cells ml^{-1}). Among these cells, the division Haptophyta is the most abundant group detected (4 to 11% of the sum of NCHLO01 + CHLO01 targeted cells). Only very few cells (<1%) were detected with the probe targeting the Pelagophyceae, assumed to be important in marine waters (Andersen et al. 1996). The presence of Bolidophyceae in coastal waters was unexpected since

members of this class have been isolated to date only from oligotrophic marine waters of the Pacific and the Mediterranean Sea (Guillou et al. 1999a,b). The 3 probes, PRYM02, PELA01 and BOLI02, used in this study targeted only 34% of non-Chlorophyta cells, suggesting that a large fraction of cells are composed of non-targeted groups such as the Chrysophyceae and the Cryptophyceae or of unknown organisms such as those from the new Alveolata and Stramenopile lineages identified in clone libraries (Lopez-Garcia et al. 2001, Moon-van der Staay et al. 2001).

If FISH-TSA appears to date as the most appropriate method to directly combine identification and quantification of cells from a complex picoplankton community, it is critical to increase considerably the number of available 18S rRNA sequences in databases. This will allow determination, *in silico*, of probe specificity, particularly for those probes that were designed some years ago when there were still a limited number of 18S rRNA sequences available (e.g. EUK1209R, CHLO01 and NCHLO01). Ideally, for general probes such as eukaryotic probes or probes targeting division taxa, the simultaneous use of 2 or 3 probes appears to be the best way to assess the abundance of the corresponding group in a natural sample (Amann & Ludwig 2000).

Phytoplankton ecology has relied heavily on approaches that were developed more than a decade ago, such as flow cytometry (Olson et al. 1985) or HPLC pigment analysis (Gieskes & Kraay 1983). Clearly, it should extensively adopt molecular approaches such as FISH or gene cloning that have proved to be useful for the study of the diversity and the role of oceanic bacteria (Giovannoni et al. 1990, Fuhrman et al. 1992, Béja et al. 2000). An additional advantage of these methods is that they also target heterotrophic eukaryotes for which, until now, it was only possible to estimate total abundance with stains such as DAPI or primulin. Indeed, virtually no information is available on the taxonomic composition of this compartment. The combination of FISH with techniques such as micro-autoradiography (Ouverney & Fuhrman 1999) should be very useful to understand more precisely the role of specific heterotrophic taxa in the microbial loop.

Acknowledgements. This work was funded by the following programs: PICODIV supported by the European Union (EVK3-CT-1999-00021), PICOMANCHE supported by the Région Bretagne and PROSOPE supported by PROOF (CNRS). F.N. was supported by a doctoral fellowship from the French Research Ministry. We thank the MYSIS crew for efficient assistance in the sampling and Florence Legall for assistance with phytoplankton cultures. We acknowledge constructive criticisms by anonymous reviewers.

LITERATURE CITED

- Amann RI (1995) *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. Molecular microbial ecology manual, Vol 3.3.6. Kluwer Academic, Dordrecht, p 1–15
- Amann RI, Ludwig W (2000) Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiol Rev 24:555–565
- Amann RI, Zarda B, Stahl DA, Schleifer KH (1992) Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol 58:3007–3011
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 59:143–169
- Andersen RA, Saunders GW, Paskind MP, Sexton J (1993) Ultrastructure and 18S rRNA gene sequence for *Pelagomonas calceolata* gen. and sp. nov. and the description of a new algal class, the Pelagophyceae *classis nov.* J Phycol 29:701–715
- Andersen RA, Bidigare RR, Keller MD, Latasa M (1996) A comparison of HPLC pigment signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the North Atlantic and Pacific Oceans. Deep Sea Res II 43: 517–537
- Béja O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT and 8 others (2000) Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. Science 289:1902–1906
- Biegala IC, Kennaway G, Alverca E, Lennon JF, Vault D, Simon N (2002) Identification of bacteria associated with dinoflagellates (*Alexandrium* spp.) using TSA-FISH (tyramide signal amplification-fluorescent *in situ* hybridization) and confocal microscopy. J Phycol 38:404–411
- Brümmer IHM, Fehr W, Wagner-Döbler I (2000) Biofilm community structure in polluted rivers: abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. Appl Environ Microbiol 66:3078–3082
- Butcher RW (1952) Contributions to our knowledge of the smaller marine algae. J Mar Biol Assoc UK 31:175–191
- Campbell L, Nolla HA, Vault D (1994) The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. Limnol Oceanogr 39:954–961
- Campbell L, Landry MR, Constantinou J, Nolla HA, Brown SL, Liu H (1998) Response of microbial community structure to environmental forcing in the Arabian Sea. Deep Sea Res II 45:2301–2325
- Chrétiennot-Dinet MJ, Courties C, Vaquer A, Neveux J, Claustre H, Lautier J, Machado MC (1995) A new marine picoeukaryote: *Ostreococcus tauri* gen and sp nov (Chlorophyta, Prasinophyceae). Phycologia 34:285–292
- Courties C, Vaquer A, Trousselier M, Lautier J, Chrétiennot-Dinet MJ, Neveux J, Machado C, Claustre H (1994) Smallest eukaryotic organism. Nature 370:255
- DeLong EF, Taylor LT, Marsh TL, Preston CM (1999) Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent *in situ* hybridization. Appl Environ Microbiol 65: 5554–5563
- Fuchs BM, Wallner G, Beisker W, Schwippl I, Ludwig W, Amann R (1998) Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol 64:4973–4982
- Fuchs BM, Glöckner FO, Wulf J, Amann R (2000) Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol 66:3603–3607
- Fuhrman JA, McCallum K, Davis AA (1992) Novel major archaeobacterial group from marine plankton. Nature 356: 148–149
- Gieskes WWC, Kraay GW (1983) Unknown chlorophyll a derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic Ocean revealed by HPLC analysis. Limnol Oceanogr 28: 757–766
- Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR (1988) Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. J Bacteriol 170:2418
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. Nature 345:60–63
- Guillou L, Chrétiennot-Dinet MJ, Medlin LK, Claustre H, Loiseauxde Goër S, Vault D (1999a) *Bolidomonas*: a new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta). J Phycol 35:368–381
- Guillou L, Moon-Van der Staay SY, Claustre H, Partensky F, Vault D (1999b) Diversity and abundance of Bolidophyceae (Heterokonta) in two oceanic regions. Appl Environ Microbiol 65:4528–4536
- Head IM, Saunders JR, Pickup RW (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microb Ecol 35: 1–21
- Johnson PW, Sieburth JM (1979) Chroococcoid cyanobacteria in the sea: a ubiquitous and diverse phototrophic biomass. Limnol Oceanogr 24:928–935
- Keller MD, Selvin RC, Claus W, Guillard RRL (1987) Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. J Phycol 23: 633–638
- Klein B, Sournia A (1987) A daily study of the diatom spring bloom at Roscoff (France) in 1985. II. Phytoplankton pigment composition studied by HPLC analysis. Mar Ecol Prog Ser 37:265–275
- Latasa M, Bidigare RR (1998) A comparison of phytoplankton populations of the Arabian Sea during the spring intermonsoon and southwest monsoon of 1995 as described by HPLC-analyzed pigments. Deep Sea Res II 45:2133–2170
- Li WKW (1994) Phytoplankton biomass and chlorophyll concentration across the North Atlantic. Sci Mar 58:67–79
- Li WKW, Platt T (1987) Photosynthetic picoplankton in the ocean. Sci Prog 71:117–132
- Lim E, Amaral LA, Caron DA, DeLong EF (1993) Application of rRNA-based probes for observing nanoplankton protist. Appl Environ Microbiol 59:1647–1655
- Lobet-Brossa E, Rossello-Mora R, Amann R (1998) Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. Appl Environ Microbiol 64:2691–2696
- Lopez-Garcia P, Rodriguez-Valera F, Pedros-Alio C, Moreira D (2001) Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. Nature 409:603–607
- Ludwig W, Dorn S, Springer N, Kirchhof G, Schleifer KH (1994) PCR-based preparation of 23S rRNA-targeted group-specific polynucleotide probes. Appl Environ Microbiol 60:3234–3244
- Marie D, Brussaard C, Partensky F, Vault D (1999) Flow cytometric analysis of phytoplankton, bacteria and viruses. In: Sons JW (ed) Current protocols in cytometry. International Society for Analytical Cytology, New York, p 11.11.1–11.11.15
- Marie D, Simon N, Guillou L, Partensky F, Vault D (2000) DNA, RNA analysis of phytoplankton by flow cytometry. In: Sons JW (ed) Current protocols in cytometry. International Society for Analytical Cytology, New York,

- p 11.12.1–11.12.18
- Moon-van der Staay SY, De Wachter R, Vaultot D (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* 409:607–610
- Olson RJ, Vaultot D, Chisholm SW (1985) Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. *Deep-Sea Res* 32:1273–1280
- Ouverney CC, Fuhrman JA (1999) Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types *in situ*. *Appl Environ Microbiol* 65:1746–1752
- Potter D, Lajeunesse TC, Saunders GW, Andersen RA (1997) Convergent evolution masks extensive biodiversity among marine coccoid picoplankton. *Biodivers Conserv* 6:99–107
- Ravenschlag K, Sahn K, Knoblauch C, Jorgensen BB, Amann R (2000) Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments. *Appl Environ Microbiol* 66:3592–3602
- Scholin CA, Buck KR, Britschgi T, Cangelosi G, Chavez FP (1996) Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats. *Phycologia* 35:190–197
- Schönhuber W, Fuchs B, Juretschko S, Amann R (1997) Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl Environ Microbiol* 63:3268–3273
- Schönhuber W, Zarda B, Eix S, Rippka R, Herdman M, Ludwig W, Amann R (1999) *In situ* identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 65:1259–1267
- Simon N, Lebot N, Marie D, Partensky F, Vaultot D (1995) Fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 61:2506–2513
- Simon N, Campbell L, Ornlófsdóttir E, Groben R, Guillou L, Lange M, Medlin LK (2000) Oligonucleotide probes for the identification of three algal groups by dot blot and fluorescent whole-cell hybridization. *J Eukaryot Microbiol* 47:76–84
- Sournia A, Birrien JL (1995) La série océanographique côtière de Roscoff (Manche occidentale) de 1985 à 1992. *Cah Biol Mar* 36:1–8
- Stolte W, Kraay GW, Noordeloos AAM, Riegman R (2000) Genetic and physiological variation in pigment composition of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) and the potential use of its pigment ratios as a quantitative physiological marker. *J Phycol* 36:529–539
- Urdea MS, Warner BD, Running JA, Stempien M, Clyne J, Horn T (1988) A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent, and enzyme labeled oligodeoxyribonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 16:4937–4956
- Vaultot D (1989) CYTOPC: processing software for flow cytometric data. *Signal Noise* 2:8
- West NJ, Schönhuber WA, Fuller N, Amann RI, Rippka R, Post A, Scanlan DJ (2001) Closely related *Prochlorococcus* genotypes show remarkably different depth distributions in two oceanic regions as revealed by *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 147:1731–1744

Editorial responsibility: David Caron,
Los Angeles, California, USA

Submitted: August 24, 2001; Accepted: March 7, 2002
Proofs received from author(s): May 24, 2002

CHAPITRE III

Micromonas pusilla (Prasinophyceae), domine le picoplancton eucaryote en Manche occidentale

F. Not, M. Latasa, D. Marie, T. Cariou, D. Vaultot and N. Simon (sous presse) A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the Western English Channel. **Applied and Environmental Microbiology**

III-1 RESUME EN FRANÇAIS

La classe des Prasinophyceae (Chlorophyta) contient de nombreuses espèces de picoeucaryotes photosynthétiques décrits à partir d'isolats obtenus en culture. Cependant, l'écologie de ces organismes ainsi que leur contribution à la communauté de picoeucaryotes dans les écosystèmes aquatiques ont été très peu étudiées. Nous avons mis au point huit nouvelles sondes oligonucléotidiques ciblant l'ARNr 18S, spécifiques de différents clades, genres et espèces de Prasinophyceae. Nous les avons ensuite testées sur des cultures pures. Ces sondes ainsi que d'autres plus générales ont été utilisées pour étudier par FISH-TSA la diversité du picoplancton dans des échantillons prélevés toutes les deux semaines entre juillet 2000 et septembre 2001 en un site côtier au large de Roscoff (France). L'abondance du picoplancton eucaryote montre un cycle saisonnier marqué avec un maximum en été. Le picoplancton eucaryote est dominé tout au long de l'année par les Chlorophyta et plus précisément par l'espèce *Micromonas pusilla*. L'ordre des Prasinococcales et l'espèce *Bathycoccus prasinus* (Mamiellales) apparaissent sporadiquement alors que l'abondance des autres groupes de Prasinophyceae recherchés est négligeable.

**A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae),
dominates the eukaryotic picoplankton in the Western
English Channel**

**Fabrice Not^{1*}, Mikel Latasa², Dominique Marie¹, Thierry Cariou¹, Daniel
Vaulot¹ and Nathalie Simon¹.**

¹ Station Biologique, UMR7127 CNRS, INSU et Université Pierre et Marie Curie, Place
George Teissier, 29680 Roscoff, France.

² Institut de Ciències del Mar (C.S.I.C.), Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003
Barcelona, Spain.

*Corresponding author. Mailing address: Station Biologique, UMR 7127, CNRS et Université
Pierre et Marie Curie, Place George Teissier. BP74 29682 Roscoff cedex, France. Phone 33 2-
98-29-23-70. Fax 33 2-98-29-23-24. E-mail : not@sb-roscoff.fr

Running title: Prasinophycean picoeukaryotes in the English Channel.

Applied and Environmental Microbiology: In press

ABSTRACT:

The class Prasinophyceae (Chlorophyta) contains several photosynthetic picoeukaryotic species described from cultured isolates. The ecology of these organisms and their contribution to the picoeukaryotic community in aquatic ecosystems has received little consideration. We have designed and tested eight new oligonucleotide 18S rDNA probes specific for different Prasinophyceae clades, genera, and species. Using fluorescent *in situ* hybridization associated with tyramide signal amplification (FISH-TSA), these probes along with more general probes have been applied to samples from a marine coastal site off Roscoff (France) collected every two weeks between July 2000 and September 2001. The abundance of eukaryotic picoplankton remained high ($> 10^3$ cells.ml⁻¹) along the sampling period with maxima in summer (up to 2×10^4 cells.ml⁻¹), and a single green algal species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) dominated the community all year round. Members of the order Prasinococcales and the species *Bathycoccus prasinus* (Mamiellales) displayed sporadic occurrences, while the abundance of all other Prasinophyceae groups targeted remained negligible.

KEY WORDS: Oligonucleotide probes · FISH-TSA · Picoeukaryotes · Picoplankton · Prasinophyceae · *Micromonas* · Coastal ecosystems

INTRODUCTION

Several studies have demonstrated the importance of eukaryotic picoplankton (0.2-3 μm) in terms of biomass and productivity in the euphotic zone of oceanic oligotrophic waters (Li 1994b) as well as in coastal waters (Joint et al. 1986). To date, only about 40 species belonging to 9 algal classes (Chlorophyceae, Prasinophyceae, Trebouxiophyceae, Prymnesiophyceae, Bolidophyceae, Eustigmatophyceae, Pinguiphyceae, Bacillariophyceae and Pelagophyceae) of photosynthetic picoplanktonic eukaryotes have been formerly described (Vaulot et al. 2004). However, phylogenetic analyses of sequences retrieved from natural samples in different oceanic regions have demonstrated much higher diversity since many of these sequences do not correspond to any described taxa (Moon-van der Staay et al. 2001). The contribution of the different taxonomic groups to the picoplanktonic biomass, diversity and ecology is poorly known because simple and reliable methods to detect and quantify such organisms in natural samples are lacking. Pigment signatures, scanning electron microscopy and serial dilution cultures suggest that the classes Prasinophyceae (division Chlorophyta), Pelagophyceae (division Heterokontophyta) and Prymnesiophyceae are major components of the picoplankton biomass in different marine systems (Thomsen & Buck 1998, Moon-van der Staay et al. 2000).

Among these, the class Prasinophyceae contains several photosynthetic picoeukaryote species. This class is considered to be the most primitive from the green lineage and to have given rise to all other green algal classes as well as to the land plants (Sym & Pienaar 1993). They are known to be common in temperate and cold regions and can occur as prominent constituents of marine picoplankton (Thronsen 1976). Within these organisms, genera such as *Ostreococcus*, *Bathycoccus*, and *Micromonas* have been described from coastal waters (Eikrem & Thronsen 1990, Courties et al. 1994). *Micromonas pusilla* (the only described species in the genus *Micromonas*) has been identified as a major component of the picoplanktonic community in several oceanic and coastal regions such as the Mediterranean Sea (Thronsen & Zingone 1994), the Norwegian Sea (Thronsen 1969) or the central California waters (Thomsen & Buck 1998). However, the techniques used to establish these facts (microscopic identification of cells presenting few morphological characters or serial dilution cultures) are time consuming and incompatible with extensive ecological studies. In consequence, the precise distribution and the seasonal dynamics of an apparently very common picoplanktoner such as *M. pusilla* are poorly known.

Table III-1: Origin and culture conditions of picoplankton strains

RCC* number	Genus	Species	Strain	Light $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	Cell diameter (μm)	Origin
116	<i>Ostreococcus</i>	<i>tauri</i>	OTTH 0595	100	0.8	Thau Lagoon
143	<i>Ostreococcus</i>	sp.	EUM 13BBL	100	0.8	Tropical Atlantic Ocean
141	<i>Ostreococcus</i>	sp.	EUM 16BBL	100	0.8	Tropical Atlantic Ocean
114	<i>Micromonas</i>	<i>pusilla</i>	CCMP** 490	100	2	North Atlantic
299	<i>Micromonas</i>	<i>pusilla</i>	NOUM 17	100	2	Equatorial Pacific
372	<i>Micromonas</i>	<i>pusilla</i>	Naples	100	2	Gulf of Naples
373	<i>Micromonas</i>	<i>pusilla</i>	Skagerrak	100	2	Skagerrak
417	<i>Mantoniella</i>	<i>squamata</i>	CCMP 480	100	3-5	North Sea
113	<i>Bathycoccus</i>	<i>prasinus</i>	CCMP 1898	100	2	Mediterranean Sea
369	Cocoid		CCMP 1205	100	2-6	Sargasso Sea
287	Cocoid		NOUM 15	100	2.5	Equatorial Pacific Ocean
261	<i>Pseudoscurfieldia</i>	<i>marina</i>	TAK 9801	40	4	Takapoto Atoll (Pacific Ocean)
370	<i>Pycnococcus</i>	<i>provasolii</i>	CCMP 1203	100	2-4	North Atlantic
135	<i>Pycnococcus</i>	<i>provasolii</i>	CCMP 1199	100	2-4	Gulf of Mexico
251	<i>Pycnococcus</i>	sp.	ROS 9401	100	2	English Channel
253	<i>Pycnococcus</i>	sp.	ROS 9404	100	2	English Channel
136	<i>Prasinococcus</i>	<i>capsulatus</i>	CCMP 1407	100	3-6	Sargasso Sea
134	<i>Prasinococcus</i>	sp.	CCMP 1194	100	3-5	Gulf of Mexico
137	<i>Prasinoderma</i>	sp.	CCMP 1220	100	3-8	Gulf of Mexico

* Roscoff Culture Collection (<http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC/>)

** CCMP (Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton, West Boothbay Harbour, Maine, <http://ccmp.bigelow.org/>)

The aim of this work was to identify and study the seasonal variations of the dominating taxa in the picoeukaryote community at a coastal site of the western English Channel in the vicinity of a long-term oceanographic observation site (Sournia & Birrien 1995). Oligonucleotide probes targeting 18S rRNA coupled to TSA-FISH were used to detect the picoplanktonic taxa (Chapitre II). Eight new oligonucleotide probes specific for Prasinophyceae were designed and validated on pure cultures. These probes as well as more general probes, targeting the Chlorobionta and the eukaryotes, allowed studying in detail the dynamics of the dominating taxa along a seasonal time series between July 2000 and September 2001.

MATERIALS AND METHODS

Cultures. Nineteen uni-algal strains of picoeukaryotes belonging to different phylogenetic clades of the Prasinophyceae were selected (Table 1). They were grown in Nalgene flasks (Nalgene Co., Rochester, New-York) at 20°C in K medium (Keller et al. 1987). In order to test the new probes designed in this study, cells were harvested during the mid-exponential growth phase. For each culture, 4.5 ml were harvested and fixed with paraformaldehyde (1 % final concentration) for one hour. These cultures were filtered onto 0.2 µm pore-sized Anodisc filters (Whatman international Ltd, Maidstone, England). Filters were dehydrated in an ethanol series (50, 80, 100 %, 3 min each) and stored at -80°C until further hybridization tests.

Natural samples. Natural samples were collected twice a month between July 2000 and September 2001 at 0.5 meter depth with 5 L Niskin bottles, off Roscoff, France at the station ASTAN (48°46' N, 3°57' W). Water was pre-filtered through a 200 µm mesh and further processed in the laboratory. Temperature, salinity, and concentrations of phosphate, nitrate and ammonium were measured by standard oceanographic methods.

For fluorescent whole-cell hybridization (FISH), 90 ml of sea water were pre-filtered through 3 µm pore size Nuclepore filters (Whatman international Ltd, Maidstone, England) and fixed with 10 ml of 10 % paraformaldehyde for one hour. Samples were then filtered onto 0.2 µm Anodisc filters under a maximum of 200 mm Hg pressure and dehydrated in an ethanol series (50, 80, 100 %, 3 min each). Filters were stored at -80°C.

Table III-2: Novel oligonucleotide probes targeting prasinophycean taxa.

probe name	Sequence	Target group	Position 16S rRNA <i>E.coli</i>	Closest sequence not targeted	
				Taxonomy	Number of mismatches
PRAS01	5' -ACG GTC CCG AAG GGT TGG-3'	Pseudoscourfieldiales Clade V	193	<i>Tilletia caries</i>	2
PRAS03	5' -GCC ACC AGT GCA CAC CGG-3'	Prasinococcales	620	<i>Friedmannia israeliensis</i>	2
PRAS04	5' -CGT AAG CCC GCT TTG AAC-3'	Mamiellales (except the genus <i>Dolichomatix</i>)	651	<i>Choricystis minor</i>	1
PRAS05	5' -GCC AGA ACC ACG TCC TCG-3'	Clade VIIA, RCC 287, CCMP 1205	651	<i>Pyramimonas olivacea</i>	3
PRAS06	5' -AAT CAA GAC GGA GCG CGT-3'	Environmental clade VIIB	651	<i>Scutopus ventrolineatus</i>	3
MICRO01	5' -AAT GGA ACA CCG CCG GCG-3'	<i>Micromonas pusilla</i>	211	<i>Ostreococcus tauri</i>	1
BATHY01	5' -ACT CCA TGT CTC AGC GTT-3'	<i>Bathycoccus prasinos</i>	651	Uncultivated bacteria	3
OSTREO01	5' -CCT CCT CAC CAG GAA GCU-3'	<i>Ostreococcus</i>	647	<i>Corynebacterium genitalium</i>	3

For flow cytometry analyses, 1.5 ml of 3 µm pre-filtered samples was fixed with a mixture of 1 % PFA and 0.1 % glutaraldehyde (final concentrations), then deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

For HPLC pigment measurements, the < 200 µm sea water fraction (1 L) was collected onto a GF/F filter (Whatman international Ltd, Maidstone, England). The 3-200 µm fraction was collected onto a 3 µm pore size Nuclepore filter. Finally the < 3 µm fraction was collected onto a GF/F filter. Filtrations were conducted under a pressure of 200 mmHg and all filters were immediately deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Flow cytometry. Total photosynthetic cells counts were obtained from fixed sea water samples using a FACSort flow cytometer (Becton Dickinson, San José, California), as described previously (Marie et al. 1999). Photosynthetic picoeukaryotes were discriminated from cyanobacteria using the Cytowin software available from <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/cyto.html>.

HPLC. Pigment analyses were performed using the method of Zapata et al. (Zapata et al. 2000) with minor modifications as described in Latasa et al. (Latasa et al. 2001). The contribution of different algal groups to the total chlorophyll *a* (Chl *a*) was estimated using CHEMTAX (Mackey et al. 1996). While the contribution of the Mamiellales, Prasinococcales and Pseudoscourfieldiales which possess prasinoxanthin could be computed, that of the other clades (prasinoxanthin-less Prasinophyceae) cannot be distinguished from other Chlorophyta.

TSA-FISH. *In situ* hybridization with HRP labeled probes, signal amplification and target cells detection was performed as described previously in Not et al. 2002 (Chapitre II). The only difference was the use of a more viscous antifading reagent, AF1 (Citifluor Ltd, London) instead of AF3, in order to preserved the hybridized slides longer (up to 2 weeks, in the dark at 4°C) without significant loss of fluorescence.

Epifluorescence microscopy and image acquisition. The cells hybridized were observed with an Olympus BX 51 epifluorescence microscope (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) equipped with a mercury light source and an x100 UVFL objective. Excitation/emission filters were 360/420 for DAPI and 490/515 for FITC. For each sample, 10 randomly chosen microscopic fields were counted by eye. For probes with a broad taxonomic specificity (e.g. CHLO02) more than 500 cells were counted. Because of the large number of hybridizations and the time required for each analysis, it was not possible to count replicates for each sample. However, for 33 samples, three replicates (i.e. three hybridizations

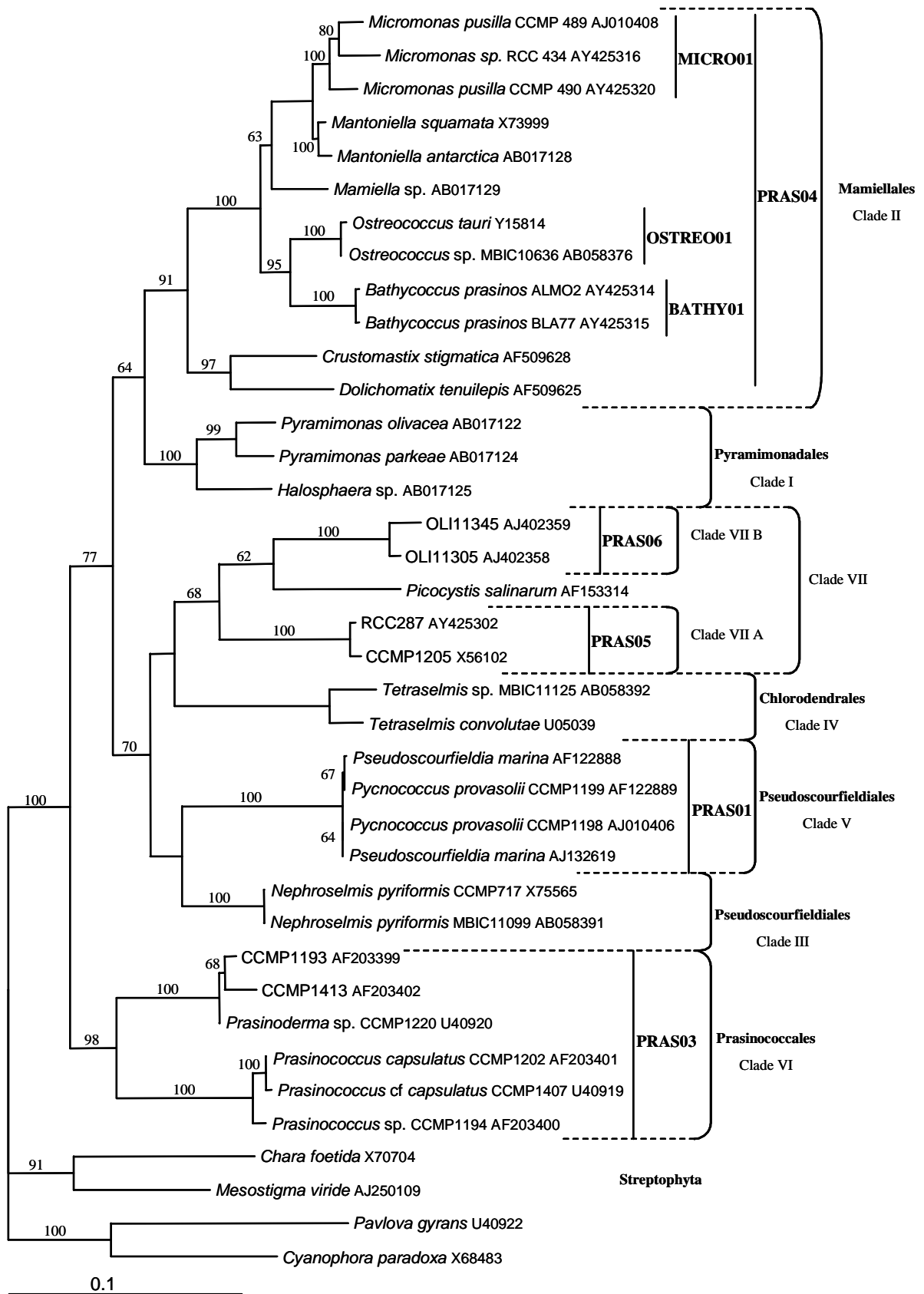


Figure III-1: Phylogenetic tree of the Prasinophyceae obtained by the neighbor joining method based on the analyses of complete 18S rRNA gene sequences. The specificity of the different probes designed in this study is presented. Clades were named according to Guillou et al. (2004)

with the same probe on three different filters) were analyzed and the average error was 15 % (range 2-38 %).

Design of 18S rRNA oligonucleotide probes. The oligonucleotide probes (Table 2) were designed with the ARB software (Ludwig et al. 2004) using a SSU (small subunit) rRNA database containing more than 30,000 complete and partial sequences. In addition to published sequences, our database also contained unpublished partial eukaryote sequences retrieved from three coastal sites. Although the probes could have been designed based only on the public sequences the additional sequences allowed to confirm that targeted regions were conserved on the corresponding sites of coastal representatives of taxa belonging to the clades targeted. When designing the probes with the ARB Probe Design function, care was taken to maximize the number of mismatches to non-target sequences and to position these mismatches near the center of the probe. The theoretical specificity of the new probes was checked using the Probe Match function of the ARB software. Oligonucleotide probes were purchased with a 5' aminolink (C6) from MWG (Courtaboeuf, France). The probes were then labeled with HRP (Roche Diagnostic Boehringer, Meylan, France) as described (Urdea et al. 1988). Optimal formamide concentration was determined empirically to be 40 % in the hybridization buffer and specificity tests of the new probes were performed at this concentration. These probes are available in the rRNA probes database for protists and cyanobacteria (http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/Databases/RNA_probes_introduction.php). Because probes with broad taxonomic specificity usually do not work equally well for all targeted organisms, the three probes EUK1209R, CHLO01 and NCHLO01 were used in combination to estimate all eukaryotes (Chapitre II). Finally probe CHLO02 specific for the sub-regnum Chlorobionta (Chlorophyta and Streptophyta) was applied (Simon et al. 2000). To our knowledge, the division Streptophyta has no representative in the pelagic marine systems. Consequently in the following, cells labeled by the probe CHLO02 were considered to belong to the division Chlorophyta.

Tree construction. PAUP* V4.0 Beta 10 (Swofford 2002) was used to perform phylogenetic analyses of complete 18S rRNA sequences using neighbor joining methods. *Cyanophora paradoxa*, *Pavlova gyrans*, *Mesostigma viride*, *Chara foetida* were included in the analyses as outgroup, and the tree was rooted with *Cyanophora paradoxa*. Bootstrapping (1,000 replicates) allowed evaluation of tree significance. Trees were drawn using TreeView (Roderic Page, University of Glasgow).

Table III-3: Specificity tests of the oligonucleotide probes for the Prasinophyceae order level clades. The gray background indicates the theoretical specificity while + and – indicate the results of *in situ* hybridization tests. The signs (+, - and +/-) indicate respectively a bright fluorescent signal, no detectable fluorescent signal and a weak fluorescent signal.

Species	RCC Number	PRAS01	PRAS03	PRAS04	PRAS05	PRAS06	CHLO02
<i>Micromonas pusilla</i>	114	-	-	+	-	-	+
<i>Ostreococcus tauri</i>	116	-	-	+	-	-	+
<i>Mantoniella squamata</i>	417	-	-	+	-	-	+
<i>Bathycoccus prasinos</i>	113	-	-	+	-	-	+
Cocoid strain	369	-	-	-	+/-	-	+/-
Cocoid strain	287	-	-	-	+/-	-	+/-
<i>Pseudoscourfieldia marina</i>	261	+	-	-	-	-	+
<i>Pycnococcus provasolii</i>	135	-	-	-	-	-	-
<i>Pycnococcus</i> sp.	253	+	-	-	-	-	+
<i>Prasinoderma</i> sp.	137	-	+/-	-	-	-	+/-
<i>Prasinococcus</i> sp.	134	-	+	-	-	-	+
<i>Prasinococcus capsulatus</i>	136	-	+	-	-	-	+

RESULTS

Design and specificity tests of 18S rDNA probes targeting Prasinophyceae. No unique character exists that unites all Prasinophyceae taxa to the exclusion of other Viridiplantae or members of other algal phyla (Sym & Pienaar 1993). This is also supported by molecular phylogenies which show the paraphyletic structure of the class Prasinophyceae (Nakayama et al. 1998). Therefore it is not possible to determine a single probe targeting all Prasinophyceae species. Based on comparative 18S rRNA sequence analyses, we designed eight oligonucleotide probes (Fig. 1). The probes PRAS01, PRAS03, PRAS04, PRAS05, PRAS06 are specific respectively for the orders Pseudoscourfieldiales (clade V only), Prasinococcales (clade VI) and Mamiellales (Clade II, with the exception of *Dolichomastix*), clade VIIA containing the coccoid strain CCMP1205 and clade VIIB composed of sequences retrieved from the Pacific Ocean. The probes OSTREO01, BATHY01 and MICRO01 are specific for the genus *Ostreococcus*, and the species *B. prasinus* and *M. pusilla*, respectively (Table 2).

The specificity of the newly designed probes was evaluated by whole-cell hybridization of well characterized reference strains (Table 3). Among the probes targeting Prasinophyceae orders and clades (PRAS01 to 06), only PRAS04 hybridized all and only target strains. Since no isolate of the clade VIIB has been established in culture to date, positive controls could not be performed for PRAS06, but this probe did not show any non-specific labeling with the strains tested. PRAS01, PRAS03 and PRAS05 hybridized only target strains, but not all of them (Table 3). We encountered two different problems. First, PRAS01 conferred a good fluorescence signal when hybridized with the two strains RCC 261 (*Pseudoscourfieldia marina*) and RCC 253 (*Pycnococcus* sp.), but no signal was observed with the strain RCC 135 (*Pycnococcus provasolii*). Second, RCC 369 (CCMP1205) and RCC 287 targeted by PRAS05 and *Prasinoderma* strain RCC 137 targeted by PRAS03 presented a heterogeneous signal after hybridization: only about 50 % of the cells showed a positive signal. The problem encountered with these probes was also observed with the general Chlorophyta probe CHLO02 on the same strains. The three genera and species-specific probes (OSTREO01, BATHY01 and MICRO01) labeled all and only the taxa for which they were designed (Table 4).

Table III-4: Specificity of the oligonucleotide probes for the Mamiellales genera and species.

Legend as in Table 3.

Species	RCC Number	BATHY01	OSTREO01	MICRO01
<i>Ostreococcus tauri</i>	RCC 116	-	+	-
<i>Ostreococcus</i> sp.	RCC 143	-	+	-
<i>Ostreococcus</i> sp.	RCC 141	-	+	-
<i>Bathycoccus prasinos</i>	RCC 113	+	-	-
<i>Micromonas pusilla</i>	RCC 114	-	-	+
<i>Micromonas pusilla</i>	RCC 299	-	-	+
<i>Micromonas pusilla</i>	RCC 373	-	-	+
<i>Micromonas pusilla</i>	RCC 372	-	-	+

Hydrological conditions at ASTAN station. Due to the strong tidal mixing, the coastal waters off Roscoff are permanently mixed all year round (Sournia et al. 1987). During the sampling period, the temperature varied between 10.2°C (March 2001) and 16.6°C (August 2001). Nitrate and phosphate concentrations followed a similar pattern of variation with minima in summer (0.4 µM and 0.10 µM respectively) and maxima in late fall and winter (15.3 µM and 0.66 µM respectively, Fig. 2).

Photosynthetic pigments. During the period studied, Chl *a* concentrations in the 0.2-200 µm fraction (total phytoplankton) varied according to the classical pattern observed in this area with minima in winter (0.2 µg.L⁻¹) and maxima in summer (2.5 µg.L⁻¹) corresponding to the diatom bloom (Sournia et al. 1987). The bloom occurred in late June in 2001 (Fig. 3A). Maximum concentrations of picoplanktonic Chl *a* occurred later, at the end of July (753 ng.L⁻¹). Large phytoplankton (> 3 µm) and picoplankton (< 3 µm) contributed approximately equally to Chl *a* biomass in non-bloom conditions. During bloom periods, (July 2000 and July 2001) large phytoplankton dominated total Chl *a* biomass. Overall picophytoplankton made up 34 % of the total Chl *a* throughout the study period.

Within the picoplanktonic Chl *a* fraction, the contribution of the division Chlorophyta was almost always above 25 % (45 % on average, Fig. 3B) except at the end of May, when it plummeted below 10 %, although picoplanktonic Chl *a* decreased only slightly (Fig. 3A). Within the Chlorophyta, the contribution of the Mamiellales, Prasinococcales and some of the Pseudoscourfieldiales (containing prasinoxanthin) to picoplanktonic Chl *a* estimated by CHEMTAX was significant all year round and largely dominant (> 80 % and up to 100 %) during spring and summer 2001.

Overall composition of the picoeukaryotic community. The abundance of the photosynthetic picoeukaryotes determined by flow cytometry varied between 10³ and 2x10⁴ cell.ml⁻¹. Maximum abundances were recorded in May and July 2001 (Fig. 4A). The abundance of picoeukaryotic cells detected by epifluorescence microscopy after *in situ* hybridization with a combination of the probes EUK1209R+CHLO01+NCHLO01 varied between 1.3x10³ cell.ml⁻¹ and 1.35x10⁴ cell.ml⁻¹ (Fig. 4A). Cells belonging to the division Chlorophyta (targeted by CHLO02) dominated the picoeukaryotic community all year long (10³ to 1.5x10⁴ cell.ml⁻¹, 85 % on average of the total number of picoeukaryotes, Fig. 4A).

Within Chlorophyta, organisms belonging to the order Mamiellales (Prasinophyceae) targeted by the probe PRAS04 dominated all year round (Fig. 4B). Within the Mamiellales, *M. pusilla* was the dominant species during the sampling period (75 % of the cells detected by

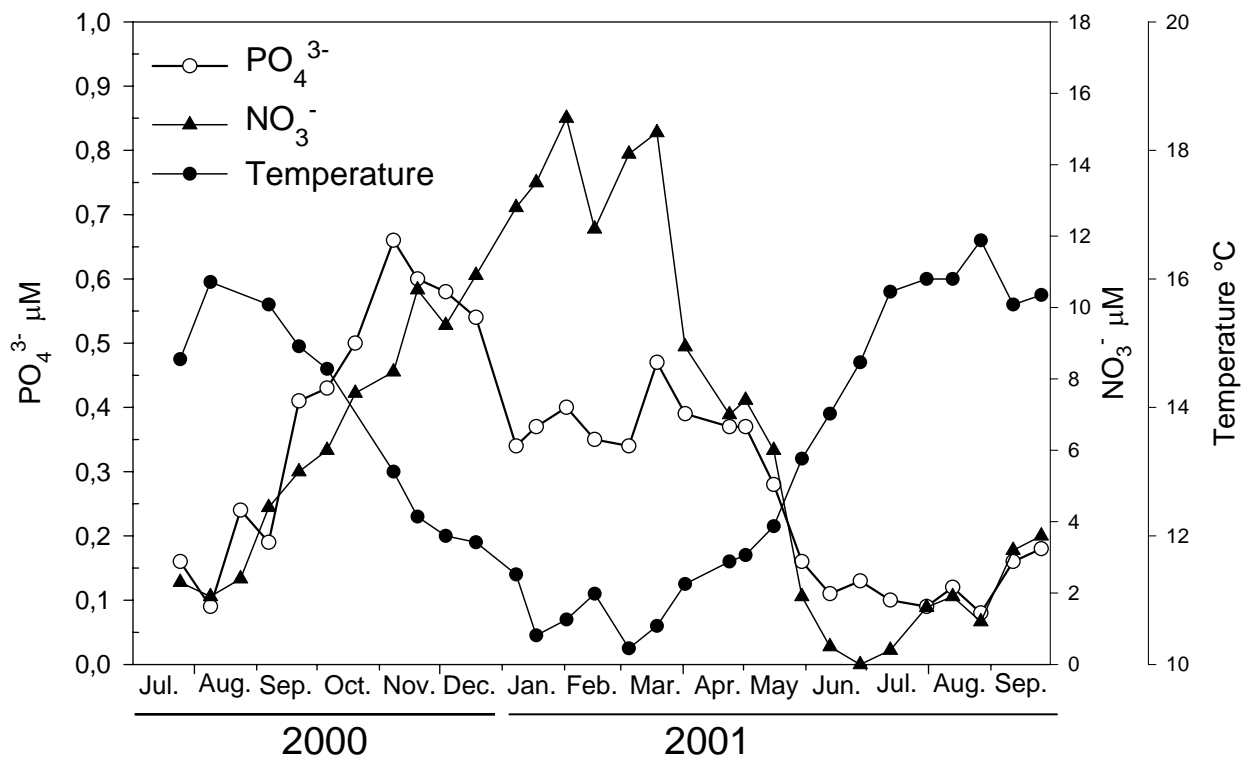


Figure III-2: Variations of temperature, phosphate and nitrate concentrations at the station ASTAN (48°46'N and 3°57'W) between July 2000 and September 2001.

PRAS04 on average, Fig. 4C) and accounted for 45 % of picoplanktonic eukaryotes. The second most abundant species detected was *B. prasinus* which accounted for 12 % (1 %-67 %) of the Mamiellales and 8 % of the picoplanktonic eukaryotes (Fig. 4C). Cells belonging to the genus *Ostreococcus* were less abundant with an average of 3 % (range 0 %-19 %) of the Mamiellales and 1.4 % of eukaryotes (Fig. 4C).

The second most abundant clade within the division Chlorophyta was the order Prasinococcales, targeted by the probe PRAS03 accounting for an average of 3.4 % (range 0 %-34 %) of the Chlorophyta cells (Fig. 4B). Cells belonging to the other clades were detected at very low abundances all year long. Probes PRAS01, PRAS05 and PRAS06 targeted an average of 0.6 %, 0.4 % and 0.6 % respectively of cells belonging to the division Chlorophyta (Fig. 4B). Only 16 %, on average, of the cells detected by the probe specific for the division Chlorophyta were not targeted by the Prasinophyceae probes used in this study.

Seasonal variation of the picoeukaryotic community. The picoeukaryotes community exhibited a marked seasonal cycle with minima of abundances in early winter and maxima (about ten fold the winter abundances) in mid summer. The pattern of abundance variation during the sampling period was similar for total picoplanktonic eukaryotes, photosynthetic picoeukaryotes, Chlorophyta, Mamiellales and for the species *M. pusilla*. On a smaller temporal scale, three major peaks of abundances were observed in 2001, in late spring and summer (mid May, mid June, and end of July, Fig. 4A). For the Mamiellales and for *M. pusilla*, an additional peak was observed in late August (Fig. 4C). The other clades and genera detected in this study showed more sporadic proliferations throughout the year. The species *B. prasinus* was detected all year long, but became more abundant during spring (1.8×10^3 cells.ml⁻¹ in March 2001, Fig. 4C). The cells targeted by the probe PRAS03 (order Prasinococcales) reached significant abundance in early fall (1.2×10^3 cells.ml⁻¹) and late spring (600 cells.ml⁻¹). In fall 2000, they accounted for up to 34 % of the cells targeted by the CHLO02 probe (Fig. 4B). A spectacular decrease in cell abundances of all the taxa detected by our probes and of flow cytometry counts was observed on May 30, 2001.

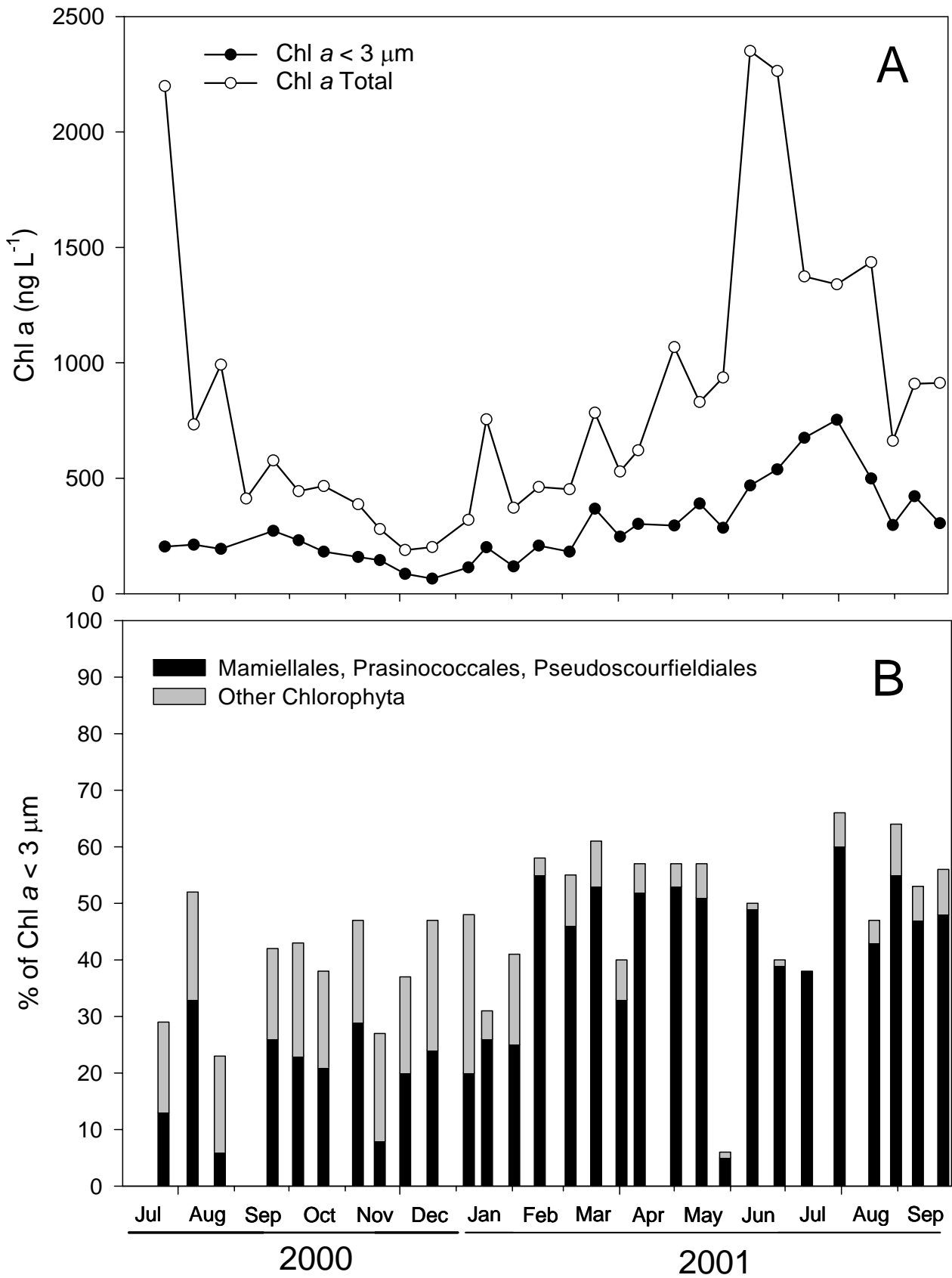


Figure III-3: **A)** Variations of the Chl *a* biomass as measured by HPLC (total < 200 μm and fraction < 3 μm) at the station ASTAN (48°46'N and 3°57'W). **B)** Contribution of the division Chlorophyta and of the orders Mamiellales, Prasinococcales and Pseudoscourfieldiales to the picoplankton fraction (< 3 μm) according to CHEMTAX algorithm applied to HPLC data.

DISCUSSION

New probes targeting Prasinophyceae. Phylogenetic analyses of 18S rDNA recovered directly from samples collected in different oceanic regions have revealed an unsuspected diversity within eukaryotic picoplankton (Moon-van der Staay et al. 2000). In most gene libraries analyzed, including libraries constructed from samples collected in the western English Channel (Romari & Vaultot 2004), prasinophycean sequences were well represented (Vaultot et al. 2002). The set of probes presented in this study covers most known clades (Fig. 1) and, compared to the few previously published probes for prasinophycean taxa, have improved specificities. Indeed, PRAS04 has no mismatch with any Mamiellales sequence known to date in contrast to PRAS02 (Biegala et al. 2003) that has one mismatch with *Bathycoccus prasinus*. The probes Micro/Manto1 and Micro/Manto2 designed in 1996 (Knauber et al. 1996) for *Micromonas* and *Mantoniella* present matches with the genus *Ostreococcus* and mismatches with some strains of *Micromonas*. They are therefore not specific of their initial targets (data not shown).

When tested against pure culture, probes PRAS04, MICRO01, OSTREO01 and BATHY01 showed perfect specificity for their target strains and delivered a bright fluorescent signal (Table 3 and 4). In contrast, we encountered hybridization problems with some combinations of strain/probe, i.e. either cell showed no fluorescent signal and a strong red fluorescence under blue excitation, or the fluorescent signal was heterogeneous. Given that the corresponding site on the 18S rRNA sequence of the strains tested showed 100 % homology with the probes, the most likely hypothesis is that the probes did not penetrate into the cells. In fact, the red chlorophyll fluorescence remaining in these strains after EtOH treatment suggests that their cell wall is probably very thick and resistant, a fact previously established for *P. provasolii* and *Prasinoderma* sp. (Hasegawa et al. 1996), and therefore prevents probe penetration.

Analysis of the picoeukaryotic community. The seasonal variation of micro-phytoplankton diversity and abundance in temperate sea waters has been well described. Off Roscoff, the micro-phytoplankton bloom occurs in late spring (with cell densities up to 3×10^4 cells.L⁻¹) and is characterized by the succession of a very limited number of diatoms species (such as *Guinardia delicatula*) that occurs at low concentration outside of this period (S. Ristori, unpublished data, (Sournia et al. 1987)). The present study indicates that the structure and dynamics of the picoplanktonic community are totally different from the

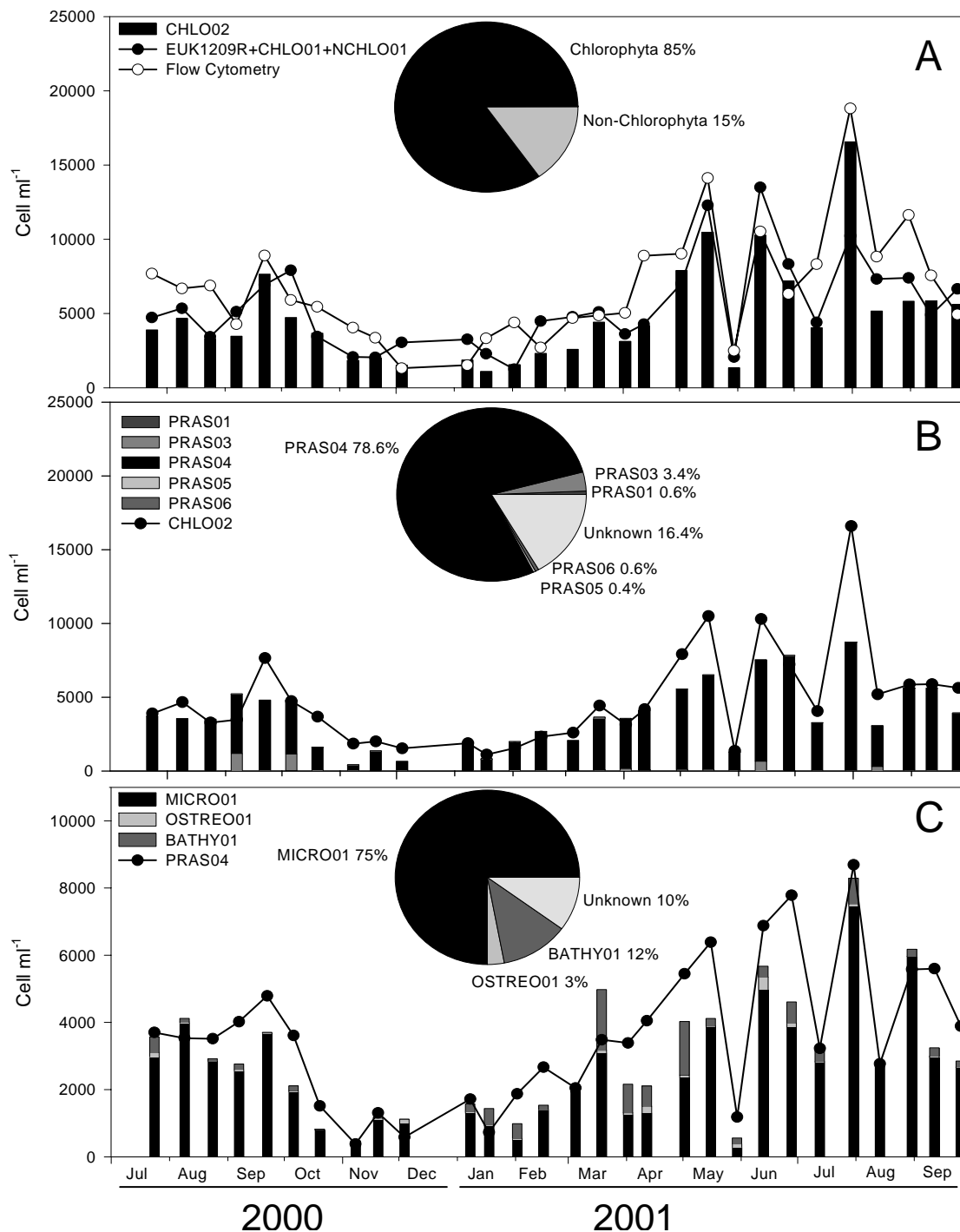


Figure III-4: Abundances (cells ml⁻¹) of photosynthetic picoplankton off Roscoff (Western English Channel) between July 2000 and September 2001. Average percentages over the time series of the different groups are represented in pie charts. **A)** Picoeukaryotic photosynthetic cells detected by flow cytometry counts, Picoeukaryotic cells targeted by the mix of the general probes EUK1209R+CHLO01+NCHLO01 and cells belonging to the division Chlorophyta detected by the probe CHLO02. **B)** Cells targeted by the probe CHLO02 and cells detected by the probes specific of clades PRAS01, PRAS03, PRAS04, PRAS05 and PRAS06. **C)** Cells targeted by the probe specific of Mamiellales PRAS04 and cells detected by the probes specific of the species and genera MICRO01, BATHY01 and OSTREO01.

classical scheme observed for micro-phytoplankton. First picophytoplankton abundance remains high all year round (10^3 to 2×10^4 cells.ml⁻¹). Hence, this size class contributes for an average of 50 % of the total Chl *a* biomass under non-bloom conditions. Second, both FISH and chemotaxonomic analyses, show that green algae, and more precisely Prasinophyceae, dominate the community (70 % of the cells and 35 % of the total picoplanktonic Chl *a*). Chlorophytes and Prasinophyceae have been previously identified using chemotaxonomic analyses (i.e. presence of Chl *b*) as major components of the nano- or picoplankton size fractions in the English Channel (Breton et al. 2000) as well as in other coastal systems, such as the Faroe-Shetland Channel (20 % to total Chl *a*) or Galician coast (60 % of total Chl *a* in winter, (Riegman & Kraay 2001, Rodriguez et al. 2003)).

Most interestingly, FISH data allowed us to establish unambiguously that a single species, *Micromonas pusilla*, is dominating all year round and shapes the dynamics of the whole picophytoplankton community. Using published values of Chl *a* content per cell for *Micromonas* (0.025 pg.cell⁻¹, (DuRand et al. 2002)) and cell abundances obtained by FISH, the contribution of *Micromonas* to total Chl *a* can be estimated to range between 2 and 50 % (22 % on average) of the picoplanktonic Chl *a*. *M. pusilla* has already been detected in different polar and temperate marine systems including coastal and open ocean regions such as the Norwegian coast (Thronsen 1976), Bay of Biscay (Ansotegui et al. 2003), Arctic Sea (Thronsen 1970), Mediterranean Sea (Zingone et al. 1999) and Skagerrak (Kuylenstierna & Karlson 1994) with abundances ranging between 10^2 to 9×10^3 cell.ml⁻¹. This species has also been found to be present all year round in the Skagerrak, North Sea, (Kuylenstierna & Karlson 1994) and to be abundant at winter-spring in Mediterranean Sea, (Thronsen & Zingone 1994) or spring and summer in North Atlantic and North Sea (Kuylenstierna & Karlson 1994).

The contribution of other Mamiellales genera to the picoplanktonic community was less important. The contribution of the non-motile picoplanktonic species *B. prasinos*, described from the Mediterranean Sea (Eikrem & Thronsen 1990) and reported from the Atlantic and Pacific Oceans (Silver et al. 1986) and Norwegian coastal waters (Eikrem & Thronsen 1990), is much more sporadic: for example in spring 2001 it accounted for 30 % of picoeucaryotes cells targeted. The genus *Ostreococcus* was detected but always at low abundance off Roscoff. Prior to this study, it had only been found in abundance in a somewhat atypical ecosystem, the Thau lagoon, a shallow ecosystem used intensively for oyster culture (Chrétiennot-Dinet & Courties 1997). The second most abundant group within the Prasinophyceae is the order Prasinococcales which contains species such as *P. capsulatus*,

which has been observed and is suspected to be significant in the western Atlantic and the western Pacific (Sieburth et al. 1999).

The persistence of high abundances of picophytoplankton all year round could be explained by the fact that picophytoplankton is controlled by small predators with short generation times (Simek et al. 1997) that prevent any sudden cell proliferation, even when conditions are optimal. This contrasts with what happens for diatoms controlled by copepods with long generation times and complex life cycles, which are able to reduce biomass only after a delay, allowing blooms to develop. The strong dominance of *M. pusilla* over other species all along the year in the system studied is very similar to what is observed for picophytoplanktonic prokaryotes for which single genera such as *Prochlorococcus* and *Synechococcus* dominate certain type of ecosystems (Partensky et al. 1999). *Micromonas* may have a wide ability to respond to light and nutrient variations and thus, because of this large environmental spectrum, be little affected by changes in the environment. However, during the seasonal series studied, a sharp decrease in abundance of picoeukaryotes (and *Micromonas pusilla*) was recorded at the end of May. This phenomenon was associated to a major peak in ammonium concentration (data not shown). One explanation for this decrease could be that *Micromonas* was infected by viruses. Previous studies have suggested that viruses infecting *M. pusilla* have a deep impact on population of this species in natural systems (Zingone et al. 1999). Most surprising is the ability of *Micromonas* populations to recover rapidly to their initial level only 15 days after the decrease. This upturn could be due to the proliferation of a different *Micromonas* genotype, resistant to the virus responsible for the decay. Indeed, a recent study based on the analysis of 18S rDNA gene sequences demonstrated the presence of three clades within the species *Micromonas pusilla* (Guillou et al. 2004).

Our results suggest that the taxonomic structure of the picoplanktonic communities is different from the structure of the micro-phytoplanktonic community with one species (*M. pusilla*) being dominant all year round off Roscoff. Hence if the diatoms, dinoflagellates and coccolithophorids (i.e. Chl *c* containing lineages) dominate the large eukaryotic phototrophic assemblages in the contemporary oceans (Grzebyk et al. 2003), a few species of the green (Chl *b* containing) lineage may dominate picoplankton and shape the marine microbial food webs. The next step will be to extend these observations to other coastal and oceanic areas in order to determine how widespread *M. pusilla* dominance is, and to understand the factors that regulate the diversity and abundance of picoeukaryotes.

Acknowledgments.

We would like to thank Isabelle Biegala and Carlos Pedrós-Alió for constructive discussions, Laure Guillou and Erwan Corre for help in phylogenetic analyses, the MYSIS crew for efficient assistance with the sampling and Florence Le Gall for help with phytoplankton cultures. This work was funded by the following programs: PICODIV supported by the European Union (EVK3-CT-1999-00021), PICMANCH supported by the Région Bretagne and BIOSOPE supported by PROOF (CNRS). Fabrice Not was supported by a doctoral fellowship from the French Research Ministry.

CHAPITRE IV

Composition du picoplancton dans l'océan Arctique

F. Not, R. Massana, M. Latasa, W. Eikrem, D. Marie, C. Colson, D. Vaultot and N. Simon.
Composition and abundance of photosynthetic picoplankton in Arctic waters. En préparation
pour **Deep-sea research part I Oceanographic research paper** ([version non définitive](#))

IV-1 RESUME EN FRANÇAIS

Nous avons étudié le picoplancton marin (cellules qui passent à travers un filtre d'une maille de 3 μm) dans des échantillons prélevés à la fin de l'été 2002, à la frontière entre les mers de Norvège, du Groenland et de Barents. Lors de notre étude, nous avons combiné les techniques de FISH-TSA, d'analyses pigmentaires, de marquages au DAPI et de mises en cultures pour identifier les taxa présents. La communauté picoplanctonique était principalement composée d'organismes eucaryotes autotrophes (87 % des cellules en moyenne). Les organismes appartenant à la division des Chlorophyta étaient les plus abondants dans les zones influencées par les apports d'eau côtière et Arctique, alors que les Haptophyta étaient majoritaires dans les eaux plus typiques de l'Atlantique. Ceci suggère des différences dans la structure des communautés de picoeucaryotes entre les masses d'eau étudiées. Dans notre étude, les résultats obtenus par FISH-TSA sont en accord avec les analyses pigmentaires en ce qui concerne le groupe des Haptophyta. Pour la classe des Prasinophyceae, il semble que les données de contributions à la Chl *a* obtenues par analyses pigmentaires aient sous estimé la contribution réelle du groupe à la communauté picoplanctonique. Ceci est probablement dû à la situation post-bloom observée lors de notre période d'échantillonnage. Parmi les Chlorophyta, les espèces *Micromonas pusilla* (plus de 9×10^3 cellules.ml⁻¹) et *Bathycoccus prasinus* (plus de $1,9 \times 10^3$ cellules.ml⁻¹) étaient dominantes. Ni *Ostreococcus*, ni *Synechococcus* n'étaient présentes dans les eaux Arctiques. Ce travail conforte l'idée selon laquelle *Micromonas pusilla* est un constituant majoritaire des communautés de picoeucaryotes dans les environnements côtier et nordiques.

Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoplankton in Arctic waters

**Fabrice Not^{1*}, Ramon Massana², Mikel Latasa², Wenche Eikrem³,
Dominique Marie¹, Céline Colson¹, Daniel Vaultot¹ and Nathalie Simon¹.**

¹ Station Biologique, UMR7127 CNRS, INSU et Université Pierre et Marie Curie, Place
George Teissier, 29680 Roscoff, France

² Institut de Ciències del Mar (C.S.I.C.), Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003
Barcelona, Spain.

³ Department of Biology, University of Oslo, P.O. box 1069 Blindern, 0316 Oslo, Norway

*Corresponding author. Mailing address: Oceanic Phytoplankton Team UMR 7127
CNRS/UPMC. Station Biologique BP74 29682 ROSCOFF cedex, France. Phone: 33 (0) 2-
98-29-23-70. Fax: 33 (0) 2-98-29-23-24. E-mail : not@sb-roscoff.fr

ABSTRACT:

We investigated marine picoplankton (cells passing through a filter with a pore size of 3 μm) in samples harvested in late summer 2002 at the boundary between the Norwegian, Greenland and Barents Seas. We combined taxa detection by Tyramide Signal Amplification Fluorescent *in situ* Hybridization (TSA-FISH), pigment analyses, DAPI staining and culture isolation. The picoplanktonic community was primarily composed of autotrophic eukaryotes (87 % of the cells on average). Chlorophyta were the major component in areas influenced by coastal and Arctic water inputs, while Haptophyta were prominent in more typical Atlantic waters, suggesting differences in the picoeukaryotic community structure between the water masses. While the results obtained for Haptophyta using TSA-FISH and pigments analyses were in agreement, the estimation of the contribution of Prasinophyceae to total Chl *a* was biased (under estimated) by the presence in the water column of large numbers of particles (including free plastids). Within the Chlorophyta the species *Micromonas pusilla* (up to 9×10^3 cells.ml⁻¹) and *Bathycoccus prasinus* (up to 1.9×10^3 cells.ml⁻¹) were numerically dominant. Neither *Ostreococcus* nor *Synechococcus* were found in these Arctic waters. This work supports the emerging view that *Micromonas pusilla* is a dominant contributor of picoeukaryotic communities in both coastal and northern environments.

KEY WORDS: Picoplankton – Arctic seas – Prasinophyceae – Haptophyta – *Micromonas pusilla*

INTRODUCTION

The Arctic Ocean and adjacent seas are areas of major oceanographic interest due to their contribution to the Atlantic circulation (e.g. deep water formation) and their role in carbon sequestering (Anderson et al. 1998). The Barents Sea is one of the most biologically productive polar zones (Loeng et al. 1997, Kogeler & Rey 1999). In this system, the microphytoplankton is well known: Dinoflagellates are highly diversified (Okolodkov & Dodge 1996) and diatoms produce a well characterized spring bloom (Markowski & Wiktor 1998, Rat'kova et al. 1998). The picoplankton (cells < 3 µm) of the Arctic Ocean has been far less studied. The distribution of the cyanobacteria *Synechococcus* has been examined and was found to decrease in abundance with increasing latitude (Murphy & Haugen 1985, Gradinger & Lenz 1995). Other studies have highlighted the domination of chlorophyll biomass by small flagellates and monads in Arctic related waters, outside of microphytoplankton bloom periods (Murphy & Haugen 1985, Verity et al. 1999, Rat'kova & Wassmann 2002). Diversity studies on those small eukaryotes indicate that green flagellates related to the class Prasinophyceae were abundant (Reynolds 1974) and results indicate that the prasinophyte species *Micromonas pusilla* was highly abundant in this area (Thronsen 1970).

The area investigated, between the Barents Sea, the Norwegian Sea and the Greenland Sea, has a complex hydrology. It is of the areas north of 70°N that is ice-free for some parts of the year. This is due to the inflow of warm, saline Atlantic waters from the Norwegian Sea. The North Atlantic current flows northwards parallel to the Norwegian coast, then dividing into two main branches: one that continues in a northerly direction following the continental slope west of the Svalbard Islands and the other flowing east into the Barents Sea (Fig. IV-1). Less saline, colder Arctic waters flow southwards along the east coast of the Svalbard Islands. The Atlantic and Arctic water masses meet along the continental slope in a zone known as the Polar Front. The exact position of this front varies with time (Sakshaug 1997). A third major current is the Norwegian Coastal Current which, in the Barents Sea region, flows north-east between the mainland and the Atlantic inflow (Kogeler & Rey 1999).

In this work we studied the link between the diversity and abundance of picoeukaryotes, and the hydrological features of this area. The distribution and abundance of eukaryotic picophytoplankton was examined at different taxonomic levels (and especially the Prasinophycean groups) using culture isolation, pigment analysis and oligonucleotide probes detected by TSA-FISH.

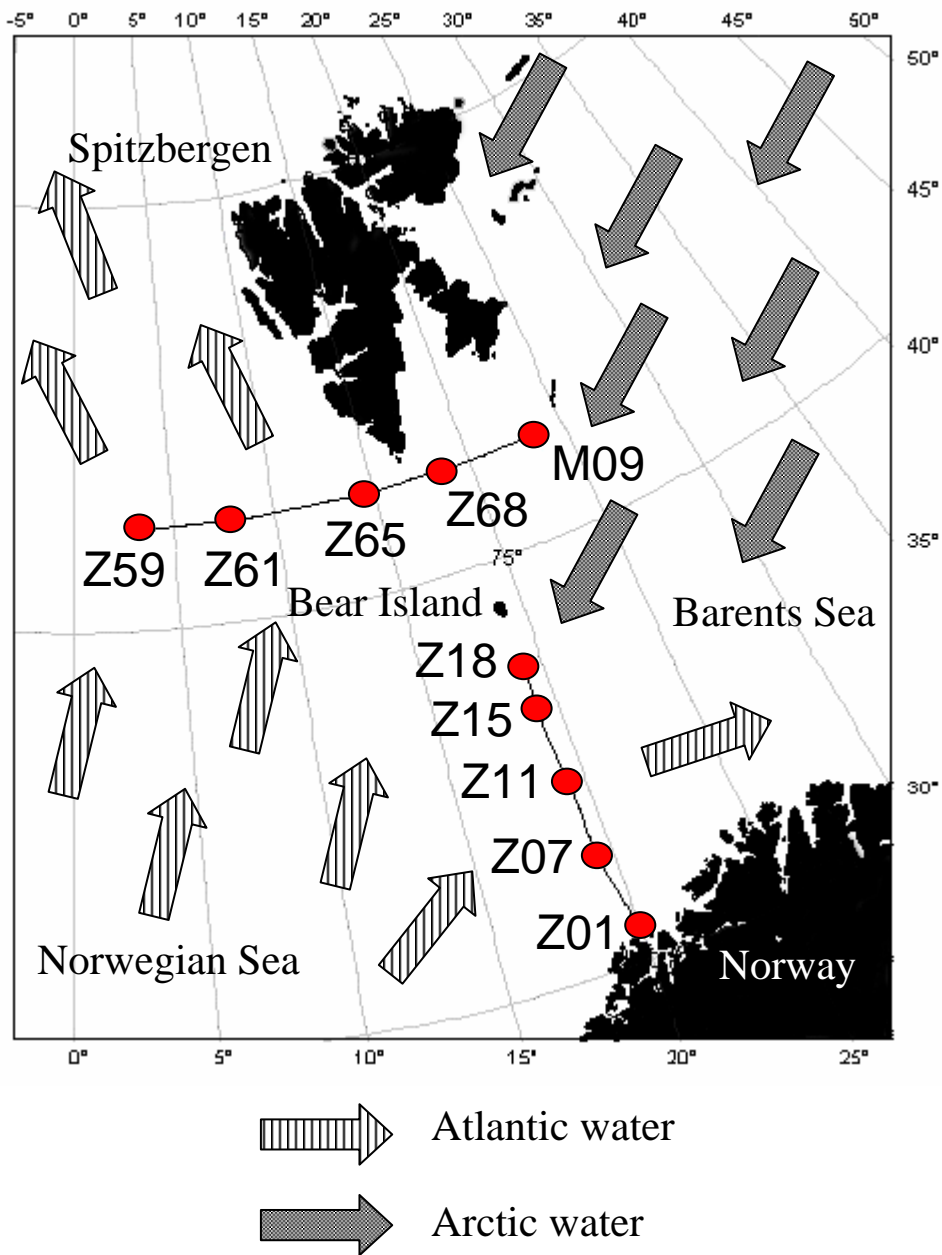


Figure IV-1: Map of the cruise area. The two transects NS and EW are indicated. Arrows symbolize surface circulation (adapted from Markowski & Wiktor (1998))

MATERIALS AND METHODS

Sampling procedures. We investigated the diversity of the photosynthetic picoplankton during an oceanographic cruise on board the “F/F Johan Hjort” (Norwegian Institute of Marine Research). This cruise took place in an area between the Norwegian and Barents seas (Fig. IV-1). Ten stations were sampled from 20 August to 8 September 2002 forming two transects (North /South, N/S and East/West, E/W) south of the Svalbard islands (Fig IV-1 and Table IV-1). Samples were collected at five different depths with a CTD deploying 5 liters Niskin bottles. Depths were chosen based on chlorophyll fluorescence provided by a SD200W fluorometer. Water was pre-filtered through a 200 µm mesh to remove large phytoplankton and particles before further filtrations.

Culture isolation. Cultures were initiated by adding ca 1 ml of pre-filtered sea water (pore size 3 µm) to ca 15 ml of modified Erd-Schreiber media (Thronsdén 1978) from the five depths, at stations M09, Z01, Z11, Z18, Z59, Z69 (Fig. IV-1). The cultures were incubated in a bucket with continuously flowing seawater from ca 5m. Seawater temperature ranged between 3 to 10 °C.

DAPI staining. Microbial counts were performed on board with a Zeiss epifluorescence microscope. Glutaraldehyde fixed samples were stained with DAPI (5 µg ml⁻¹ final concentration) and filtered through 0.6 µm black-stained polycarbonate filters (Poretics) of 25 mm diameter. Flagellates were identified and counted by standard epifluorescence microscopy (Porter & Feig 1980) based on their blue fluorescence under U.V. excitation (360 nm). The presence or absence of chlorophyll in flagellates was determined based on their red fluorescence under blue light excitation (490 nm). The size of each individual cell was estimated using an ocular grid in order to obtain the abundances of cells for 3 size classes (2, 3-4 and 5 µm).

Flow cytometry. 1.5 ml of water pre-filtered onto a 3 µm Nuclepore filter (Whatman international Ltd, Maidstone, England) were fixed with a mixture of 1 % PFA (paraformaldehyde) and 0.1 % glutaraldehyde (final concentrations), then frozen in liquid

Table IV-1: Position, bottom depth and hydrology for each of the sampling station.

Station name	Latitude (deg)	Longitude (deg)	Bottom Depth (m)	Chlorophyll max (ngL ⁻¹)	Chlorophyll max Depth (m)	Surface temp. °C	Surface salinity
Z01	70°30'	20°04'	155	650	13	12.6	33.26
Z07	71°30'	19°48'	234	1320	25	11.9	34.41
Z11	72°31'	19°36'	390	1249	25	11.0	34.56
Z15*	73°29'	19°18'	479	1323	16	8.9	34.86
Z18	73°59'	19°14'	128	1701	6	4.5	34.31
M09	76°19'	23°45'	67	1835	20	4.5	34.39
Z68	76°20'	18°47'	268	1393	5	7.1	34.11
Z65	76°20'	14°53'	354	1674	16	7.1	34.88
Z61	76°20'	7°60'	2170	891	16	8.2	35.05
Z59	76°20'	3°59'	3231	737	36	6.0	33.63

* At station Z15 flow cytometry and FISH samples could not be collected

nitrogen and stored at -80°C . Total photosynthetic cells counts were obtained using a FACSort flow cytometer (Becton Dickinson, San José, California), following the protocol described by (Marie et al. 1999). Photosynthetic picoeukaryotes were discriminated from cyanobacteria and enumerated using Cytowin software available from <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/cyto.html> (Vaulot 1989).

Pigment analyses. One liter of sea water fractions ranging in size from $0.2\text{-}200\ \mu\text{m}$, $3\text{-}200\ \mu\text{m}$ and $0.2\text{-}3\ \mu\text{m}$ were collected onto GF/F filters (Whatman international Ltd, Maidstone, England), $3\ \mu\text{m}$ pore size filters (Nuclepore) and GF/F filter respectively. Filtrations were conducted under a pressure of 200 mmHg and all filters were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . The contribution of different algal groups to the total chlorophyll *a* (Chl *a*) was estimated using CHEMTAX (Mackey et al. 1996). It should be noted that CHEMTAX groups do not match exactly taxonomic entities as some of them are defined based on non-specific pigment signatures. The interpretation of CHEMTAX groups included in this study is as follows: Diatoms are fucoxanthin-containing groups, but also contributions from other Chromophytes (including the classes Chrysophyceae, Pelagophyceae and Dictyochophyceae) and Haptophytes occur. The Prasinophyceae is represented by prasinoxanthin-containing species e.g. *Micromonas pusilla*, *Bathycoccus prasinos* and *Ostreococcus tauri* all belonging to the order Mamiellales. The Chlorophyceae is defined as a Chl *b* containing group that lacks prasinoxanthin. The Haptophyta is characterized by 19'hexanoyloxyfucoxanthin (19'hex) and fucoxanthin containing genera such as *Emiliana*, *Phaeocystis* and *Chrysochromulina*.

Fluorescent *in situ* hybridization. For fluorescent whole-cell hybridization (FISH), 90 ml of sea water were pre-filtered through a $3\ \mu\text{m}$ pore size Nuclepore filter and fixed with 10 ml of 10 % PFA for one hour. Samples were then filtered onto $0.2\ \mu\text{m}$ Anodisc filters (Whatman international Ltd, Maidstone, England) under a maximum of 200 mmHg pressure and dehydrated in an ethanol series (50, 80, 100%, 3 min. each). Filters were stored at -80°C . *In situ* hybridizations with HRP labeled probes, signal amplification and target cell detection was performed as described previously (Chapitre II). Oligonucleotide probes were purchased with a 5' aminolink (C6) from MWG. The probes were then labeled with HRP (Roche Diagnostic Boehringer, Meylan, France) according to Urdea et al. (1988) and Amann et al. (1992). The probes used in this study are listed in Table 2 and are available in the rRNA

Table IV-2: List of oligonucleotide probes used in this study. The probes EUK1209R, CHLO01 and NCHLO01 were used together in order to target eukaryotes.

Name	Sequence	Target group	References
EUK1209R	5' -GGG CAT CAC AGA CCT G-3'	Eukaryotes	Giovannoni et al. 1988
CHLO01	5' -GCT CCA CGC CTG GTG GTG-3'	Chlorophyta	Simon et al. 1995
NCHLO01	5' -GCT CCA CTC CTG GTG GTG-3'	Non-Chlorophyta	Simon et al. 1995
CHLO02	5' -CTT CGA GCC CCC AAC TTT-3'	Chlorophyta	Simon et al. 2000
PRAS04	5' -CGT AAG CCC GCT TTG AAC-3'	Mamiellales	Not et al. 2004
MICRO01	5' -AAT GGA ACA CCG CCG GCG-3'	<i>Micromonas</i>	Not et al. 2004
BATHY01	5' -ACT CCA TGT CTC AGC GTT-3'	<i>Bathycoccus</i>	Not et al. 2004
OSTREO01	5' -CCT CCT CAC CAG GAA GCU-3'	<i>Ostreococcus</i>	Not et al. 2004
PRYM02	5' -GGA ATA CGA GTG CCC CTG AC -3'	Haptophyta	Simon et al. 2000
BOLI02	5' -TAC CTA GGT ACG CAA ACC-3'	Bolidophyceae	Guillou et al. 1999

probes database for protists and cyanobacteria (http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/Databases/RNA_probes_introduction.php). We used three of these probes, EUK1209R, CHLO01 and NCHLO01, in combination to estimate total eukaryotes and probe CHLO02, specific for the sub-regnum Chlorobionta (Chlorophyta and Streptophyta), to target cells belonging to the division Chlorophyta (Chapitre III).

Epifluorescence microscopy. Hybridized cells were observed with an Olympus BX 51 epifluorescence microscope (Olympus optical Co, Tokyo, Japan) equipped with a mercury light source and a x100 UVFL objective. Excitation/emission filters were 360/420 for DAPI and 490/515 for FITC. For each sample, 15 randomly chosen microscopic fields were analyzed, and counts were performed by eye. For probes with a broad taxonomic specificity (e.g. CHLO02) more than 500 cells were counted.

Data representation using Ocean Data View software. Contour maps showing the parameter distributions are presented using Ocean Data View software (Schlitzer 2003). The shape of contour lines results from computer interpolation and may be unreliable in areas with low sampling density. Features in the plots and their positions must be considered in relation to the frequency and proximity of sampling locations and depth.

RESULTS

Water masses. Hydrological parameters (temperature and salinity) along the N/S and E/W transects allowed us to distinguish waters of Arctic origin at stations Z18 and M09 from North Atlantic Current waters (stations Z01 to Z15, stations Z59 to Z68) (Fig. IV-1). The Arctic influenced water, flowing down through the East Spitzbergen and Barents Sea, was characterized by low temperatures (range 1.7°C to 4.6°C), with low salinity (ca 34.5) (Fig. IV-2A and IV-2B). These waters were moderately stratified, showed high surface concentration of Chl *a* ($> 1,400 \text{ ng.L}^{-1}$) (Fig. IV-2D) and *Synechococcus* was absent (Fig. IV-2C).

The Atlantic influenced waters were characterized by higher surfaces temperatures ($> 6^\circ\text{C}$) and salinities generally above 34.5. The Chl *a* concentration was lower ($< 1,200 \text{ ng.L}^{-1}$)

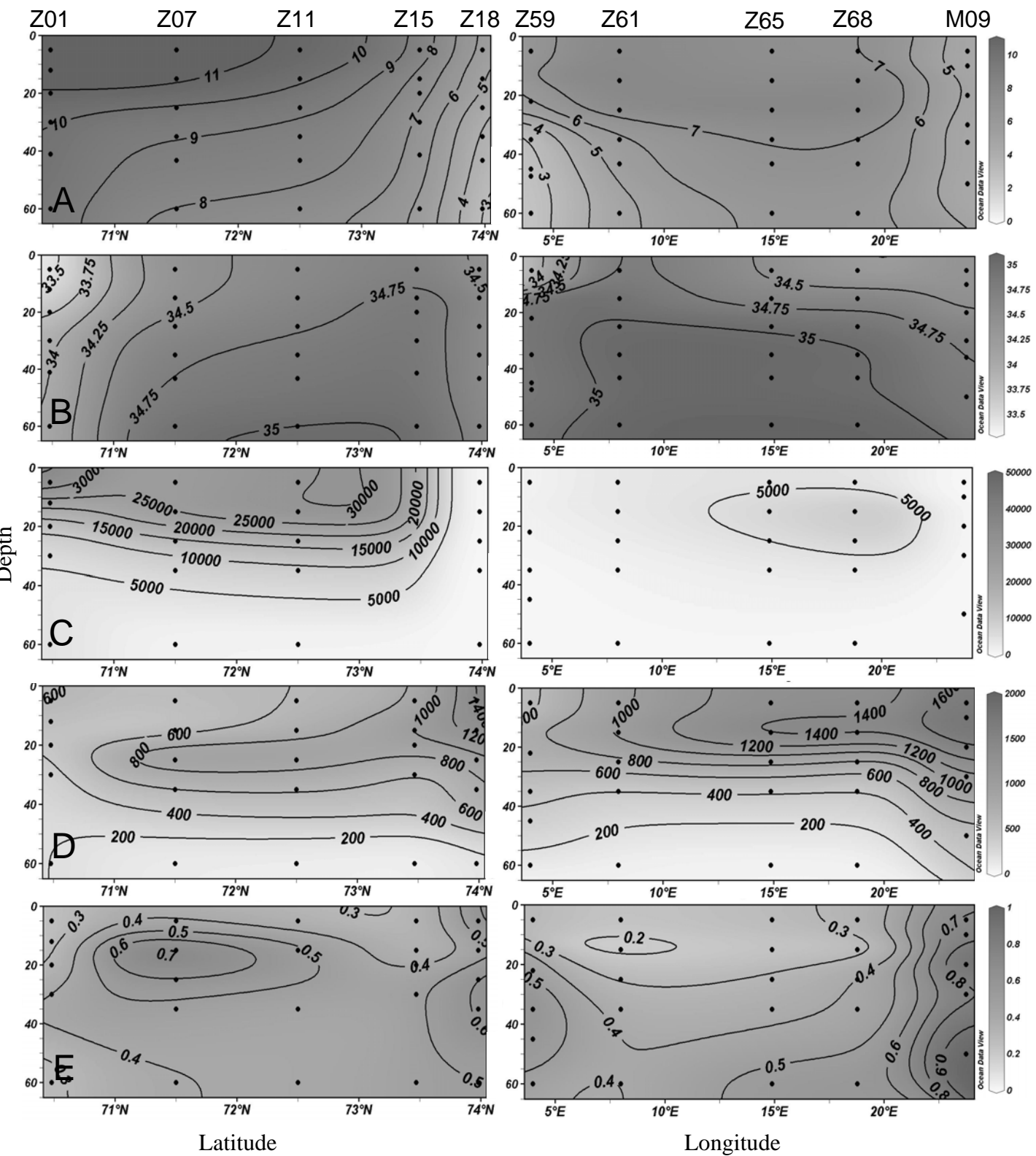


Figure IV-2: Depth sections along two transect NS and EW. A Temperature ($^{\circ}\text{C}$), B salinity, C Densities of *Synechococcus* (cell.ml^{-1}), D concentration of Chl *a* $< 200\mu\text{m}$ (ng.L^{-1}), and E ratio Chl *a* $< 3\mu\text{m}$ / Chl *a* $< 200\mu\text{m}$. Black dots correspond to actual sample location.

and *Synechococcus* was present in significant concentration ($>2,000$ cell.ml⁻¹). Stratification occurred with Chl *a* maxima at approximately 20 m depth. Station Z01 presented coastal water influences with low salinity at the surface. The abundance of *Synechococcus* was higher at station Z01 than in more open waters (Fig. IV-2B, IV-2C and IV-2D). Station Z61 was the most characteristic of open Atlantic water. Stations Z65 and Z68 (E/W transect) at the border between the Arctic and Atlantic waters presented special characteristics with stratified waters, intermediate temperatures and salinity, and medium concentrations of Chl *a* and densities of *Synechococcus*. Stations Z11 and Z15 (N/S transect) were slightly warmer and saltier. *Synechococcus* densities were higher at these stations, which revealed a more pronounced influence of Atlantic water compared to stations Z65 and Z68 that were more influenced by Arctic waters. The low temperature and salinity observed at station Z59 probably indicate the influence of Arctic waters flowing down east of Greenland and directed eastward by one of the Greenland Sea gyres. Overall, stations of the N/S transect appeared more affected by Atlantic waters and stations of the E/W transect were influenced by Arctic waters.

Contribution of picoplankton to photosynthetic biomass. Size fractions analyses using HPLC techniques showed on average that almost half of the Chl *a* biomass (44%) can be attributed to picophytoplankton (including *Synechococcus* and picoeukaryotes) in the region studied (Fig. IV-2E). At stations influenced by Arctic waters (Z18 and M09) picoplanktonic Chl *a* concentrations represented on average 73.5 % of total Chl *a* biomass. At stations influenced by Atlantic waters, picoplanktonic Chl *a* concentrations was relatively lower (average 37.5 %). Picoplanktonic Chl *a* biomass was roughly homogeneous in the water column at station M09 and Z18 whereas it varied with depth (from 200 to 1,200 ng Chl *a* L⁻¹) at stations influenced by Atlantic water masses (Fig. IV-2E).

Pigment data ($< 3\mu\text{m}$) analyzed with CHEMTAX allowed us to reconstruct the contribution of the different pigment groups (Fig. IV-3). Cells with a diatom-like pigmentation were by far the most significant group and directed the pattern of picoplanktonic Chl *a* concentrations with maxima in Arctic waters (up to 1000 ng Chl *a* L⁻¹, Fig. IV-3A). The Haptophyta contributed significantly to the Chl *a* biomass also (max. 125 ng Chl *a* L⁻¹, Fig. IV-3B). The highest concentrations of Chl *a* attributed to Haptophyta occurred between 20 and 30 m depth in Atlantic waters of both transects and significant concentrations were observed in the Arctic station Z18 (Fig. IV-3B). By contrast, Haptophyta pigments were scarce at the coastal influenced station Z01, and Arctic station M09. The Chl *a* attributed to Chlorophyceae and Prasinophyceae was always below 60 ng Chl *a* L⁻¹ and both groups

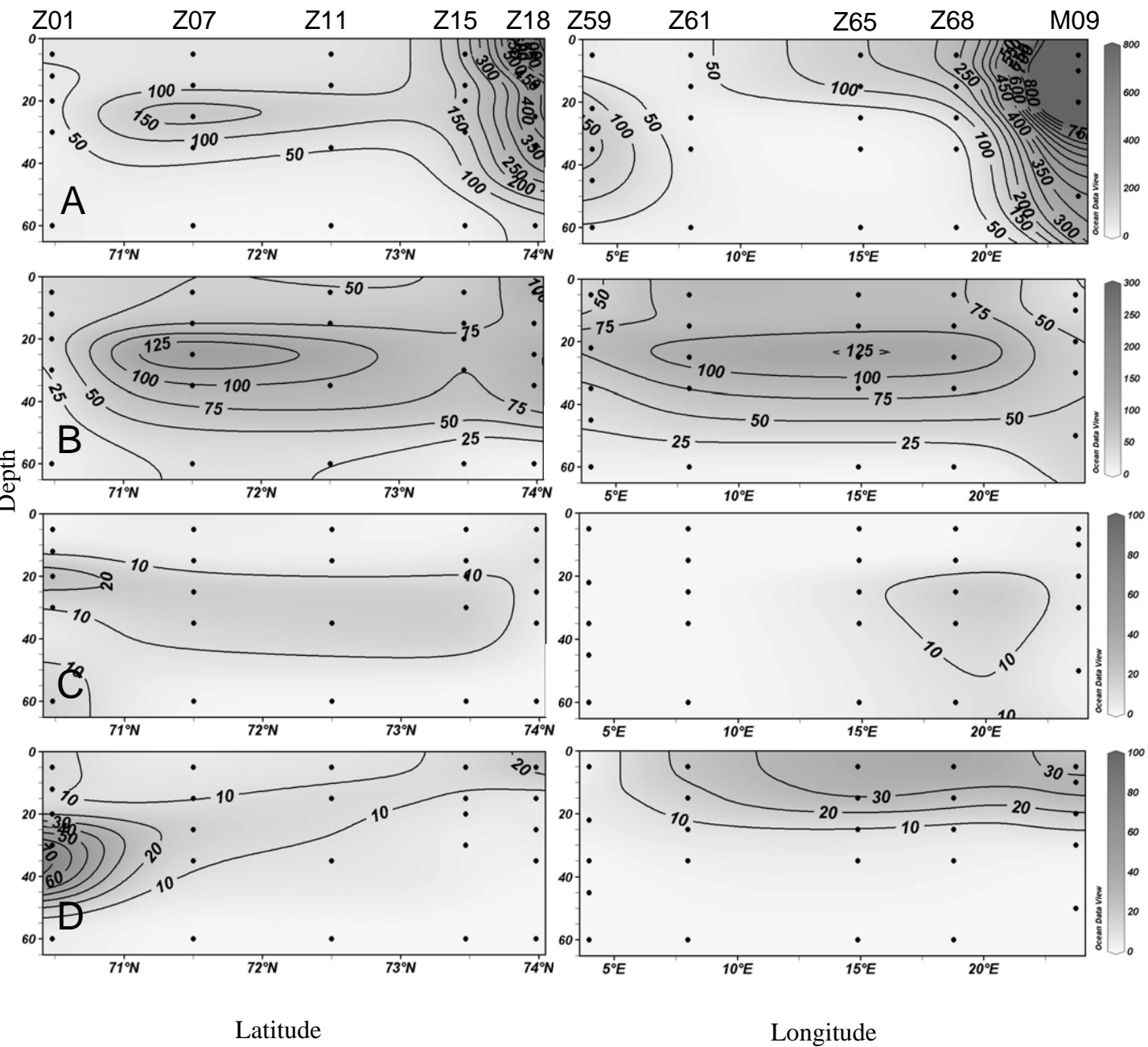


Figure IV-3: Depth sections along two transect NS and EW. A concentration of Chl *a* attributed to diatoms-like cells ($\text{ng chl } a \text{ L}^{-1}$), B concentration of Chl *a* attributed to Haptophyta ($\text{ng chl } a \text{ L}^{-1}$), C concentration of Chl *a* attributed to Prasinophyceae containing prasinoxanthin ($\text{ng chl } a \text{ L}^{-1}$) and D Chlorophyceae ($\text{ng chl } a \text{ L}^{-1}$). Black dots correspond to actual sample location.

displayed a different distribution along the cruise (Fig. IV-3C and IV-3D). Thus, while prasinoxanthin showed its highest values around 30 m deep in the S/N transect and at station Z68, being absent from Arctic waters (Fig. IV-3C), Chl *b* exhibited higher concentrations at depth at coastal station Z01 and at truly Arctic or Arctic influenced stations (E/W transect) at surface (Fig. IV-3D).

Picoeukaryotes abundances. We estimated the overall abundance of picoeukaryotes (total numbers as well as numbers of photosynthetic picoeukaryotes) using the TSA-FISH method with a mix of general probes and DAPI staining. These two techniques showed a similar pattern for the distribution of picoeukaryotes (Fig. IV-4A and IV-4B). In Arctic waters, picoeukaryote densities ranged between 4,000 to 10,000 cells.ml⁻¹ whereas in Atlantic waters picoeukaryotes densities reached 17,000 cells.ml⁻¹ at station Z65. Atlantic waters under the strongest influence of Arctic waters (i.e. E/W transect) presented higher abundances compared to stations of the N/S transect. However station Z01 (N/S transect) influenced by the coast and station Z15 closest to the Arctic water showed high picoeukaryotes densities. Numbers of picoeukaryotes over 4,000 cells.ml⁻¹ were always limited to the first 30m of the water column (Fig. IV-4A and IV-4B).

Based on DAPI counts, 87% of the picoeukaryotes in the region studied were autotrophic on average. Contribution of autotrophic picoplankton was slightly higher at the interface between Arctic and Atlantic waters (stations Z15, Z68 and Z65) and lower in Arctic water (Fig. IV-4C). Moreover, autotrophic cells were smaller (70 % of the cells with size < 2 µm, 30 % of the cells with size between 3 and 5 µm) than heterotrophic ones (70 % of the cells with a size between 3 and 5 µm) (data not shown).

Diversity of picoeukaryotes. Overall, with the probes utilized, 63 % of the picoeukaryotes detected by FISH could be assigned to a taxon. On average 47 % of the picoeukaryotic cells belonged to the division Chlorophyta (Fig. IV-5A). Their contribution to total counts was highest in stations at the boundary between Arctic and Atlantic water (60-80 % at stations Z65, Z68, Z11, Z15 and Z59) (Fig. IV-4A). In Arctic waters (Z18 and M09) and at the coastal station Z01, their contribution was lower (< 60 %). In truly Atlantic water (station Z61) their contribution was only 20 %. The order Mamiellales, by far dominated the Chlorophyta at all stations (≥ 74 %, Fig. IV-5B). Within the picoeukaryotic community, *Micromonas pusilla* was the most abundant species. In Arctic waters it represented 32 % of the picoeukaryotes (max. 3,255 cells.ml⁻¹), 25 % at stations influenced by coastal water and

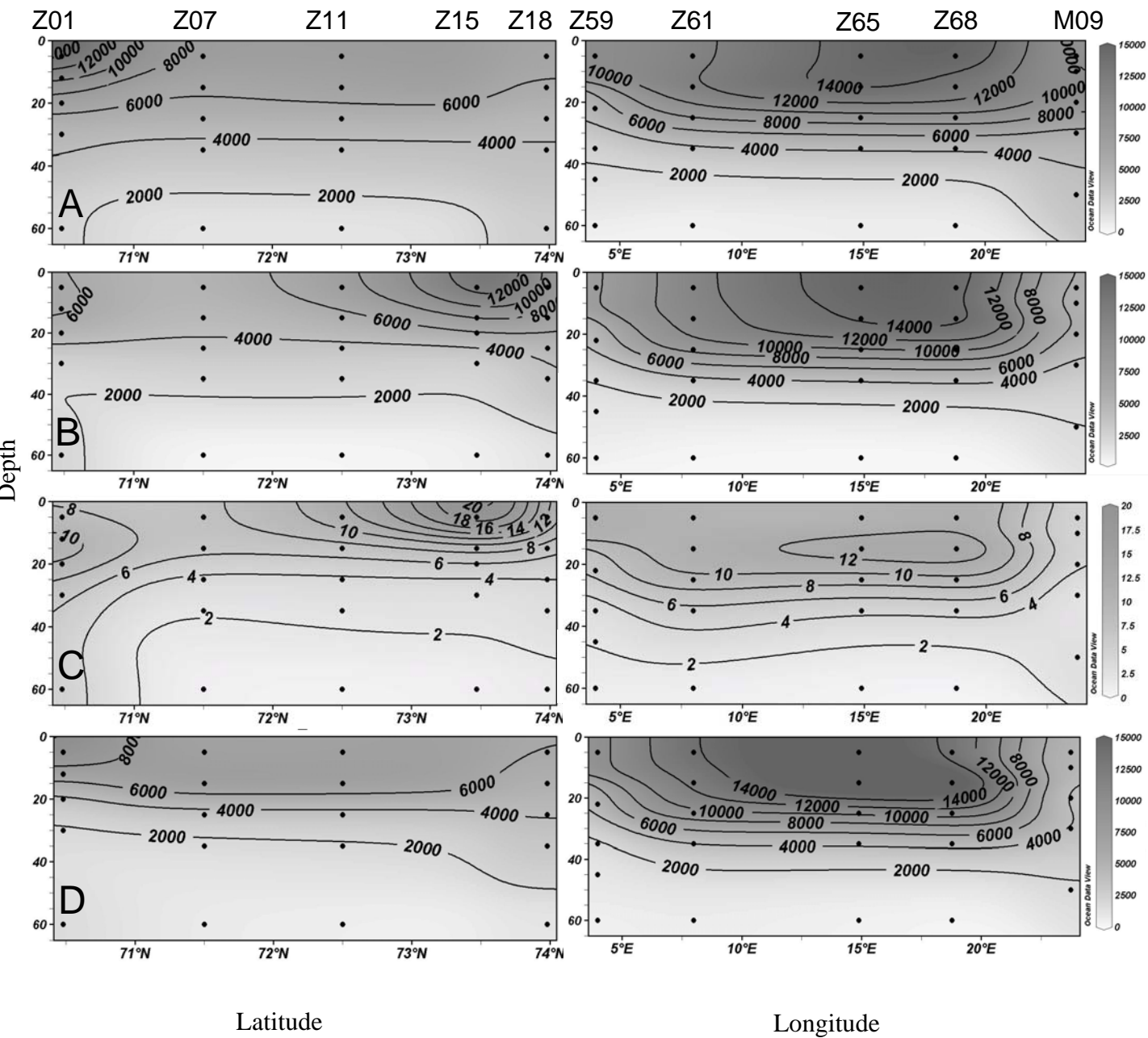


Figure IV-4: Depth sections along two transect NS and EW. A all picoeukaryotes estimated by FISH (cell.ml^{-1}), B eukaryotes $< 5 \mu\text{m}$ using DAPI staining (cell.ml^{-1}), C ratio autotrophs/ heterotrophs estimated under epifluorescence microscopy, D counts of photosynthetic picoeukaryotes detected by flow cytometry (cell.ml^{-1}). Black dots correspond to actual sample location.

those stations located at the boundary between Arctic and Atlantic waters (max. 9,073 cells.ml⁻¹), but only 9 % at the stations influenced by Atlantic water (Z61, Z07 and Z11, Fig. IV-5C). *Bathycoccus prasinus* represented 9.3 % of the picoeukaryotes in Arctic waters (max. 1,533 cells.ml⁻¹) and 11.5 % in Atlantic water (max. 1,974 cells.ml⁻¹). As for *M. pusilla*, stations influenced by coastal water and stations influenced by Arctic and Atlantic waters exhibited higher proportions of *B. prasinus* (12.6 % and 18.2 % of picoeukaryotes, respectively). *B. prasinus* exhibited higher cell numbers than *M. pusilla* at stations Z59 and Z61 (Fig. IV-5D). No *Ostreococcus* was detected and only 13 % of the Mamiellales detected could not be assigned to the genera and species targeted.

In addition to Chlorophyta organisms we quantified the abundance of the Haptophyta and Bolidophyceae. Haptophyta accounted on average for 6.2 % of the picoeukaryotes in Arctic waters (max. 840 cells.ml⁻¹), but were more abundant in Atlantic waters (max. 4,515 cells.ml⁻¹ at station Z61) where they contributed up to 24 % of the picoeukaryotes at the stations Z07, Z11 and Z61 (Fig. IV-5E). A good correlation was observed between cells detected as Haptophyta by the FISH method (cells targeted by the PRYM02 probe) and autotrophic cells identified by the DAPI stained preparations in the 3-4 µm size range ($r^2=0.9511$) (Fig. IV-6). Bolidophyceae were found in all water masses, but they always accounted for less than 1 % of the total picoeukaryotes counts (data not shown).

Diversity among cultures isolated. *Synechococcus* was isolated from different stations of this cruise (Z01, Z11, Z18, M09, Z68 and Z59). While the egg-shaped organism detected at station Z01 has been identified as a probable member of Cyanophyceae, it appears very different from the genus *Synechococcus*. Several Prymnesiophyceae such as *Chrysochromulina* sp., *Emiliana huxleyi*, and *Phaeocystis*, and the Dictyochophyceae *Pseudopedinella* sp. were recorded. *M. pusilla* was often recovered from cultures as well (Table IV-3).

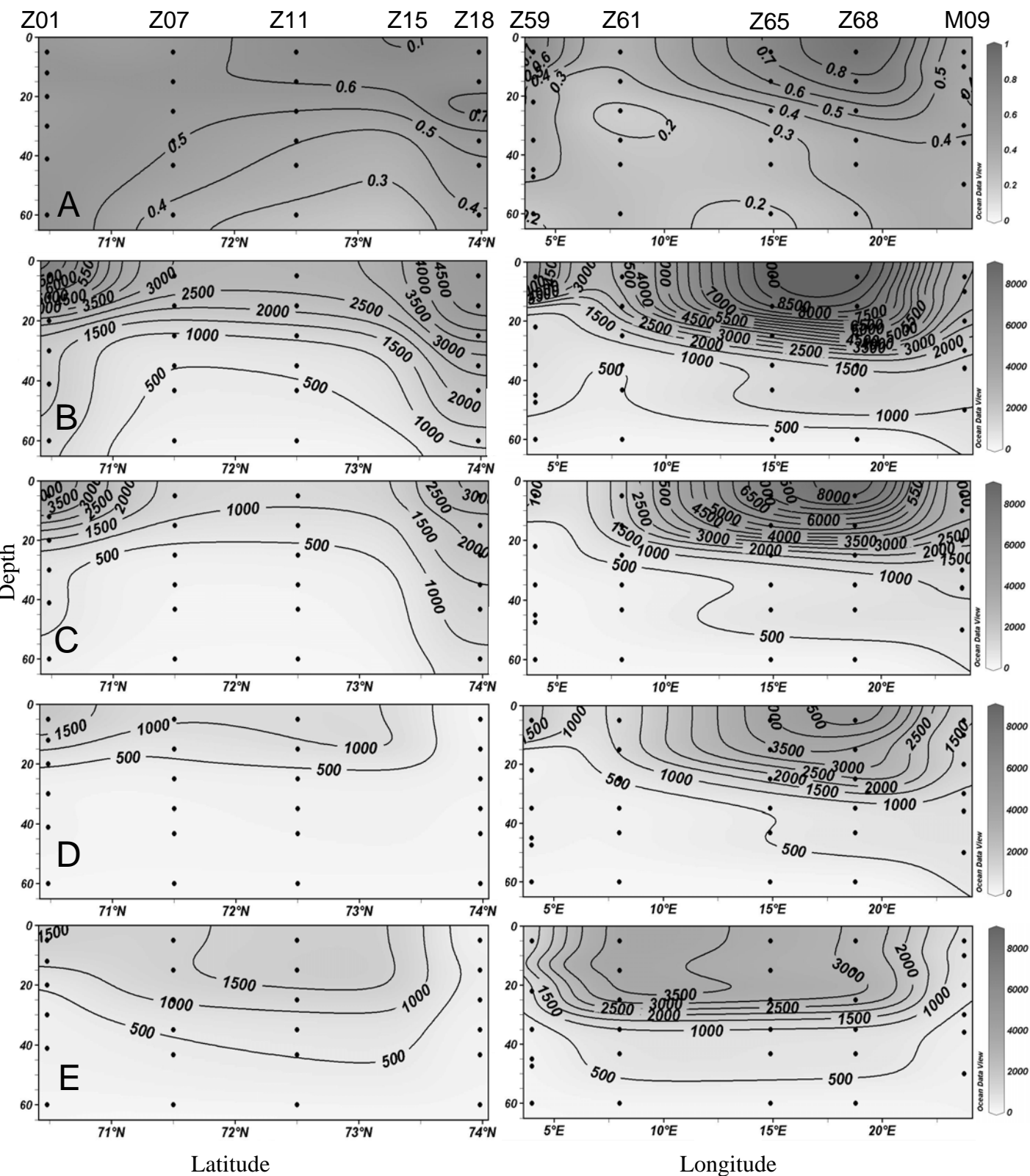


Figure IV-5: Depth sections along two transect NS and EW. A ratio of Chlorophyta/picoeukaryotes, B Mamiellales (cell.ml⁻¹), C *Micromonas pusilla* (cell.ml⁻¹), D *Bathycoccus prasinos* (cell.ml⁻¹) and E Haptophyta (cell.ml⁻¹) detected by FISH. Black dots correspond to actual sample location.

DISCUSSION

Contribution of picoplankton to phytoplanktonic biomass and abundance. The complex hydrology and the year to year variations of the location of the polar front are key characteristics of the area studied (Sakshaug 1997, Markowski & Wiktor 1998). In our study the hydrological parameters and the abundance of cyanobacteria (i.e. *Synechococcus*) along the two transects sampled were good indicators to discriminate between the warm Atlantic waters and the cold Arctic waters as suggested previously by Murphy & Haugen (1985) and Gradinger & Lenz (1995).

In the Arctic waters we observed a moderate abundance of photosynthetic picoplanktonic cells (dominated by Chlorophyta) detected by FISH, but high concentrations of picoplanktonic pigments (mainly fucoxanthin) attributed to diatoms (algae with sizes usually above 10 μm) and an important proportion of heterotrophs. Previous studies suggested that at this time of the year, Arctic waters are probably in a post-bloom condition dominated by regenerated production where small heterotrophs and green flagellates are the major components of the phytoplankton community (Markowski & Wiktor 1998, Owrid et al. 2000). We assume that the high fucoxanthin values found in the pico size fraction is mostly due to the presence of cell debris (i.e. whole plastid outside of cells not detected by FISH) induced by zooplankton grazing. A similar situation has been observed in the Southern polar ocean where microscopy observations revealed that in many samples more than 50 % of the nanoplankton sized (< 8 μm) chlorophyll containing particles were free floating chloroplasts (Gieskes & Elbrächter 1986). Furthermore the record of high levels of chlorophyllide *a*, which is known as a pigment marker for degrading phytoplankton, particularly diatoms (Jeffrey & Hallegraeff 1987), corroborates the existence of post bloom conditions during our sampling period.

In Atlantic and coastal waters the situation was totally different as the abundance of picoeukaryotes was higher, but their relative contribution to total photosynthetic biomass lower. One possible explanation could be that free-floating diatom chloroplasts do not contribute to picoplanktonic photosynthetic biomass in these waters at this time of the year. Therefore, the picoeukaryotes detected by FISH were the only contributors to the photosynthetic biomass. Besides, it could be a consequence of the higher nutrient concentration in these areas. Indeed, Atlantic flow and the shallow Spitzbergen bank as well as the intense tide have been shown to provide an almost continuous supply of nutrients south

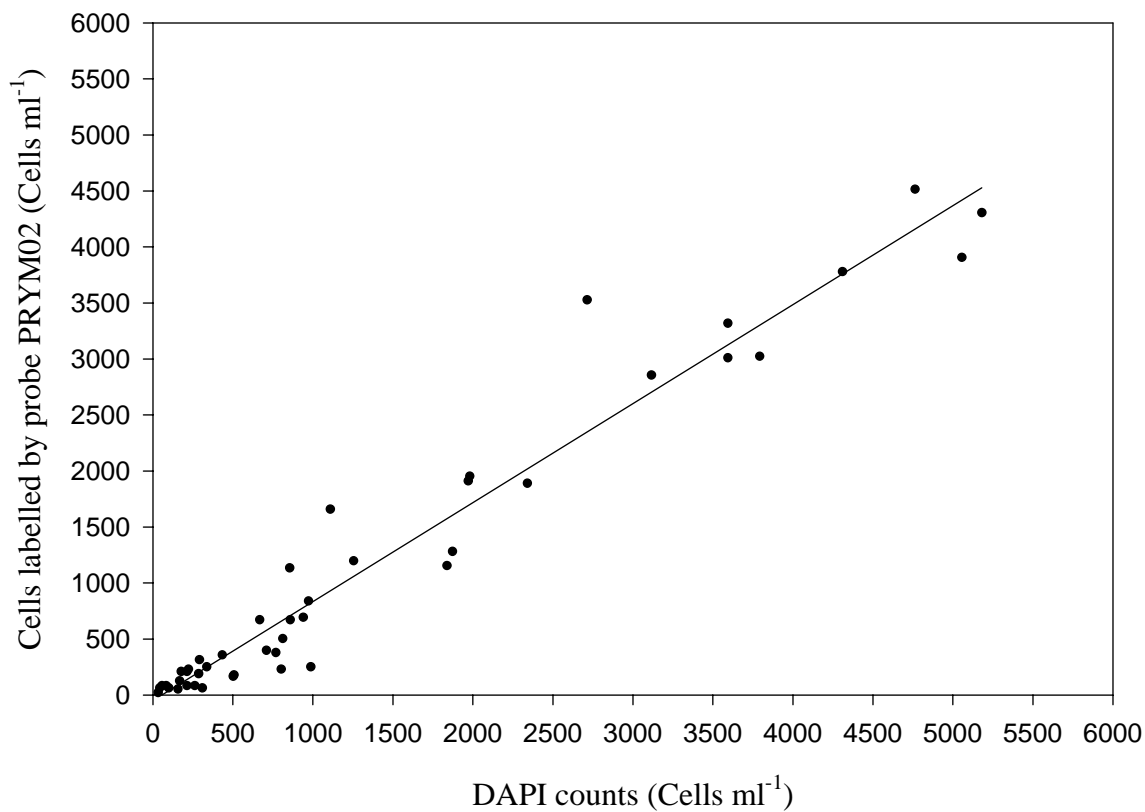


Figure IV-6: Correlation between DAPI counts of photosynthetic cells belonging to the size class 3-4 μm and cells detected by fluorescent *in situ* hybridization with the probe PRYM02 (specific for Prymnesiophytes). $r^2 = 0.951$.

of Spitzbergen (Rat'kova & Wassmann 2002) maintaining phytoplankton growth at moderate levels throughout the summer and autumn (Kogeler & Rey 1999). In Norwegian coastal waters the bloom can last for several weeks into the summer because of the introduction of nutrients from coastal zones (fresh water discharged) (Kogeler & Rey 1999). High picophytoplankton abundance corresponding to low contribution to total photosynthetic biomass was observed in nutrient rich areas, as shown for a large data set covering a wide range of oceanic conditions (Bell & Kalff 2001).

Diversity of picoeukaryotes. In our study, autotrophic cells dominated the picoeukaryotic community (87.4 %). This is in agreement with previous studies in the Barents Sea in summer where unidentified small flagellates (< 20 μm) have been shown to be 70-80 % photosynthetic (Rat'kova & Wassmann 2002, Verity et al. 2002). Small flagellates (< 10 μm) have been shown to be numerically important (10^3 - 10^4 cells.ml⁻¹ in Arctic waters) using serial dilution cultures, many of these were suspected to be members of the class Prasinophyceae (Thronsen 1970, Reynolds 1974).

Chlorophyta and more precisely Prasinophyceae belonging to the order Mamiellales were numerically the most abundant in all water masses. However the location of pigments attributed to the Prasinophyceae (N/S transect deep) did not corresponds to FISH detection, a better correspondence being observed with the Chlorophyceae (Chl *b* containing and prasinoxanthin-lacking organisms) at the E/W transect, and the coastal and Arctic stations. This discrepancy can be explained by the input ratio used to discriminate between these two pigment groups in CHEMTAX matrix. Both classes are Chl *b* containing algae and the affiliation to the Prasinophyceae is based on the presence of prasinoxanthin. However, members of the Mamiellales contain prasinoxanthin to Chl *a* ratios from 0.097 to 0.212 (Latasa et al. soumis). The volume filtered probably did not allow recovering a detectable amount of prasinoxanthin in many samples. Consequently, a part of the Chl *b* attributed to the Chlorophyceae could likely also originate from Mamiellales cells, which lead to an under estimation of the Prasinophyceae contribution in the pigment analysis.

M. pusilla was numerically the major component of the photosynthetic picoeukaryote community. It has previously been reported as a prominent member of the Barents Sea waters with abundances exceeding 10^4 cells.ml⁻¹ based on serial dilution cultures (Thronsen 1970, Thronsen & Kristiansen 1991). Moreover, the prominence of *M. pusilla* in nutrient rich waters (abundances ranging between 10^2 to 9×10^3 cell.ml⁻¹) was described from various sampling site and this species is usually described as ubiquitous (Thronsen 1969, Thomsen

Table IV-3: Species identified in culture using electronic and bright field microscopy from different stations of the cruise.

Station	Species in culture	Taxonomic affiliation
Z01	<i>Synechococcus</i> <i>Micromonas pusilla</i> non motile prymnesiophyte cf <i>Pavlova</i> (3-4 microns dorso-ventrally compressed) <i>Coccolithus</i> <i>Emiliana huxleyi</i> phototrophic pico flagellate nano sized flagellate with two unequal flagella and one bell shaped chloroplast nano sized heterokont flagellate with long trailing flagellum red filament red egg-shaped, 4x5 microns sometimes in filament (thick, twisted)	Cyanophyta Prasinophyceae Prymnesiophyceae Pavlovophyceae Prymnesiophyceae Prymnesiophyceae Unknown Unknown Unknown Unknown Unknown Unknown
Z11	<i>Synechococcus</i> Prasinophyceae <i>Chrysochromulina</i> sp. cf <i>Pelagococcus</i> gymnoid dinoflagellate (ca 3x8 microns)	Cyanophyta Prasinophyceae Prymnesiophyceae Pelagophyceae Dinophyceae
Z18	<i>Synechococcus</i> <i>Emiliana huxleyi</i> <i>Rhynchomonas</i> heterotrophic pico sized flagellate	Cyanophyta Prymnesiophyceae Bodonidae Unknown
M09	<i>Micromonas pusilla</i> <i>Imantonia rotunda</i> <i>Phaeocystis</i> sp. <i>Prorocentrum</i> cf <i>minimum</i> <i>Pseudonitzschia</i> sp. centric diatom <i>Pseudopedinella</i> spp <i>Paraphysomonas</i> cf. <i>Imperforata</i> non-motile pico eukaryote	Prasinophyceae Prymnesiophyceae Prymnesiophyceae Dinophyceae Diatomophyceae Diatomophyceae Dictyochophyceae Chrysophyceae Unknown
Z68	cf. <i>Micromonas</i> <i>Phaeocystis</i> <i>Pseudopedinella</i> spp.	Prasinophyceae Prymnesiophyceae Dictyochophyceae
Z59	<i>Synechococcus</i> cf. <i>Isochrysis</i> , non motile stage <i>Pseudopedinella</i> sp. with four chloroplasts	Cyanophyta Prymnesiophyceae Dictyochophyceae

& Buck 1998, Zingone et al. 1999). Based on an average content of 0.025 pg Chl *a* per cell (DuRand et al. 2002) and FISH quantification we estimated the contribution of this species to picoplanktonic biomass. Although this single species represented 32 % of the picoeukaryotes in Arctic waters, it represented only 7 % of the picoplanktonic Chl *a* biomass. This low contribution could be explained by the bias introduced by the amount of picoplanktonic Chl *a* due to disrupted diatoms cells. Conversely, numerical abundance (25 and 9 % of the picoeukaryotes) and contribution to photosynthetic biomass (33 and 6 %) corresponds better to the coastal/boundary stations and the Atlantic stations respectively. Such an important contribution to the picoplanktonic community in nutrient rich water confirms the expected key role of this *Micromonas pusilla* in the microbial ecology of coastal rich waters Chapitre III).

Bathycoccus prasinus was recorded in Arctic waters and reached significant abundances in coast influenced and mixed Atlantic/Arctic waters. Although this is the first report of *B. prasinus* from Arctic waters its presence was expected (Thronsen & Kristiansen 1991) as it has been previously recorded from various ecosystems (Johnson & Sieburth 1982, Silver et al. 1986, Eikrem & Thronsen 1990) and at some times of the year in significant abundances (Chapitre III). Its ecological importance could have been underestimated until now.

The highest Haptophyta abundances were detected in waters with more open oceanic features (e.g. Z61). Previous taxonomic studies, conducted in the same region using microscopy and the serial dilution culture method concluded that the predominant algal classes were Prasinophyceae and Haptophyta (Thronsen 1970). Furthermore, using pigment analyses small Haptophytes were proven to be common members and well adapted to open water conditions as well (Higgins & Mackey 2000). The distribution along the two transects of the pigments attributed to the haptophytes matched fairly well with the distribution of the Haptophyta obtained by FISH. Indeed, the Haptophyta species which have been detected in our culture isolates (e.g. *E. huxleyi*, *Phaeocystis* sp., *Chrysochromulina* sp.) are known to exhibit a high fucoxanthin to Chl *a* biomass ratio (max. 0.553 and 0.532 for the strains *E. huxleyi* CS-363 and *Phaeocystis antarctica* MSIA-1 respectively, (Zapata et al. 2004)). Those values match with the fucoxanthin to Chl *a* ratios used in the CHEMTAX algorithm. Moreover, the high fucoxanthin content allows the detection of those cells even at low densities. This is not the case of the Prasinophyceae for which the prasinoxanthin to Chl *a* ratio is much lower.

Then, even if they are less abundant than the Chlorophyta, the contribution of the Haptophytes pigmentary group to the picoplanktonic biomass was higher, probably because the Haptophytes are represented by bigger cells. Such a discrepancy between estimations of abundance and pigment concentration (or Chl *a* contribution) is well documented. For example, in the equatorial pacific, rDNA sequences of Prymnesiophyceae contributed to 1-12 % of the total 18S rDNA obtained by PCR with eukaryotic primers while this group contributed to 44-87 % of the Chl *a* biomass (Moon-van der Staay et al. 2000).

Acknowledgments.

Special thanks are due to Francisco Rodriguez for help with pigment analysis and helpful discussion. We would like to thank Carlos Pedrós-Alió for pigment sampling and Alexandra Worden for critically reading this manuscript as well. Thanks are also due to the F/F Johan Hjort crew for efficient assistance with the sampling as well as the Norwegian Marine Research Institute for kindly providing ship time. This work was funded by the programs: PICODIV supported by the European Union (EVK3-CT-1999-00021), PICMANCHE supported by the Région Bretagne and BIOSOPE supported by PROOF (CNRS). Fabrice Not was supported by a doctoral fellowship from the French Research Ministry.

CHAPITRE V

Les communautés de picoeucaryotes de l'océan Indien sub-équatorial

F. Not, P. Karleskind, D. Marie, F. le Gall, R. Massana, M. Latasa et D. Vaulot. Les communautés de picoeucaryotes de l'océan Indien sub-équatorial.

V-1 Introduction

Historiquement, l'importance du picoplancton a été établie en premier lieu pour les zones oligotrophes des océans où 95 % de la production primaire sont attribués à cette classe de taille (Raven 1998). Paradoxalement, si nous avons désormais quelques éléments de connaissance au sujet de la composition taxinomique des communautés de picoeucaryotes et de la contribution de certains taxons en zones côtières, il en va différemment des zones oligotrophiques. Les quelques études de la diversité des picoeucaryotes, soit par microscopie électronique soit par analyses pigmentaires, dans ce type de masses d'eau montrent que les Prymnesiophyceae et les Pelagophyceae sont des composants importants de la communauté picoeucaryotique (Andersen et al. 1996, Moon-van der Staay et al. 2000). Les organismes appartenant à la division des Chlorophyta quant à eux apparaissent moins fréquemment, ou dans des proportions insignifiantes (Letelier et al. 1993, Hooks et al. 1988).

Parmi les grandes zones oligotrophes de l'océan mondial, les études concernant l'océan Indien ont été les plus rares, comparativement aux océans Atlantique et Pacifique. Néanmoins, certaines zones de l'océan Indien ont fait l'objet d'études approfondies et parmi celles-ci, le nord de l'océan Indien (au nord de 10°S de latitude) soumis au régime des moussons et plus particulièrement la mer d'Arabie (Nord Ouest de l'océan Indien). Deux volumes spéciaux du journal Deep-Sea Research part II (1998 vol 45 issues 10-11, et 1999 vol 46 issues 8-9) ont été consacrés à cette partie de l'océan Indien. Il y est notamment démontré que le picoplancton contribue entre 35 et 92 % de la Chl *a* phytoplanctonique en allant de la côte vers les zones oligotrophes (Brown et al. 1999). En ce qui concerne les picoeucaryotes, leur nombre et leur contribution à la biomasse sont plus importante aux stations côtières (23 % de la biomasse de chl *a*, 20 000 cellules.ml⁻¹) qu'en zones oligotrophes (8,2 % de la biomasse de Chl *a* et 2 600 cellules.ml⁻¹), à l'inverse de ce qui est observé pour *Prochlorococcus* (270 000 cellules.ml⁻¹ et 50 % de la biomasse de Chl *a* en zone oligotrophique) (Brown et al. 1999).

La circulation des masses d'eau dans l'océan Indien présente certaines particularités, essentiellement dues aux caractéristiques géographiques de ce bassin. En effet, il est complètement fermé au nord par l'Asie et est ouvert à l'ouest permettant des apports d'eau, *via* une communication avec l'océan Pacifique Equatorial, qui pourraient avoir une influence importante sur le sud de l'océan (Reason et al. 1996). Une forte re-circulation à lieu dans la

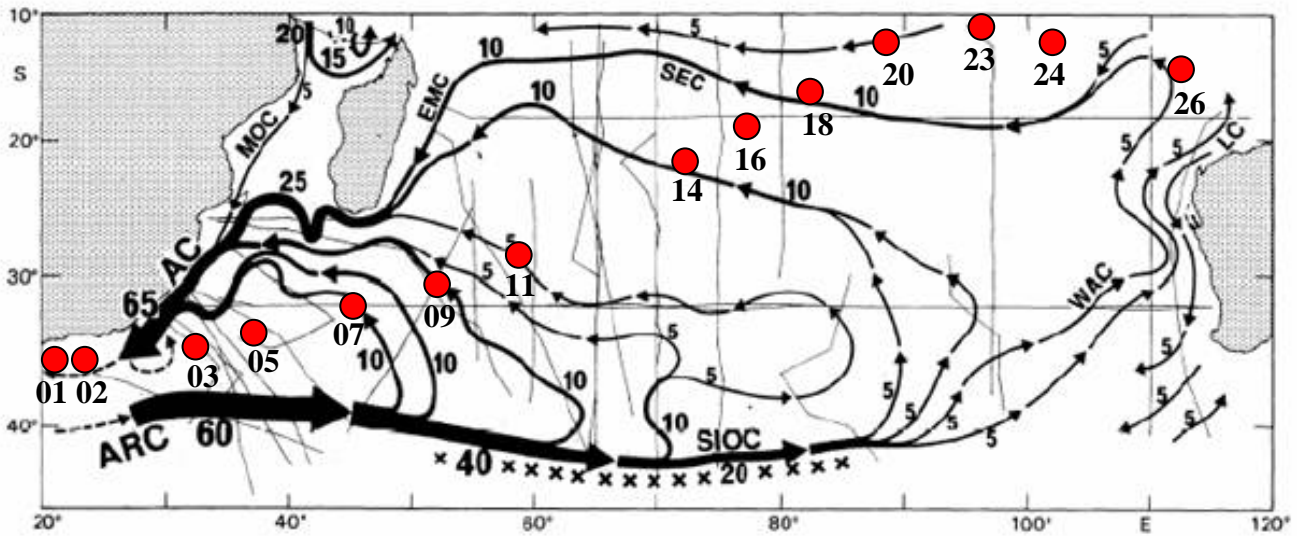


Figure V-1: Localisation des stations de prélèvements et circulation superficielle dans la partie sud de l’océan Indien. Les flèches indiquent la direction des courants et les nombres indiquent la quantité d’eau transportée en Sverdrup (1 Sverdrup = 10^6 m³/s). Abréviations : AC = Courant des Aiguilles, ARC = Courant retour des Aiguilles, SIOC = Courant sud de l’océan Indien, WAC = Courant ouest australien, LC = Courant de Leeuwin, SEC = Courant sud équatorial, EMC = Courant de l’est Madagascar, MOC = Courant du Mozambique. (Carte tirée de Stramma & Lutjeharms (1997)).

partie sud de l'Océan Indien, provenant des courants de retour des aiguilles et sud de l'Océan Indien (50-60 °E et 90°E) (Fig. V-1).

Lors d'une campagne océanographique le long d'un transect Ouest-Est au travers de l'Océan Indien subtropical, nous avons analysé la composition taxinomique des communautés de picoplancton.

V-2 Matériels et méthodes

Stations d'échantillonnages. La campagne océanographique VANC10MV, organisée par l'institut de recherche océanographique américain Scripps, s'est déroulée durant l'automne austral entre le 15 mai et le 15 juin 2003. Un transect au travers de l'océan Indien sub-équatorial au départ de Cape Town (Afrique du Sud) jusqu'à Port Hedland (Australie) a été effectué à bord du navire océanographique Melville (Scripps Institute of Oceanography, San Diego, USA). Quatorze stations de prélèvements (Table V-1) réparties dans les différentes masses d'eau rencontrées ont été étudiées (Fig. V-1). A chaque station, cinq profondeurs ont été sélectionnées, après examen du profil des paramètres hydrologiques et de fluorescence obtenu à la descente par l'intermédiaire d'un capteur CTD/fluorimètre "Seabird". Au cours de la remontée, il a été réalisé systématiquement deux échantillonnages au dessus du maximum profond de chlorophylle (DCM), un au niveau du DCM puis deux en dessous du DCM, le tout à l'aide de bouteilles Niskin de 15 litres.

Cytométrie. Des échantillons sont fixés à la fois à partir d'eau de mer brute et d'un filtrat d'eau de mer passé à travers un filtre d'une maille de 3 µm. Pour chacune de ces fractions, deux échantillons de 1,5 ml d'eau de mer sont fixés avec 0,1 % de glutaraldéhyde (6 µl de glutaraldéhyde 25 %) et 1 % de PFA (150 µL de PFA 10X). Puis les échantillons sont plongés dans l'azote liquide avant d'être placés à -80°C. Le dénombrement des cellules picoplanctoniques photosynthétiques a été réalisé à l'aide d'un cytomètre en flux FACSort (Becton Dickinson, San José, California), selon le protocole décrit par Marie et al. en 1999. Lorsque la fluorescence des *Prochlorococcus* n'était pas suffisante (le plus souvent pour les échantillons de surface), leur contribution a été estimées après marquage de l'ADN des cellules au SYBR Green (D. Marie, communication personnelle).

Table V-1: Coordonnées, température et salinité de surface, ainsi que profondeur des stations échantillonnées.

Stations	Latitude (Sud)	Longitude (Est)	Température (surface)	Salinité (surface)	Profondeur (m)
01	35°03'	23°44'	20,89	35,37	711
02	35°03'	24°34'	24,04	35,36	1472
03	35°49'	32°02'	21,23	35,68	3010
05	34°21'	37°41'	20,80	35,75	5139
07	33°17'	45°21'	20,91	35,73	1244
09	31°49'	52°36'	21,57	35,62	4762
11	29°51'	59°50'	21,76	35,68	3482
14	22°05'	72°44'	24,12	35,27	3806
16	19°44'	78°00'	25,84	34,67	5230
18	17°10'	83°40'	25,24	34,94	5646
20	13°57'	89°55'	27,43	34,23	5035
23	12°13'	96°47'	28,48	34,03	1440
24	13°11'	104°41'	27,96	33,87	5792
26	14°29'	113°27'	27,66	34,27	2804

Hybridation *in situ* fluorescente. Les fixations et filtrations pour les analyses d'hybridations *in situ* fluorescentes ont été faites selon le protocole indiqué dans le chapitre II de cette thèse. Brièvement, 90 mL d'eau de mer pré-filtrée sur 3 µm sont fixés au PFA 1 % (10 ml de PFA 10X) puis maintenus à 4°C pendant 1 heure. Cette eau est ensuite filtrée sur filtres Anodisc (0,2 µm, 25 mm) puis les filtres sont déshydratés dans une série de bains d'alcool de 3 minutes chacun (EtOH 50 % ; 80 % ; 100 %).

Les hybridations *in situ* en fluorescence ont été réalisées soit à bord du navire, soit de retour au laboratoire, à Roscoff. La méthode employée est exactement celle décrite dans le chapitre II de ce manuscrit de thèse. Les sondes spécifiques utilisées pour cette étude sont : les sondes EUK1209R, CHLO01 et NCHLO01 en mélange afin de cibler tout les eucaryotes, la sonde CHLO02 spécifique pour les Chlorophyta, la sonde PRYM02 spécifique pour les Haptophyta, la sonde PRAS04 spécifique pour les Mamiellales et les sondes MICRO01, BATHY01 et OSTREO01 spécifiques respectivement pour les espèces *Micromonas pusilla*, *Bathycoccus prasinus* et *Ostreococcus tauri*. Les lames issues des hybridations *in situ* ont été observées sous un microscope à épifluorescence (Olympus BX51) équipé d'une lampe à vapeur de mercure. Les comptages ont été réalisés sous l'objectif 100. Selon la quantité de cellules hybridées, deux méthodes différentes mais équivalentes sont utilisées pour le comptage: lorsque le filtre contient beaucoup de cellules, le comptage est effectué sur quinze champs pris aléatoirement (un champ étant délimité par le quadrillage de l'objectif). Lorsque le filtre contient peu de cellules, on effectue alors un transect de la largeur du quadrillage de l'objectif (100 µm) d'un bord à un autre du filtre.

V-3 Résultats

Hydrologie. D'après les données physico-chimiques, deux masses d'eau sont clairement distinguées le long du transect. La première, des stations 01 à 11, présente des températures relativement faibles (< 22 °C), et une salinité homogène (35,5) dans la colonne d'eau. Au sein de cette masse d'eau on peut distinguer d'une part les stations 01 et 02, les plus proches des côtes africaines et soumises à l'influence du courant des Aiguilles et d'autre part les stations 03 à 11 qui se trouvent dans une zone importante de re-circulation d'eau provenant du courant retour des Aiguilles (Fig. V-1). La seconde masse d'eau, des stations 14 à 26, présente une stratification bien plus nette. La température élevée en surface (26-27 °C)

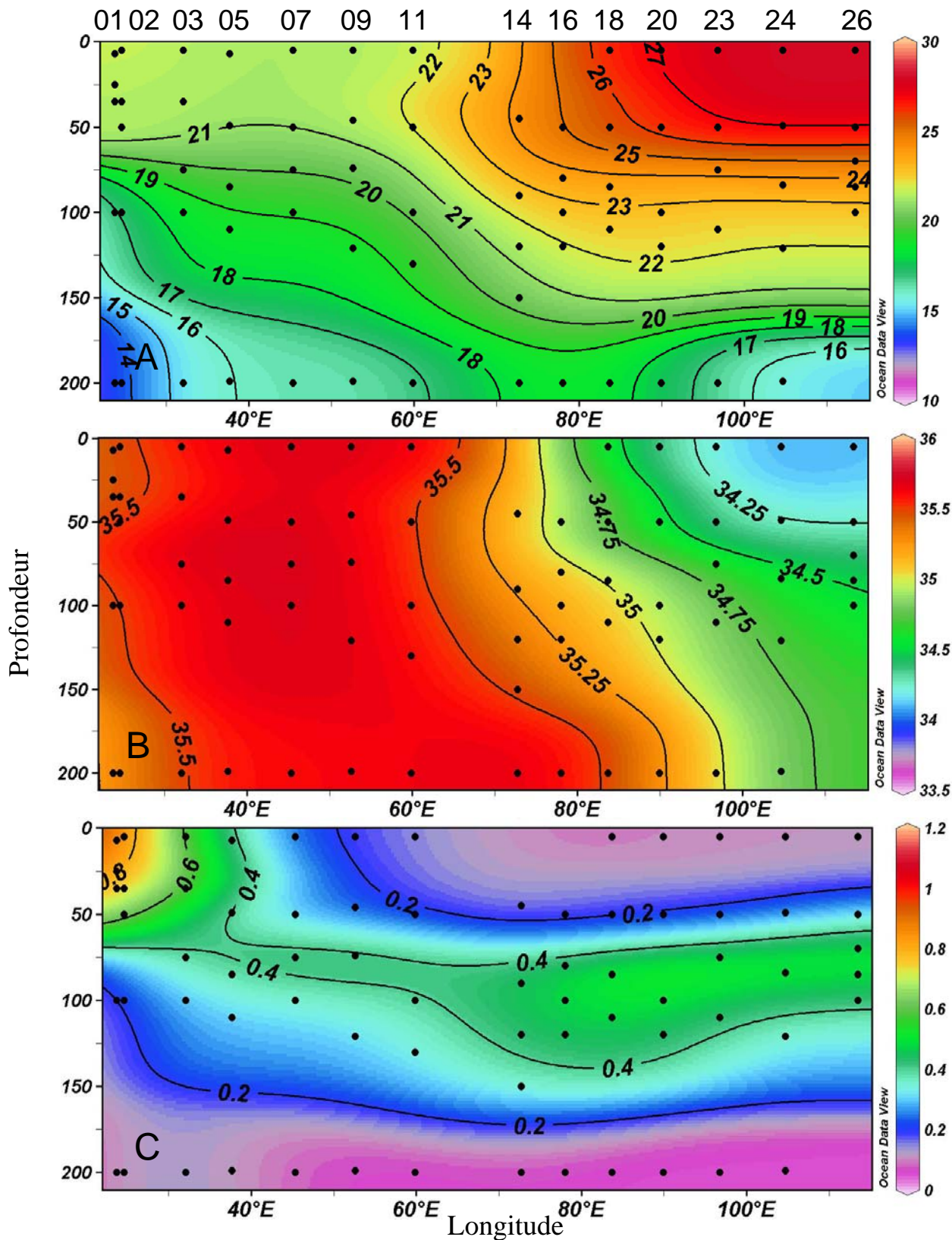


Figure V-2: Représentation de la température en °C (A), de la salinité (B) et de la concentration en Chl *a* totale en $\mu\text{g.L}^{-1}$ estimée par la fluorescence (C) le long du transect Ouest/Est en fonction de la profondeur (m). Les points noirs localisent les profondeurs échantillonnées. Figure réalisée à l'aide du logiciel Ocean Data View.

décroît rapidement en dessous de 50 m de profondeur (Fig. V-2 A). Dans cette même zone, la salinité est faible en surface (34,25) et augmente à partir de 50 m (Fig. V-2 B). Ces stations 14 à 26 sont sous l'influence principale du courant sud équatorial et dans une moindre mesure de la re-circulation du courant sud de l'océan Indien, qui forme le gyre subtropical du sud de l'océan Indien (Fig. V-1).

Les données de fluorescence indiquent de fortes concentrations de Chl *a* en surface, le long des côtes africaines (1,3 et 1,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ aux stations 1 et 2 respectivement). Ces concentrations décroissent rapidement avec la profondeur pour atteindre 0,037 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à 200 m. Entre les stations 7 et 26, le profil est totalement différent. Les valeurs de Chl *a* sont très faibles ($< 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$) en surface et un maximum profond de chlorophylle ($> 0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$) est observé entre 75 et 80 m (Fig. V-2 C).

Cytométrie en flux. Les dénombrements cellulaires obtenus par cytométrie en flux pour la fraction inférieure à 3 μm montrent des variations selon les masses d'eau considérées (Fig. V-3 A, B et C). Les stations 01 et 02, présentent de fortes densités de *Synechococcus* (30 000 cellules. ml^{-1}) et picoeucaryotes (8 000 cellules. ml^{-1}). Entre les stations 03 à 11, on note une augmentation progressive de l'abondance des cyanobactéries appartenant au genre *Prochlorococcus* alors que les densités de *Synechococcus* décroissent fortement (de 30 000 à 2 500 cellules. ml^{-1}). Les picoeucaryotes quant à eux présentent à la fois une diminution de leurs abondances maximales (1 000 cellules. ml^{-1}) et un enfoncement de ce maximum (de la surface à 75 m de profondeur). En zone oligotrophe (des stations 14 à 26) l'abondance des cellules appartenant au genre *Prochlorococcus* est très importante dans les 50 premiers mètres ($> 200\ 000$ cellules. ml^{-1}) puis décroît fortement entre 50 et 100 mètres (Fig. V-3 A). Les cellules du genre *Synechococcus* sont pratiquement absentes dans cette masse d'eau bien que l'on observe une légère augmentation de leur abondance à la station 26 (Fig. V-3 B). Les picoeucaryotes sont présents en faible quantité dans les eaux de surfaces et présentent des abondances maximales stables de l'ordre de 1 000 cellules. ml^{-1} en profondeur (entre 75 et 125 m, Fig. V-3 C). On peut remarquer également que les stations les plus à l'est (stations 23, 24 et 26) présentent une augmentation modérée de la concentration de picoeucaryotes ainsi qu'une légère remontée vers la surface des maximums d'abondances.

Hybridation *in situ*. Suite à des problèmes survenus lors de la fixation des échantillons aux stations 20 à 23 (dépôt d'un précipité blanc sur les filtres), les résultats

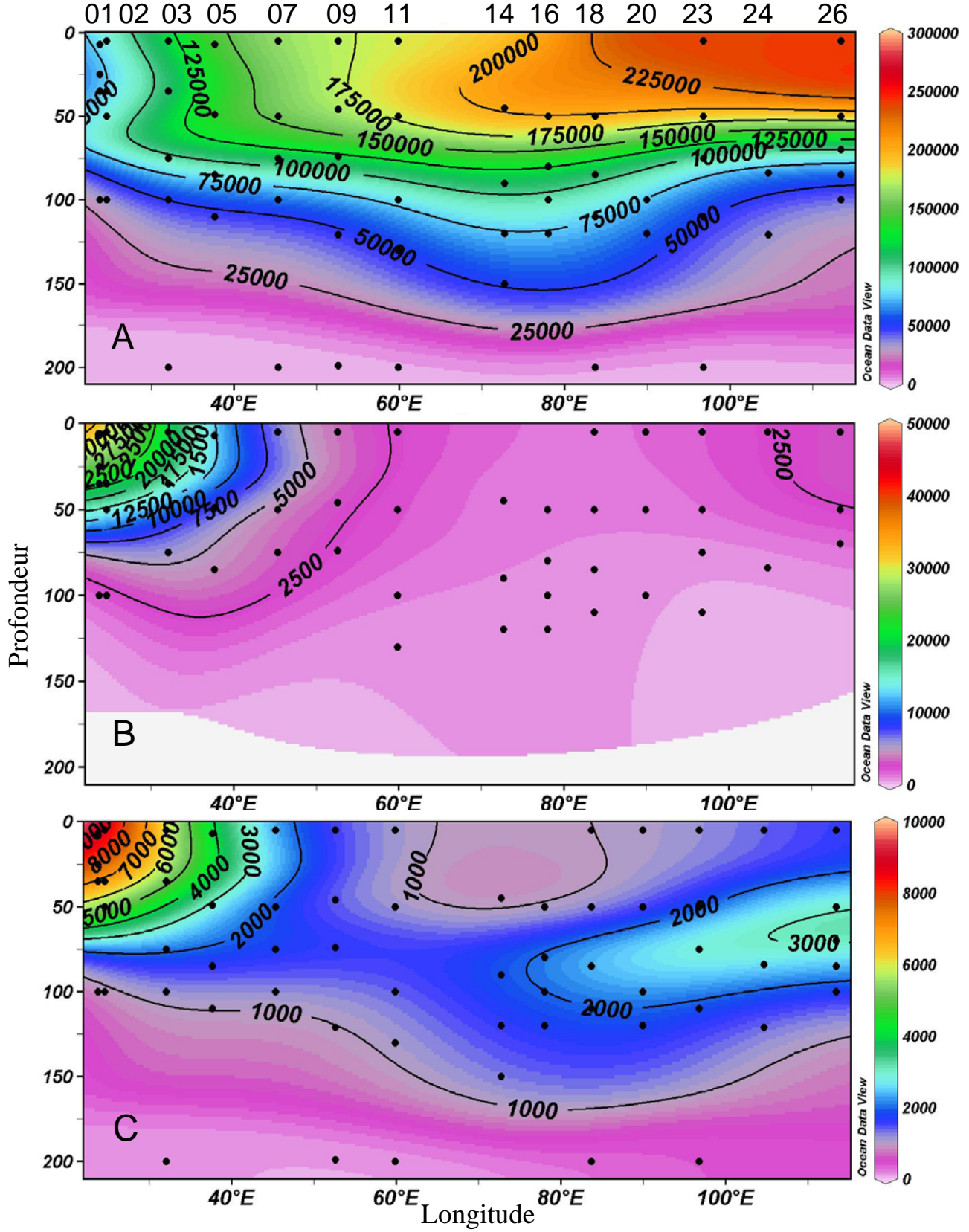


Figure V-3: Représentation des densités de *Prochlorococcus* (A), *Synechococcus* (B) et picoeucaryotes (C) estimées par cytométrie en flux, en nombre de cellules par millilitre, le long du transect Ouest/Est en fonction de la profondeur (m). Les points noirs localisent les profondeurs échantillonnées. Figure réalisée à l'aide du logiciel Ocean Data View.

obtenus par hybridation *in situ*, pour ces stations, ne sont pas pris en compte dans notre analyse.

La distribution des organismes appartenant à la division Chlorophyta est en phase avec celle des eucaryotes. En surface, aux stations les plus côtières (01 et 02), ils atteignent des densités de 4 000 cellules.ml⁻¹ et représentent jusqu'à 60 % des picoeucaryotes. Dans la zone oligotrophique, ces mêmes Chlorophyta ont des densités moindres (< 500 cellules.ml⁻¹) et ne contribuent plus qu'à 2 % des picoeucaryotes à la station 14 en surface et 20 % au maximum profond de chlorophylle (Fig. V-4 B).

Tout au long du transect effectué, les Haptophyta ne sont présentes en quantité significative que dans les 75 premiers mètres de la colonne d'eau (Fig. V-4 C). Bien que leur abondance décroissent de la zone côtière vers le gyre océanique (1 200 à 150 cellules.ml⁻¹), elles représentent toujours une proportion importante des picoeucaryotes au dessus du DCM (jusqu'à 36 % à la station 09) alors qu'elles ne contribuent que faiblement à cette communauté en profondeur. Cela est particulièrement prononcé pour les stations les plus oligotrophiques où elles contribuent à 15 % de la communauté en surface et 2 % au maximum profond de chlorophylle à la station 18 (Fig. V-5 A et B).

Au sein des Chlorophyta nous avons estimé la contribution de trois des espèces qui appartiennent à l'ordre des Mamiellales (Prasinophyceae), *Micromonas pusilla*, *Bathycoccus prasinus* et *Ostreococcus tauri*. De même que pour les Chlorophyta et plus généralement les picoeucaryotes, on observe une abondance significative de l'espèce *M. pusilla* aux stations les plus proches des côtes (> 750 cellules.ml⁻¹ soit 19 % des picoeucaryotes à la station 01 en surface) puis une décroissance rapide et un enfoncement pour ne retrouver que très peu de cellules au niveau du gyre et ce, même en profondeur (Fig. V-6 A). L'espèce *B. prasinus*, présente des abondances moindres (200 cellules.ml⁻¹) mais le même type d'évolution spatiale le long du transect. Cependant les abondances maximales de *B. prasinus* sont observées plus en profondeur que pour l'espèce *M. pusilla* (Fig. V-6 B). En ce qui concerne l'espèce *O. tauri*, elle est toujours rencontrée en faible densité (< 100 cellules.ml⁻¹). Cependant malgré le faible nombre de cellules observées une tendance à l'enfoncement du maximum d'abondance et observé lorsque l'on s'avance vers les stations les plus oligotrophes (Fig. V-6 C) de notre étude.

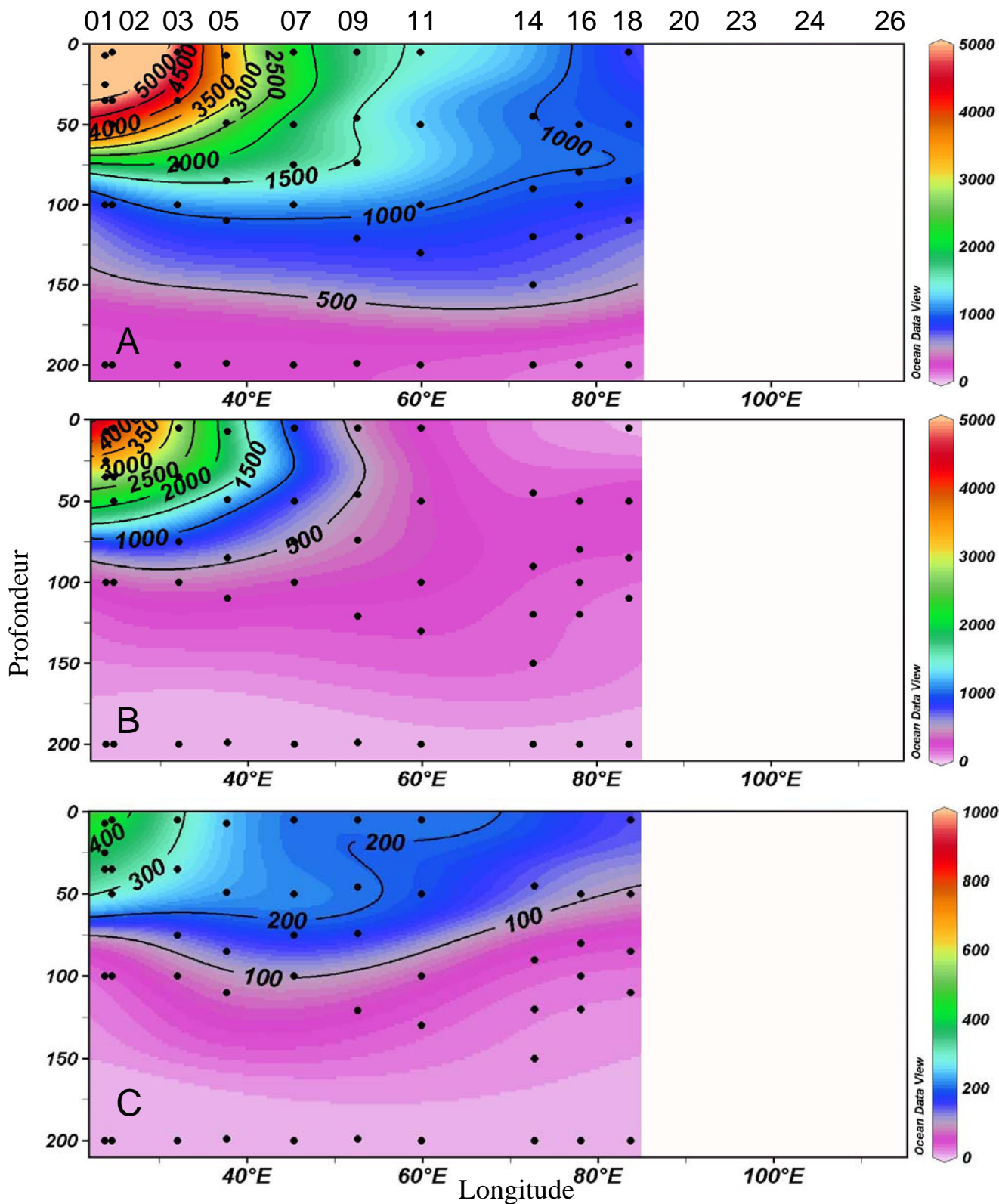


Figure V-4: Représentation des densités (en nombre de cellules par millilitre) de picoeucaryotes (A), de Chlorophyta (B), et d'Haptophyta par millilitre (C), estimées par TSA-FISH le long du transect Ouest-Est, en fonction de la profondeur (m). Les points noirs localisent les profondeurs échantillonnées. Figure réalisée à l'aide du logiciel Ocean Data View.

V-4 Discussion

Composition du picoplancton et degrés d'oligotrophie. Lors de cette étude, nous avons pu identifier 36 % des cellules de la communauté de picoeucaryotes comme appartenant aux divisions des Chlorophyta et des Haptophyta. Cette proportion est faible en comparaison des études menées précédemment où 63 % des cellules de picoeucaryotes peuvent être attribuées aux Chlorophyta et Haptophyta des mers arctiques du nord de l'Europe (Chapitre IV) et pas moins de 85 % (moyenne annuelle) des cellules appartiennent aux seuls Chlorophyta au large de Roscoff (Chapitre III). Cependant, alors que les précédentes études ont eu lieu en milieux relativement riches en nutriments (ou présentant des biomasses de Chl *a* élevées), la plupart des stations étudiées ici sont situées dans des régions plus oligotrophes. Ces résultats mettent donc en évidence une disparité de la composition taxinomique des communautés de picoeucaryotes en fonction de la teneur en sels nutritifs du milieu. Alors que les Chlorophyta (et plus précisément l'espèce *M. pusilla*) dominent fortement les zones côtières, on peut se demander si les zones océaniques sont plus diversifiées, ou si elles sont dominées par un taxon qui n'a pas encore été quantifié à ce jour. De précédentes études en milieu oligotrophe ont suggéré l'importance des Pelagophyceae (Andersen et al. 1996), il serait donc intéressant de rechercher la présence de ces organismes à l'aide de sondes spécifiques par FISH et plus généralement d'appliquer un jeu de sondes plus important sur les échantillons provenant de milieux oligotrophes afin de pouvoir identifier et quantifier les autres taxons présents.

Distribution des Chlorophyta et des Prasinophyceae. Les Chlorophyta en surface dans le courant côtier des Aiguilles ont une densité comparable à celle observée à l'automne dans une région tempérée côtière telle que Roscoff (autour de 2 000 cellules.ml⁻¹, Chapitre III). Cette densité cellulaire est bien supérieure à celle observée dans le gyre subtropical Indien (entre 200 et 500 cellules.ml⁻¹ au DCM). Par ailleurs, notre étude montre que les maxima de densité des Chlorophyta s'enfoncent en suivant le maximum profond de chlorophylle où ces organismes contribuent à 20 % des picoeucaryotes. Dans le Pacifique Nord (24°N) en milieu oligotrophe, il a été montré que la chlorophylle *b* (pigment marqueur des Chlorophyta) était un des pigments majoritaires au bas de la zone euphotique (Ondrusek

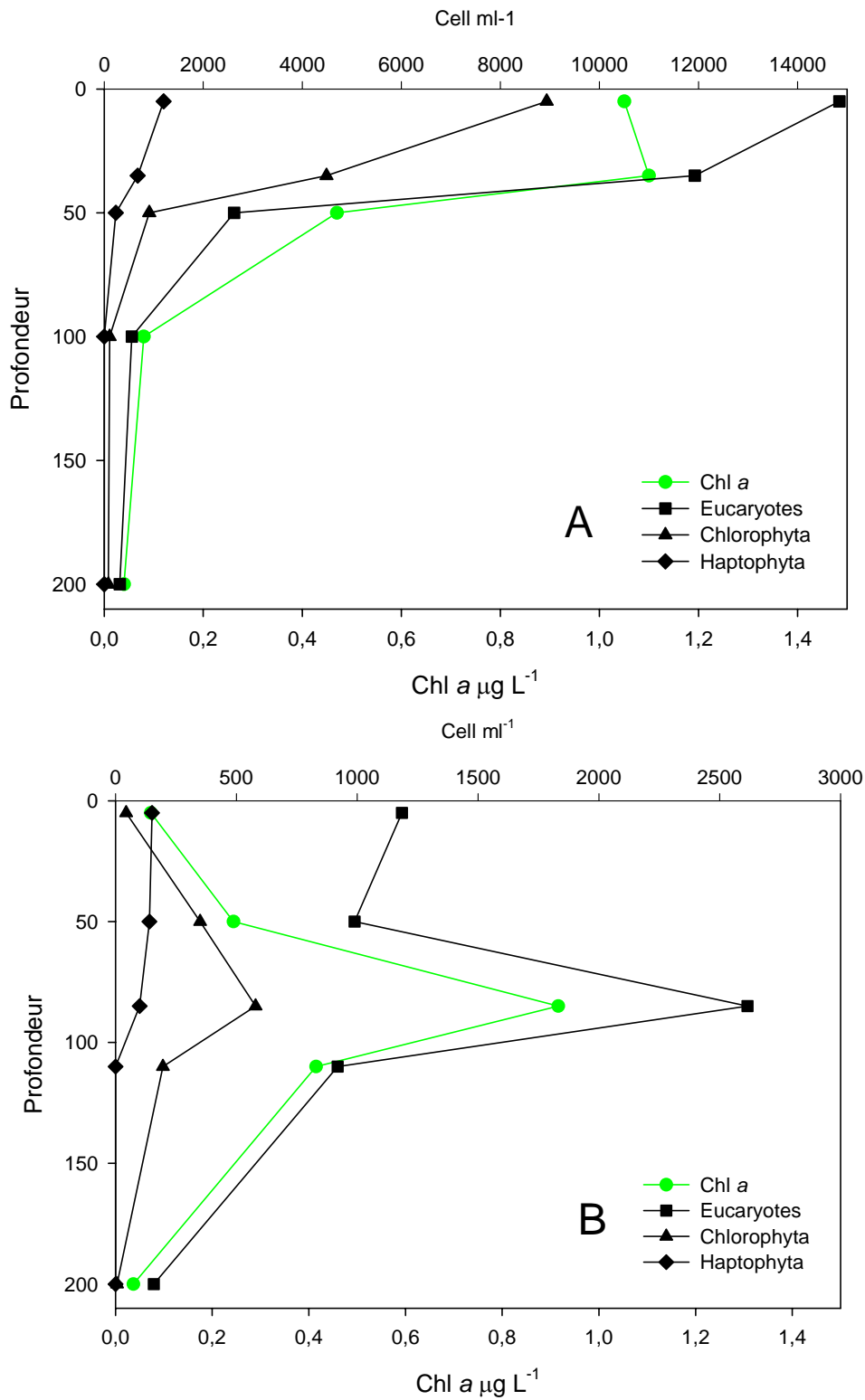


Figure V-5: Profils verticaux représentant la concentration de Chl *a* estimée par le capteur CTD, l'abondance des eucaryotes, des Chlorophyta et des Haptophyta estimés par TSA-FISH aux stations 02 côtière (A) et oligotrophe 18 (B).

et al. 1991). Ondrusek et al. (1991) expliquent cela par des adaptations pigmentaires des algues à Chl *b* (concentration élevée de pigments par cellules) qui leur permettraient de capter de façon optimale le faible niveau de lumière en profondeur.

Nos résultats montrent un faible nombre de cellules appartenant aux Mamiellales au niveau du DCM. Ceci est en concordance avec les résultats d'analyses pigmentaires dans le Pacifique Equatorial, montrant que les Prasinophyceae ne constituent qu'une faible partie (<1 % de la Chl *a* total au DCM) de la biomasse (Letelier et al. 1993, Bidigare & Ondrusek 1996). La baisse d'abondance des Prasinophyceae lorsque l'on va des côtes vers le large, c'est-à-dire des zones riches en nutriments aux zones oligotrophes correspond au schéma suggéré par Thomsen & Buck (1998) pour les Prasinophyceae pico- et nanoplanctoniques, au regard des analyses pigmentaires (Hooks et al. 1988, Letelier et al. 1993, Andersen et al. 1996) et des analyses par microscopie électronique (Thomsen & Buck 1998). La question de l'affiliation taxinomique des Chlorophyta rencontrées au niveau du DCM reste entière.

Abondances et distributions des espèces de Mamiellales. Au cours de notre étude nous retrouvons l'espèce *Micromonas pusilla*, dans chacune des masses d'eau où les Chlorophyta sont présents. Ceci confirme que cette espèce est très ubiquiste et pourrait être l'espèce marine eucaryote la plus abondante (Thronsen 1976, Thomsen & Buck 1998). Cependant si la contribution de *M. pusilla* au sein de la communauté de picoeucaryotes est significative en zone côtière (13 % des cellules à la station 02, contre 3 % au DCM de la station 11), celle-ci reste nettement inférieure à la contribution de cette espèce aux communautés des eaux côtières de Roscoff où elle représente 34 % des picoeucaryotes à la même saison (entre 13 % et 82 % au cour d'une année, Chapitre III).

L'espèce *O. tauri*, isolée dans l'étang de Thau (Courties et al. 1994), est également détectée en Méditerranée (Diez et al. 2001a), dans les eaux côtières de l'Atlantique Nord (O'Kelly et al. 2003 et Chapitre III) et du Pacifique (Worden et al. 2004). Cependant elle n'a jamais été observée en milieu oligotrophe. Bien que le nombre de cellules d'*O. tauri* détectées soit faible, on observe une tendance nette à l'enfoncement des populations au niveau du DCM sans diminution d'abondance. Les travaux de physiologie (adaptation à différentes intensités lumineuses, Fransisco Rodriguez, en préparation) et de génomique actuellement en cours sur cet organisme, devraient permettre de mieux comprendre sa répartition dans la colonne d'eau et sa distribution géographique.

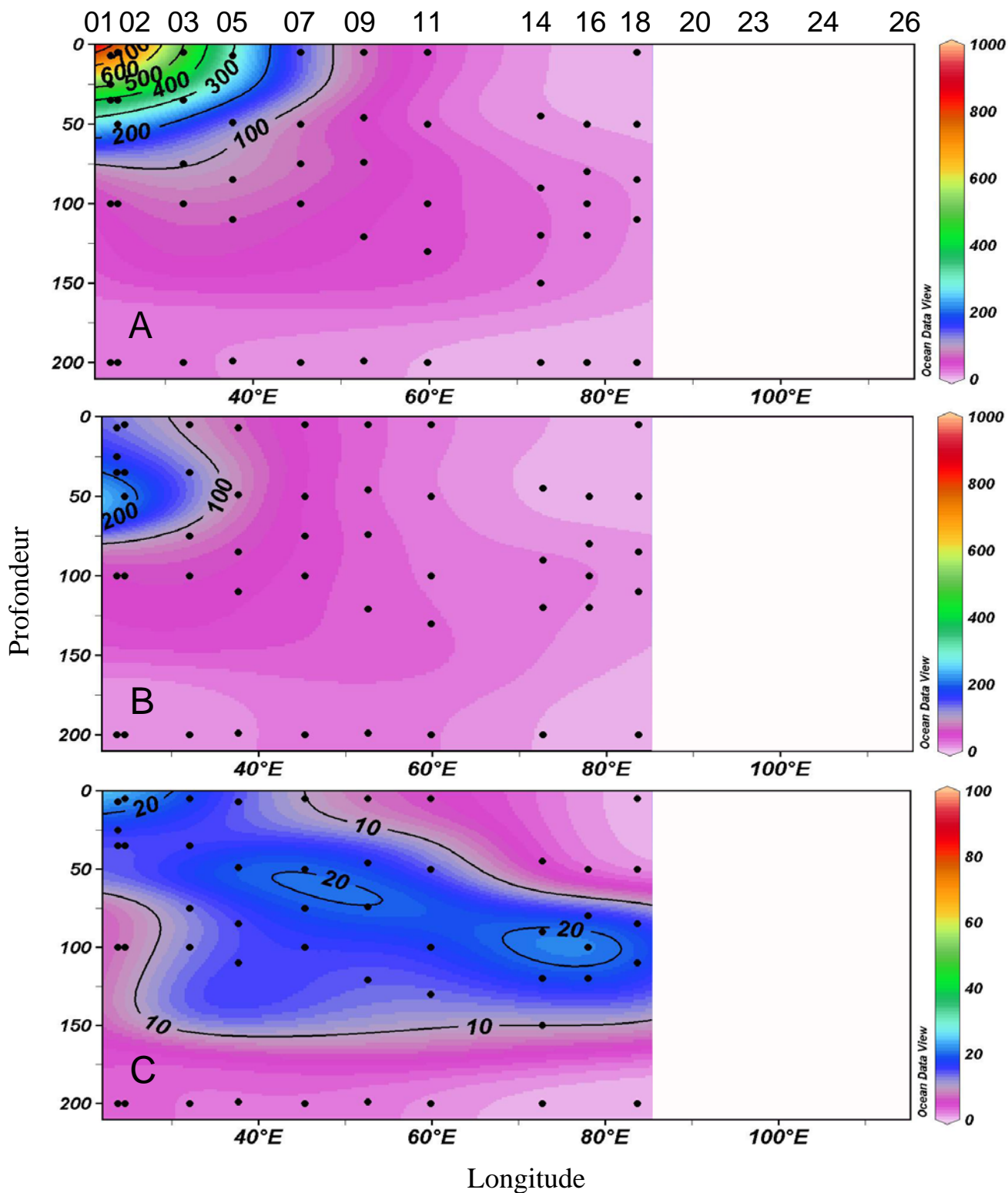


Figure V-6: Représentation des densités de *Micromonas pusilla* (A), *Bathycoccus prasinos* (B) et *Ostreococcus tauri* (C) en nombre de cellules par millilitre, estimées par TSA-FISH le long du transect Ouest-Est en fonction de la profondeur (m). Les points noirs localisent les profondeurs échantillonnées. Figure réalisée à l'aide du logiciel Ocean Data View.

Distribution et contribution des Haptophyta. Toutes les études fondées sur les signatures pigmentaires suggèrent une contribution importante des haptophytes en zone oligotrophe. Par exemple, dans le Pacifique Equatorial les haptophytes contribuent à hauteur de 30-40 % à la biomasse de Chl *a* dans les 100 premiers mètres de la colonne d'eau (Mackey et al. 1998). De même, à la station ALOHA, proche d'Hawaii, les haptophytes contribuent à 22 % de la biomasse totale de Chl *a* au niveau du DCM (Letelier et al. 1993). Leur contribution à l'abondance totale des eucaryotes photosynthétiques, estimée par comptage en microscopie électronique, varie entre 10 et 50 % le long d'un profil vertical (Andersen et al. 1996). D'après les résultats de notre étude, les Haptophyta sont en proportion non négligeable dans le gyre subtropical Indien en surface (13 à 36 % des cellules avec 140 à 300 cellules.ml⁻¹). Dans le courant des Aiguilles, bien que plus nombreuses (675 cellules.ml⁻¹), les Haptophyta ont une contribution moindre au nombre total de picoeucaryotes (1 à 19 % des cellules).

La technique du Dot-Blot appliquée à des échantillons provenant du Pacifique Equatorial (transect entre 0°-15° Sud à 150° Ouest) a suggéré une contribution des Haptophyta (détectés par la sonde PRYM02) aux ADNr 18S totaux (obtenus par PCR avec des sondes générales eucaryotes) comprise entre 3,2 % et 7,3 % à 15 mètres de profondeur et entre 1,6 % et 5,7 % vers 75 mètres (Moon-van der Staay et al. 2000). Dans le Pacifique Equatorial, comme dans l'océan Indien, la contribution des Haptophyta est plus importante en surface qu'en profondeur. Cette répartition dans la colonne d'eau pourrait être expliquée par l'absence de photo-inhibition. Ceci a été démontré en culture pour certaines espèces de Prymnesiophyceae nanoplanctoniques telles que *Emiliana huxleyi* pour des valeurs d'éclairement élevées (1500 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Mackey et al. 1998). Ainsi ces espèces gardent des capacités photosynthétiques élevées alors que pour la plupart des autres espèces d'algues, une photo-inhibition est observée.

Nos travaux sur le picoplancton de l'océan Indien nous ont permis de mettre en évidence les différences de structure des communautés de picoeucaryotes qui existent entre des masses d'eau plus ou moins oligotrophes. Nos résultats montrent que les cellules de Chlorophyta sont les plus nombreuses en zones côtières (où l'espèce *M. pusilla* domine) et au maximum profond de chlorophylle. Les Haptophyta ont une contribution plus importante dans la partie supérieure de la colonne d'eau des zones oligotrophes.

CHAPITRE VI

Conclusions et perspectives

VI-1 Considérations méthodologiques

L'hybridation *in situ* fluorescente est à l'heure actuelle la seule technique qui permette à la fois l'identification taxinomique et le dénombrement des organismes picoeucaryotiques dans l'environnement. Cette technique de biologie moléculaire qui s'applique sur des cellules entières ne nécessite pas d'étapes d'extraction de matériel génétique et est particulièrement facile à mettre en œuvre. En effet cette méthode ne demande pas d'investissements matériels lourds et l'on obtient un résultat après une journée d'expérimentation. Ces aspects pratiques nous ont permis de réaliser des hybridations *in situ* à bord du navire océanographique sur lequel nous avons effectué les prélèvements dans l'océan Indien. Ces différents aspects pratiques sont d'une grande importance pour l'application efficace d'une technique d'analyse en océanographie. Cependant cette technique comporte également des limites clairement identifiées qu'il convient d'avoir en mémoire lors de l'analyse des données (Amann & Ludwig 2000). Plusieurs pistes doivent être explorées pour repousser ces limites.

VI-1-A Limites

La qualité des résultats quantitatifs issus de l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique dépend, en premier lieu, de la qualité des bases de données qui sont utilisées pour le choix des signatures phylogénétiques du groupe cible. Plus une base de données couvre la diversité phylogénétique du groupe cible et des groupes qui lui sont proches, plus celle-ci est de bonne qualité et plus le choix des sondes pourra être fait avec confiance. Cependant même si une séquence est strictement spécifique *in silico*, il est absolument nécessaire de tester sur des espèces en culture les sondes nouvellement dessinées, notamment pour vérifier leur pénétration dans les cellules et ce particulièrement avec la méthode TSA-FISH qui nécessite la pénétration d'une enzyme de taille importante (40 000 daltons). La dépendance de l'intensité de fluorescence en fonction de l'état physiologique de l'organisme recherché, constitue une autre source de limitation. Cette intensité est directement corrélée au nombre de ribosomes, et donc de sites de fixation disponibles pour les sondes dans la cellule. Toutefois, l'utilisation d'un système d'amplification de la fluorescence, tel que le TSA, permet de s'affranchir en grande partie de ce biais. Ainsi nous avons pu montrer que des cellules

prélevées en phase plateau de la courbe de croissance, présentent des niveaux de fluorescence acceptables et peuvent être détectées en milieu naturel.

L'application massive de cette méthode dans le domaine de l'océanographie biologique souffre actuellement du manque d'automatisation du protocole expérimental, que ce soit au niveau de l'hybridation en elle même ou de l'acquisition puis de l'analyse des résultats. Des travaux sont actuellement en cours dans plusieurs laboratoires et entreprises pour essayer de s'affranchir de ces limitations techniques.

VI-1-B Perspectives d'automatisation de la méthode

Une automatisation partielle du protocole d'hybridation *in situ* est actuellement commercialisée par la société TECAN (<http://www.tecan.com>). Cependant ce protocole est développé pour des hybridations sur des tissus et de nombreuses adaptations sont nécessaires à son application sur des micro-organismes issus du milieu naturel. Cependant pour augmenter les capacités d'application du FISH sur le milieu naturel il est critique d'améliorer la capacité et la vitesse d'acquisition des données. Pour ce qui est des hybridations réalisées sur filtre, le facteur limitant se situe au niveau de la détection et du comptage des cellules hybridées, fastidieux et dépendant de l'observateur. La société CHEMUNEX (<http://www.chemunex.com>), en partenariat avec le laboratoire du Pr P. Lebaron (Banyuls-sur-Mer), a développé un système de cytométrie en phase solide (CHEMSCAN) qui permet la détection de la fluorescence et le dénombrement des événements fluorescents sur filtres. Ce système qui a d'ores et déjà trouvé des applications en microbiologie (Pougnard et al. 2002), (Broadaway et al. 2003) nécessite certaines conditions (ex : absence totale de bruit de fond sur le filtre) qui rendent son application délicate lorsque l'on utilise la méthode TSA-FISH pour la détection des cellules.

Une autre voie, permettant d'augmenter les capacités d'analyses de la diversité des micro-organismes en milieu naturel, est la combinaison de l'hybridation *in situ* en milieu liquide et de la cytométrie en flux. Cette association s'est révélée très efficace et a été employée pour les communautés bactériennes (Wallner et al. 1993, Veal et al. 2000). Cependant l'utilisation de sondes mono-marquées ne permettant pas l'obtention d'un signal fluorescent suffisamment élevé pour passer outre le bruit de fond provoqué par le milieu naturel, et l'autofluorescence naturelle de la chlorophylle contenue dans les cellules, cette association s'est avérée inadaptée à l'étude des picoeucaryotes dans l'environnement (Simon et al. 1995). L'application récente du TSA-FISH aux picoeucaryotes a ouvert de nouvelles

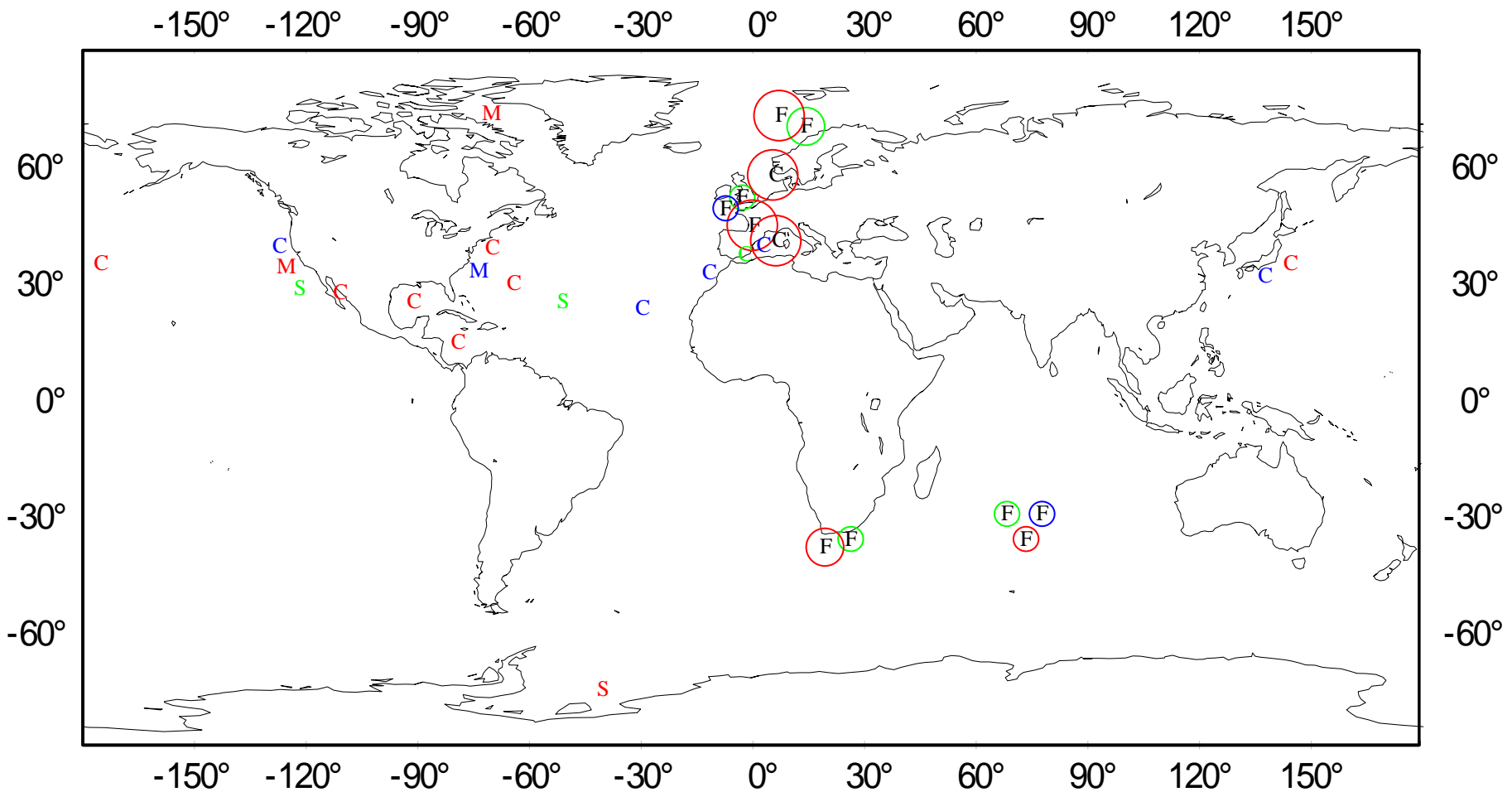
voies et a permis le développement d'une méthode combinant le TSA-FISH et la cytométrie en flux pour l'étude des communautés de picoeucaryotes (Biegala et al. 2003) (voir Annexe I). Cette technique qui permet également l'accès à des informations sur la taille ou le cycle cellulaire des cellules hybridées, est particulièrement adaptée à l'étude en routine des communautés naturelles dont on connaît la composition taxinomique. En revanche, le TSA-FISH sur filtre est bien plus simple à mettre en œuvre et permet l'observation des cellules par microscopie, ce qui est préférable lorsque l'on s'intéresse à des communautés inconnues.

VI-1-C Développements méthodologiques récents pour l'analyse de la diversité à grande échelle

D'autres techniques de biologie moléculaire sont actuellement en cours de développement pour l'étude de la diversité des picoeucaryotes. Bien que celles-ci permettent des analyses taxinomiques et quantitatives plus massives, aucune ne permet une quantification précise (i.e. un nombre de cellule par millilitre). Parmi ces techniques, on peut citer la PCR quantitative qui, appliquée à des échantillons de Méditerranée avec des sondes ciblant les Prasinophyceae, donne de bons résultats (Zhu et al. en préparation) mais où l'on retrouve les biais d'extractions de l'ADN et de PCR évoqués en introduction de cette thèse. Une autre technique, consiste en l'utilisation de puces à ADN sur lesquelles est immobilisé tout un jeu de sondes et sur lesquelles on applique un extrait d'ADN environnemental. Cette technique a fait l'objet de développements méthodologiques au cours du programme européen PICODIV. Les étapes de PCR nécessaires à l'amplification de l'ADN environnemental ont montrés l'introduction de biais dans la spécificité des signaux obtenus. De plus, des travaux de mises au point au niveau de la spécificité des sondes et de l'intensité du signal obtenu doivent être réalisés avant de pouvoir appliquer cette technique dans le milieu naturel (Kerkmann & Medlin en préparation).

VI-2 Perspectives écologiques

L'un des problèmes les plus important en écologie microbienne est d'arriver à quantifier efficacement et de façon spécifique les composants d'une communauté dans le milieu naturel. L'obtention de telles données constitue le point de départ de toute étude



Micromonas pusilla

Ostreococcus tauri

Bathycoccus prasinos

○ < 1000 cellules.ml⁻¹

○ 1000 à 10000 cellules.ml⁻¹

○ > 10000 cellules.ml⁻¹

Figure VI-1: Biogéographie des trois espèces de Mamiellales (Prasinophyceae) *Micromonas pusilla*, *Bathycoccus prasinos* et *Ostreococcus tauri*, fondée sur la compilation des résultats obtenus durant cette thèse ainsi que ceux disponibles dans la littérature. Présence observé par FISH (F), Microscopie (M), Culture (C) et dans les banques de séquences (S).

écologique. Lors de cette thèse, après quelques adaptations méthodologiques, nous avons pu apporter certains éléments de réponse quant à la question de la biogéographie et de la contribution des Prasinophyceae et, dans une moindre mesure, des Haptophyta au sein des communautés naturelles de picoeucaryotes (Fig. VI-01).

VI-2-A Les picoeucaryotes photosynthétiques sont plus nombreux mais moins divers que les hétérotrophes

De façon générale, les résultats récents obtenus dans le milieu naturel par les techniques de biologie moléculaire fondées sur l'analyse de séquences obtenues après amplification par PCR sur du matériel génétique extrait, tendent à prouver que ces analyses surestiment la contribution des protistes hétérotrophes tels que les alvéolés ou les straménopiles aux communautés d'eucaryotes. Le matériel génétique des cellules hétérotrophes serait en général d'accès plus facile (Guillou et al. soumis). Ainsi, alors que ces études montrent que 84 % de séquences appartiennent à des groupes hétérotrophes en milieu côtier (Vaulot et al. 2002), les résultats de FISH ou de marquage au DAPI indiquent une contribution des hétérotrophes à environ 15-20 % de la communauté picoeucaryotique (Massana et al. 2002, Chapitre IV). Comme cela a pu être démontré pour des bactéries du genre *Cytophaga*, il semblerait que l'importante diversité observée par clonage-séquençage ne reflète pas la contribution des groupes de picoeucaryotes présents (Cottrell & Kirchman 2000, Kirchman 2002). Ainsi, les analyses des séquences obtenues après extraction, PCR puis clonage d'échantillons naturels de picoplancton côtier (Station ASTAN, Roscoff) suggèrent que les picoeucaryotes hétérotrophes sont largement dominants et que parmi les picoeucaryotes photosynthétiques, *Ostreococcus tauri* est majoritaire (Romari & Vaulot 2004) Au contraire, les analyses quantitatives par FISH montrent que les picoeucaryotes autotrophes sont majoritaires et que l'espèce *M. pusilla* est largement dominante, *O. tauri* n'apparaissant que de façon sporadique et en faible abondance (Chapitre III). L'importante diversité du compartiment hétérotrophique du picoplancton pourrait être due à la présence d'espèces spécialisées dans la dégradation des multiples molécules organiques issues des organismes photosynthétiques. Les conditions environnementales nécessaires au développement des autotrophes sont moins diversifiées et seulement un nombre restreint d'organismes est adapté à des variations données d'intensités lumineuses et concentrations en nutriments. Par conséquent ils présentent une variabilité phylogénétique plus faible (Vaulot et al. 2002) (voir Annexe II).

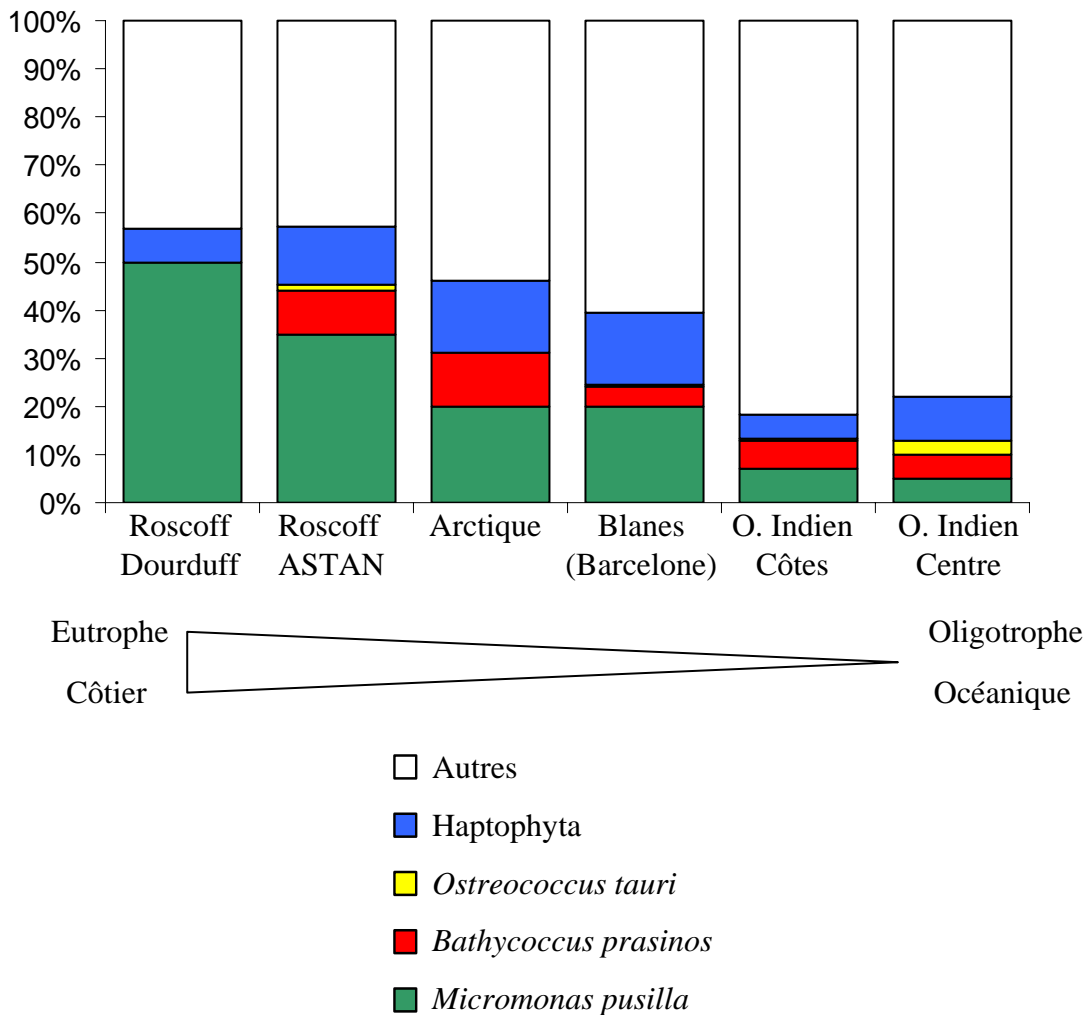


Figure VI-2: Schématisation de la proportion des groupes taxinomiques étudiés au cours de cette thèse au sein de la communauté de picoeucaryotes, et en fonction des masses d'eau étudiées. Les masses d'eau prises en compte pour établir ce graphique sont: Dourduff (Baie de Morlaix), Roscoff (ASTAN), Mers Arctiques, Blanes (méditerranée occidentale), Océan Indien (côtes Africaines), Océan Indien (gyre subtropical).

VI-2-B *Micromonas pusilla*, une espèce clé du picoplancton eucaryote

M. pusilla est depuis longtemps considérée comme une espèce ubiquiste. De nombreux scientifiques l'ont déjà observé par microscopie électronique et ont pu parfois estimer son abondance par des méthodes de mise en culture (Thronsen & Kristiansen 1991), (Thronsen & Zingone 1994). Sur la base d'observations en microscopie électronique et des données pigmentaires de la littérature, (Thomsen & Buck 1998) suggéraient une décroissance de l'abondance de *M. pusilla* des côtes vers le large. Non seulement ce travail de thèse renforce cette suggestion (Fig. VI-02) mais montre par ailleurs que cette espèce a une contribution très importante au sein des peuplements de picoeucaryotes en milieu côtier alors qu'elle n'y contribue que faiblement en milieu oligotrophe (Fig. VI-01). Par conséquent, il nous semble particulièrement important d'approfondir les études concernant la biogéographie de cette espèce. En effet, de par son caractère photosynthétique et sa forte domination des communautés naturelles, *M. pusilla* joue très probablement un rôle écologique déterminant et se présente comme une espèce clé du réseau trophique microbien. De plus il est nécessaire d'étudier le rôle des virus qui infectent spécifiquement cette espèce (Zingone et al. 1999), (Cottrell & Suttle 1995) et qui pourraient avoir un rôle écologique important (Chapitre III).

Par ailleurs, des études génétiques ont montré que certaines espèces planctoniques marines pourtant bien étudiées sur le plan morphologique recelaient plusieurs espèces cryptiques distinguées seulement par de subtiles différences génétiques, morphologiques et écologiques (de Vargas et al. 1999, Geisen et al. 2002). Au sein de l'espèce *M. pusilla* (Guillou et al. 2004) ont récemment mis en évidence l'existence de trois clades distincts. Afin de rechercher la signification écologique de ces trois clades de *M. pusilla*, il serait souhaitable de dessiner des sondes spécifiques pour chacun de ces clades afin de les détecter dans le milieu naturel. Cependant lorsque l'on souhaite discerner des organismes très proches phylogénétiquement (typiquement au niveau intra-spécifique), l'ADNr 18S ne présente pas suffisamment de variabilité et il faut faire appel à d'autres régions du génome, telles que l'ADNr 28S ou les régions non codantes séparant les gènes ribosomiaux (ITSr). Toutefois, bien que croissant rapidement, les bases de données d'ADNr 28S ou d'ITSr ne sont pas aussi importantes que pour l'ADNr 18S. De plus l'application de sondes sur les ITSr ne fournissent pas autant de cibles pour les sondes que les ARN ribosomiaux ce qui réduit l'intensité du signal fluorescent obtenu.

Afin d'étudier plus précisément cette diversité intra-spécifique, une approche similaire à celle actuellement mise en œuvre sur l'espèce *O. tauri* pourrait être utilisée. Après avoir mis en évidence l'existence d'écotypes (souches de profondeur vs souches de surface) grâce à des données génomiques (ITSr), une corrélation avec le phénotype (composition pigmentaire des souches en culture) a été faite (Rodriguez et al. soumis). Prochainement, le premier génome picoeucaryotique (celui d'*Ostreococcus tauri*) sera disponible, si cet effort se poursuit, nos connaissances sur la physiologie et l'écologie des picoeucaryotes devraient croître considérablement à la manière de ce qui a été fait ces dernières années pour les cyanobactéries *Prochlorococcus* et *Synechococcus* (Partensky et al. 1999, Rocap et al. 2003) pour lesquelles 4 génomes sont actuellement disponibles (et 5 en cours de séquençage).

VI-2-C Le microphytoplancton est brun et le picophytoplancton est vert.

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, le microphytoplancton des océans actuels est largement dominé par les diatomées, les haptophytes, les dinoflagellés ou plus généralement les algues issues de la "lignée rouge" c'est-à-dire possédant un plaste ayant pour origine une algue rouge (Grzebyk et al. 2003). Bien que des données fossiles laissent supposer que les algues vertes, et plus particulièrement les Prasinophyceae, aient pu dominer le phytoplancton eucaryote au Paléozoïque et précédemment (kystes fossilisés = Achritarchs) (Mendelson 1993), actuellement les microalgues vertes semblent reléguées à un rôle écologique ou biogéochimique mineur. Cependant, nos résultats tendent à montrer que ce sont les algues vertes qui dominent actuellement le picoplancton. Alors que les évolutions entre espèces au sein de la "lignée rouge" apparaissent évidentes, il serait intéressant de savoir si les espèces de microalgues vertes marines actuelles sont très différentes de celles ayant existés au Paléozoïque. Plus généralement l'étude comparative des vitesses de spéciation entre les multiples lignées de microalgues, devrait permettre de mieux appréhender la diversité actuelle des océans.

VI-2-D Voies d'accès à la morphologie d'espèces non cultivables

Récemment, des chercheurs ont étendu les applications de l'hybridation *in situ* en associant l'identification et le dénombrement par FISH avec des méthodes permettant soit une caractérisation morphologique, soit une analyse physiologique des organismes ciblés.

Comme nous l'avons souligné précédemment, le FISH associé à la microscopie est une des techniques qui permet de revenir à l'observation des cellules présentes dans le milieu naturel afin de quantifier ces organismes dont seule la séquence de l'ADNr 18S est connue. Ainsi, au cours de cette thèse nous avons pu dessiner des sondes à partir de séquences environnementales obtenues après clonage et séquençage d'échantillons d'eau de mer côtière. L'application de ces sondes sur ces mêmes échantillons, a permis de visualiser et de confirmer la position systématique d'un nouveau groupe d'organismes marins apparenté aux Glaucophyta. La découverte en milieu marin d'organismes aussi primitifs, n'ayant connu qu'un seul événement d'endosymbiose devrait être intéressante pour notre compréhension de l'évolution des lignées eucaryotes (Valentin et al. soumis) (voir Annexe III).

Afin d'aller plus loin dans l'observation de la morphologie de ces protistes, en 2003 (Stoeck et al. 2003) ont réussi à associer le FISH et la microscopie électronique à balayage. L'utilisation d'un mélange particulier de fixateurs (mélange de Bouin) permet ainsi de conserver puis de révéler la morphologie des organismes détectés par FISH. Cette association de techniques est particulièrement attractive pour l'étude des picoeucaryotes car on peut imaginer dessiner des sondes à partir de séquences issues de l'environnement et dont on n'a pas de représentant en culture, puis appliquer ces sondes sur le milieu naturel. L'obtention d'un signal fluorescent permettrait alors d'avoir à la fois une information quantitative ainsi que visuel concernant l'organisme ciblé. Certes, l'organisme ne sera toujours pas en culture mais comme nous l'avons souligné, l'obtention d'organismes en culture, bien qu'essentielle, est certainement l'étape la plus difficile.

Afin d'avoir des éléments sur la physiologie des organismes, il est aussi possible d'associer FISH et micro-autoradiographie. On peut en effet grâce à cette méthode identifier les organismes qui utilisent un substrat nutritif particulier, préalablement marqué radioactivement (Ouverney & Fuhrman 1999, Ito et al. 2002). Là encore cette association présente un intérêt certain pour l'étude de l'écologie fonctionnelle des picoeucaryotes.

VI-3 Conclusions générales

Au cours de ce travail, l'application du TSA-FISH sur les picoeucaryotes du milieu naturel a permis de poser les fondements d'études d'écologie et de biogéographie des taxons de picoeucaryotes.

Les premiers éléments apportés par cette étude montre une domination nette de l'espèce *Micromonas pusilla* en milieu côtier et une structuration différente des populations en milieu océanique. C'est en particulier dans cette zone de l'océan, où l'importance du picoplancton a été pour la première fois mise en évidence, qu'il nous semble nécessaire de poursuivre les efforts d'études quantitatives de la diversité sans toutefois négliger les autres écosystèmes marins.

Deux voies s'ouvrent désormais. La première consiste à poursuivre ces études de diversité à un niveau taxinomique plus fin, typiquement au niveau intra spécifique. La seconde, forte des connaissances actuelles, est de s'orienter vers des études plus fonctionnelles en utilisant des espèces modèles représentatives de la composition des communautés naturelles

BIBLIOGRAPHIE

- Agawin NSR, Duarte CM, Agusti S (2000) Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography* 45:591-600
- Amann R, Ludwig W (2000) Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *Fems Microbiology Reviews* 24:555-565
- Amann RI, Zarda B, Stahl DA, Schleifer KH (1992) Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3007-3011
- An SS, Mopps B, Weber K, Bhattacharya D (1999) The origin and evolution of green algal and plant actins. *Molecular Biology and Evolution* 16:275-285
- Andersen RA (1992) Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation* 1:267-292
- Andersen RA, Bidigare RR, Keller MD, Latasa M (1996) A comparison of HPLC pigment signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the North Atlantic and Pacific Oceans. *Deep-Sea Research Part II Topical Studies in Oceanography* 43:517-537
- Andersen RA, Saunders GW, Paskind MP, Sexton J (1993) Ultrastructure and 18S rRNA gene sequence for *Pelagomonas calceolata* gen. and sp. nov. and the description of a new algal class, the Pelagophyceae *classis nov.* *Journal of Phycology* 29:701-715
- Anderson LG, Chierici M, Jones EP, Fransson A, Olsson K (1998) Anthropogenic carbon dioxide in the Arctic Ocean: Inventory and sinks. *Journal of Geophysical Research* 103:707-716
- Ansotegui A, Sarobe A, Trigueros JM, Urrutxurtu I, Orive E (2003) Size distribution of algal pigments and phytoplankton assemblages in a coastal-estuarine environment: contribution of small eukaryotic algae. *Journal of Plankton Research* 25:341-355
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad TF (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology - Progress Series* 10:257-263
- Baldauf SL (2003) The deep roots of Eukaryotes. *Science* 300:1703-1706
- Bell T, Kalff J (2001) The contribution of picophytoplankton in marine and freshwater systems of different trophic status and depth. *Limnology and Oceanography* 46:1243-1248

- Bidigare R, Ondrusek ME (1996) Spatial and temporal variability of phytoplankton pigment distributions in the central equatorial Pacific Ocean. *Deep-Sea Research Part II Oceanographic Research Papers* 43:809-833
- Biegala IC, Not F, Vaultot D, Simon N (2003) Quantitative assessment of picoeukaryotes in the natural environment using taxon specific oligonucleotide probes in association with TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification - Fluorescent *In Situ* Hybridization) and flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 69:5519-5529
- Breton E, Brunet C, Sautour B, Brylinski JM (2000) Annual variations of phytoplankton biomass in the Eastern English Channel: comparison by pigment signatures and microscopic counts. *Journal of Plankton Research* 22:1423-1440
- Briggs JC (1994) Species diversity: Land and Sea compared. *Systematic Biology* 43:130-135
- Broadaway SC, Barton SA, Pyle BH (2003) Rapid staining and enumeration of small numbers of total bacteria in water by solid-phase laser cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4272-4273
- Brown SL, Landry MR, Barber RT, Campbell L, Garrison DL, Gowing MM (1999) Picophytoplankton dynamics and production in the Arabian Sea during the 1995 southwest monsoon. *Deep-Sea Research Part II Topical Studies In Oceanography* 46:1745-1768
- Butcher RW (1952) Contribution to our knowledge of the smaller marine algae. *Journal of Marine Biology Assoc. U. K.* 31:175-191
- Campbell L, Nolla HA, Vaultot D (1994) The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography* 39:954-961
- Caron DA, Peele ER, Lim EL, Dennett MR (1999) Picoplankton and nanoplankton and their trophing coupling in surface waters of the sargasso Sea south of Bermuda. *Limnology and Oceanography* 44:259-272
- Chisholm SW, Frankel SL, Goericke R, Olson RJ, Palenik B, Waterbury JB, West-Johnsrud L, Zettler ER (1992) *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll *a* and *b*. *Archives of Microbiology* 157:297-300
- Chrétiennot-Dinet MJ, Courties C (1997) Biodiversity of unicellular algae: example of pico and ultraplanktonic eucaryotes of the Thau lagoon. *Vie et Milieu* 47:317-324
- Courties C, Vaquer A, Trousselier M, Lautier J, Chrétiennot-Dinet M-J, Neveux J, Machado C, Claustre H (1994) Smallest eukaryotic organism. *Nature* 370:255

- Courties C, Perasso R, ChretiennotDinet MJ, Gouy M, Guillou L, Troussellier M (1998) Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Journal of Phycology* 34:844-849
- Cottrell MT, Kirchman DL (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5116-5122
- Cottrell MT, Suttle CA (1995) Genetic diversity of algal viruses which lyse the photosynthetic picoflagellate *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae). *Applied and Environmental Microbiology* 61:3088-3091
- Daugbjerg N, Moestrup O, Arctander P (1995) Phylogeny of genera of Prasinophyceae and Pedinophyceae (Chlorophyta) deduced from molecular analysis of the {Irbcl}L gene. *Phycological Research* 43:203-213
- DeLong EF, Wickhan GS, Pace NR (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243:1360-1363
- Diez B, Pedros-Alio C, Marsh TL, Massana R (2001a) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2942-2951
- Diez B, Pedros-Alio C, Massana R (2001b) Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2932-2941
- Durand MD, Green RE, Sosik HM, Olson RJ (2002) Diel variations in optical properties of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae). *Journal of Phycology* 38:1132-1142
- Edwardsen B, Eikrem W, Green JC, Andersen RA, Der Staay S, Medlin LK (2000) Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. *Phycologia* 39:19-35
- Eikrem W, Romari K, Gall FL, Latasa M, Vaultot D (soumis) *Florenciella parvula* gen. and sp. nov. (Dictyochophyceae, Heterokontophyta) a small flagellate isolated from the English Channel. *Phycologia*
- Eikrem W, Throndsen J (1990) The ultrastructure of *Bathycoccus* gen. nov. and *Bathycoccus prasinos* sp. nov., a non-motile picoplanktonic alga (Chlorophyta, Prasinophyceae) from the Mediterranean and Atlantic. *Phycologia* 29:344-350
- Falkowski PG (1994) The role of phytoplankton photosynthesis in global biochemical cycles. *Photosynthesis research* 39:235-258

- Fawley MW, Yun Y, Qin M (2000) Phylogenetic analyses of 18s rDNA sequences reveal a new coccoid lineage of the Prasinophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 36:387-393
- Fuller NJ, Marie D, Partensky F, Vaultot D, Post AF, Scanlan DJ (2003) Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine *Synechococcus* clade throughout a stratified water column in the Red Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2430-2443
- Geisen M, Billard C, Broerse ATC, Cros L, Probert I, Young JR (2002) Life-cycle associations involving pairs of holococcolithophorid species: intraspecific variation or cryptic speciation? *European Journal of Phycology* 37:531-550
- Gibson JAE, Garrick RC, Burton HR, McTaggart AR (1990) Dimethylsulfide and the alga *Phaeocystis pouchetii*. *Marine Biology* 104:339-346
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60-63
- Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR (1988) Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology* 170:720-726
- Gjosaeter J, Lekve K, Stenseth NC, Leinaas HP, Christie H, Dahl E, Danielssen DS, Edvardsen B, Olsgard F, Oug E, Paasche E (2000) A long-term perspective on the *Chrysochromulina* bloom on the Norwegian Skagerrak coast 1988: a catastrophe or an innocent incident ? *Marine Ecology - Progress Series* 207:201-218
- Gradinger R, Lenz J (1995) Seasonal occurrence of picocyanobacteria in the Greenland Sea and central Arctic Ocean. *Polar Biology* 15:447-452
- Grzebyk D, Schofield O, Vetriani C, Falkowski PG (2003) The Mesozoic radiation of eukaryotic algae: The portable plastid hypothesis. *Journal of Phycology* 39:259-267
- Guillard RL, Keller MD, O'Kelly CJ, Floyd GL (1991) *Pycnococcus provasolii* gen. et sp. nov., a coccoid prasinolanthin-containing phytoplankton from the western north atlantic and gulf of mexico. *Journal of Phycology* 27:39-47
- Guillou L, Chrétiennot-Dinet MJ, Medlin LK, Claustre H, Loiseaux de Goer S, Vaultot D (1999a) *Bolidomonas*: A new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta). *Journal of Phycology* 35:368-381
- Guillou L, MoonVanDerStaay SY, Claustre H, Partensky F, Vaultot D (1999b) Diversity and abundance of Bolidophyceae (Heterokonta) in two oceanic regions. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4528-4536

- Guillou L, Massana R, Groisillier A, Pedros Alio C (soumis) Marine food web manipulations: an approach to obtain temporary enrichments of uncultivated small eukaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*
- Guillou L, Romari K, Massana R, Le Gall F, Pedros-Aliò C, Vaultot D (2004) Diversity of marine picoplanktonic Prasinophyceae assessed by SSU rDNA gene sequencing from genetic libraries and new isolates in culture. *Protist* 155:193-214
- Hasegawa T, Miyashita H, Kawachi M, Ikemoto H, Kurano N, Miyachi S, Chihara M (1996) *Prasinoderma coloniale* gen. et sp. nov., a new pelagic coccoid prasinophyte from the western Pacific ocean. *Phycologia* 35:170-176
- Higgins HW, Mackey DJ (2000) Algal class abundances, estimated from chlorophyll and carotenoid pigments, in the western Equatorial Pacific under El Nino and non-El Nino conditions. *Deep-Sea Research Part I Oceanographic Research* 47:1461-1483
- Hoepffner N, Hass LW (1990) Electron microscopy of nanoplankton from the North Pacific central gyre. *Journal of Phycology* 26:421-439
- Hooks CE, Bidigare RR, Keller MD, Guillard RRL (1988) Coccoid eukaryotic marine ultraplankters with four different pigment signatures. *Journal of Phycology* 24:571-580
- Iglesias-Rodriguez MD, Brown CW, Doney SC, Kleypas J, Klober D, Klober Z, Hayes PK, Falkowski P (2002) Representing key phytoplankton functional groups in ocean carbon cycle models: Coccolithophorids. *Global Biogeochemical Cycles* 16:47(41)-71(20)
- Ito T, Nielsen JL, Okabe S, Watanabe Y, Nielsen PH (2002) Phylogenetic identification and substrate uptake patterns of sulfate-reducing bacteria inhabiting an oxic-anoxic sewer biofilm determined by combined microautoradiography and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 68:356-364
- Jeffrey SW (1976) A report of green algal pigments in the central North Pacific Ocean. *Marine Biology* 37:33-37
- Jeffrey SW, Hallegraeff GM (1987) Chlorophyllase distribution in ten classes of phytoplankton: a problem for chlorophyll analysis. *Marine Ecology - Progress Series* 35:293-304
- Jeffrey SW, W. WS, Zapata M (1999) Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. *Marine and Freshwater Research* 50:879-896
- Johnson PW, Sieburth JM (1979) Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and Oceanography* 24:928-935

- Johnson PW, Sieburth JM (1982) *In-situ* morphology and occurrence of eucaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. *Journal of Phycology* 18:318-327
- Joint IR, Owen NJP, Pomroy AJ (1986) Seasonal production of photosynthetic picoplankton and nanoplankton in the Celtic sea. *Marine Ecology Progress Series* 28:251-258
- Kawachi M, Inouye I, Honda D, O'Kelly CJ, Bailey JC, Bidigare RR, Andersen RA (2002) The Pinguiphyceae *classis nova*, a new class of photosynthetic stramenopiles whose members produce large amount of omega-3 fatty acids. *Phycological Research* 50:49-56
- Kerkmann K, Medlin L (en préparation) DNA chips for phylogenetic probing: method development. *EMBO journal*
- Keller MD, Selvin RC, Claus W, Guillard RRL (1987) Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *Journal of Phycology* 23:633-638
- Kirchman DL (2002) The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *Fems Microbiology Ecology* 39:91-100
- Knauber DC, Berry ES, Fawley MW (1996) Ribosomal RNA-based oligonucleotide probes to identify marine green ultraphytoplankton. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43:89-94
- Kogeler J, Rey F (1999) Ocean colour and the spatial and seasonal distribution of phytoplankton in the Barents Sea. *International Journal of Remote Sensing* 20:1303-1318
- Kuylenstierna M, Karlson B (1994) Seasonality and composition of pico- and nanoplanktonic cyanobacteria and protist in the Skagerrak. *Botanica Marina* 37:17-33
- Latasa M, Scharek R, Le Gall F, Guillou L (soumis) Pigment suites and taxonomic groups in Prasinophyceae. *Journal of Phycology*
- Latasa M, vanLenning K, Garrido JL, Scharek R, Estrada M, Rodriguez F, Zapata M (2001) Losses of chlorophylls and carotenoids in aqueous acetone and methanol extracts prepared for RPHPLC analysis of pigments. *Chromatographia* 53:385-391
- Lebaron P, Catala P, Fajon C, Joux F, Baudart J, Bernard L (1997) A new sensitive, whole-cell hybridization technique for detection of bacteria involving a Biotinylated oligonucleotide probe targeting rRNA and Tyramid Signal Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3274-3278

- Letelier RM, Bidigare RR, Hebel DV, Ondrusek ME, Winn CD, Karl DM (1993) Temporal variability of phytoplankton community structure based on pigment analyses. *Limnology and Oceanography* 38:1420-1437
- Lewin RA, Krienitz L, Goericke R, Takeda H, Hepperle D (2000) *Picocystis salinarum* gen. et sp nov (Chlorophyta) - a new picoplanktonic green alga. *Phycologia* 39:560-565
- Li WKW (1994a) Primary productivity of prochlorophytes, cyanobacteria, and eukaryotic ultraplankton: measurements from flow cytometric sorting. *Limnology and Oceanography* 39:169-175
- Li WKW (1994b) Phytoplankton biomass and chlorophyll concentration across the North Atlantic. *Scientia Marina* 58:67-79
- Li WKW (1995) Composition of ultraphytoplankton in the central North Atlantic. *Marine Ecology - Progress Series* 122:1-8
- Loeng H, Ozhigin V, Adlandsvik B (1997) Water fluxes through the Barents Sea. *ICES Journal of Marine Sciences* 54:310-317
- Longhurst A (1998) *Ecological Geography of the Sea*, pp 205-243 London.
- Lopez Garcia P, Rodriguez Valera F, Pedros Alio C, Moreira D (2001) Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature* 409:603-607
- Ludwig W, Strunk O, Ralf Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Förster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lüßmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis AP, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer KH (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 32:1363-1371
- Mackey DJ, Higgins HW, Mackey MD, Holdsworth D (1998) Algal class abundances in the western equatorial Pacific: Estimation from HPLC measurements of chloroplast pigments using CHEMTAX. *Deep-Sea Research Part I Oceanographic Research Papers* 45:1441-1468
- Mackey MD, Mackey DJ, Higgins HW, Wright SW (1996) CHEMTAX- a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Marine Ecology-Progress Series* 144:265-283
- Manton I (1975) Observations on the microanatomy of *Scourfieldia marina* Thronsen and *Scourfieldia caeca* (Korsch.) Belcher et Swale. *Archiv für Protistenkunde* 117:358-368

- Marie D, Brussaard C, Partensky F, Vaulot D (1999) Flow cytometric analysis of phytoplankton, bacteria and viruses. In: Sons JW (ed) Current Protocols in Cytometry. International Society for Analytical Cytology, p 11-15
- Markowski D, Wiktor J (1998) Phytoplankton and water masses in the European subarctic Polar front zone. *Oceanologia* 40:51-64
- Massana R, Guillou L, Diez B, Pedros-Alio C (2002) Unveiling the organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4554-4558
- Mendelson CV (1993) Acritarchs and prasinophytes. In: Lipps JH (ed) Fossil prokaryotes and protist. Blackwell, Oxford, p 77-104
- Miyashita M, Ikemoto H, Kurano N, Miyachi S, Chihara M (1993) *Prasinococcus capsulatus* gen. et sp. nov., a new marine coccoid Prasinophyte. *Journal of General and Applied Microbiology* 39:571-582
- Mohran ZS, Arthur RR, Oyofa BA, Peruski LF, Wasfy MO, Ismail TF, Murphy JR (1998) Differentiation of *Campylobacter* isolates on the basis of sensitivity to boiling in water as measured by PCR-detectable DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64:363-365
- Moon-van der Staay SY, De Wachter R, Vaulot D (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* 409:607-610
- Moon-van der Staay SY, van der Staay GWM, Guillou L, Vaulot D, Claustre H, Medlin LK (2000) Abundance and diversity of Prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnology and Oceanography* 45:98-109
- Moter A, Gobel UB (2000) Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 41:85-112
- Murphy LS, Haugen EM (1985) The distribution and abundance of phototrophic ultraplankton in the North Atlantic. *Limnology and Oceanography* 30:47-58
- Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2:317-322
- Nakayama T, Marin B, Kranz HD, Surek B, Huss VAR, Inouye I, Melkonian M (1998) The basal position of scaly green flagellates among the green algae (Chlorophyta) is revealed by analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences. *Protist* 149:367-380
- Norris R (2000) Pelagic species diversity, biogeography, and evolution. *Paleobiology* 26:236-258

- Norton TA, Melkonian M, Andersen RA (1996) Algal biodiversity. *Phycologia* 35:308-326
- O'Kelly CJ, Sieracki ME, Thier EC, Hobson IC (2003) A transient bloom of *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae) in West Neck Bay, Long Island, New York. *Journal of Phycology* 39:850-854
- Okolodkov YB, Dodge JD (1996) Biodiversity and biogeography of planktonic dinoflagellates in the Arctic Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 202:19-27
- Ondrusek ME, Bidigare RR, Sweet ST, Defreitas DA, Brooks JM (1991) Distribution of phytoplankton pigments in the North Pacific Ocean in relation to physical and optical variability. *Deep-Sea Research part II Topical Studies in Oceanography* 38:243-266
- Ouverney CC, Fuhrman JA (1999) Combined Microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1746-1752
- Owrid G, Socal G, Civitarese G, Luchetta A, Wiktor J, Nothig E, Andreassen IJ, Schauer U, Strass V (2000) Spatial variability of phytoplankton, nutrients and new production estimates in the waters around Svalbard. *Polar Research* 19:155-171
- Partensky F, Hess WR, Vaulot D (1999) *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:106-127
- Pernthaler A, Preston CM, Pernthaler J, DeLong EF, Amann R (2002) Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Applied and Environmental Microbiology* 68:661-667
- Potter D, Lajeunesse TC, Saunders GW, Anderson RA (1997) Convergent evolution masks extensive biodiversity among marine coccoid picoplankton. *Biodiversity and Conservation* 6:99-107
- Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25:943-948
- Pougnard C, Catala P, Drocourt J-L, Legastelois S, Pernin P, Pringuez E, Lebaron P (2002) Rapid detection and enumeration of *Naegleria fowleri* in surface waters by solid-phase cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3102-3107
- Rat'kova TN, Wassmann P (2002) Seasonal variation and spatial distribution of phyto- and protozooplankton in the central Barents Sea. *Journal of Marine Systems* 38:47-75

- Rat'kova TN, Wassmann P, Verity PG, Andreassen IJ (1998) Abundance and biomass of pico-, nano-, and microphytoplankton on a transect across Nordvestbanken, north Norwegian shelf, in 1994. *Sarsia* 84:213-225
- Raven JA (1998) Small is beautiful: the picophytoplankton. *Functional ecology* 12:503-513
- Ravenschlag K, Sahn K, Amann R (2001) Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine Arctic sediments (Svalbard). *Applied and Environmental Microbiology* 67:387-395
- Reason CJC, Alan RJ, Lindsay JA (1996) Evidence for the influence of remote forcing on interdecadal variability in the Southern Indian Ocean. *Journal of Geophysical Research* 101:867-882
- Reviere B de (2003) Classe de Prasinophyceae et des Pedinophyceae. In: Belin (ed) *Biologie et phylogénie des algues - Tome 2, Vol 2*. Belin, Paris, p 66-70
- Reynolds N (1974) What matters in Arctic phytoplankton? *British Phycological Journal* 9:215-224
- Riegman R, Kraay GW (2001) Phytoplankton community structure derived from HPLC analysis of pigments in the Faroe-Shetland Channel during summer 1999: the distribution of taxonomic groups in relation to physical/chemical conditions in the photic zone. *Journal of Plankton Research* 23:191-205
- Rocap G, Larimer FW, Lamerdin J, Malfatti S, Chain P, Ahlgren NA, Arellano A, Coleman M, Hauser L, Hess WR, Johnson ZI, Land M, Lindell D, Post AF, Regala W, Shah M, Shaw SL, Steglich C, Sullivan MB, Ting CS, Tolonen A, Webb EA, Zinser ER, Chisholm SW (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424:1042-1047
- Rodriguez F, Derelle E, Guillou L, Le Gall F, Vaultot D, Moreau H (soumis) Ecotype diversity in marine picoeukaryote *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*
- Rodriguez F, Pazos Y, Morono A, Maneiro J, Zapata M (2003) Temporal variation in phytoplankton assemblages and pigment composition in a fixed station of the Ria of Pontevedra (NW Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 58:499-515
- Romari K, Vaultot D (2004) Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. *Limnology and Oceanography* 49:784-798
- Sakshaug E (1997) Biomass and productivity distributions and their variability in the Barents Sea. *ICES Journal of Marine Sciences* 54:341-350

- Schlitzer R (2003) Ocean Data View. <http://www.awi-bremerhaven.de/GEO/ODV>
- Schönhuber W, Fuchs B., Juretschko, S., Amann, R. (1997) Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3268-3273.
- Schönhuber W, Zarda B, Eix S, Rippka R, Herdman M, Ludwig W, Amann R (1999) *In situ* identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1259-1267
- Sieburth JM, Keller MD, Johnson PW, Mykkestad SM (1999) Widespread occurrence of the oceanic ultraplankton, *Prasinococcus capsulatus* (Prasinophyceae), the diagnostic "Golgi-decapore complex" and the newly described polysaccharide "capsulan". *Journal of Phycology* 35:1032-1043
- Sieburth JM, Smetacek V, Lenz J (1978) Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fraction. *Limnology and Oceanography* 23:1256-1263
- Silver MW, Gowing MM, Davoll PJ (1986) The association of photosynthetic picoplankton and ultraplankton with pelagic detritus through the water column (0-200m). In: Platt T, Li WKW (eds) *Photosynthetic Picoplankton*, Vol 214, p 311-341
- Simek K, Hartman P, Nedoma J, Pernthaler J, Springmann D, Vrba J, Psenner R (1997) Community structure, picoplankton grazing and zooplankton control of heterotrophic nanoflagellates in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton bloom. *Aquatic Microbial Ecology* 12:49-63
- Simon N, Lebot N, Marie D, Partensky F, Vaulot D (1995) Fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2506-2513
- Simon N, Campbell L, Ornofsdottir E, Groben R, Guillou L, Lange M, Medlin LK (2000) Oligonucleotide probes for the identification of three algal groups by dot blot and fluorescent whole-cell hybridization. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47:76-84
- Smetacek V (1999) Diatoms and the Ocean carbon cycle. *Protist* 150:25-32
- Sournia A, Birrien J-L (1995) La série océanographique côtière de Roscoff (Manche occidentale) de 1985 à 1992. *Cahiers de Biologie Marine* 36:1-8
- Sournia A, Birrien J-L, Douville J-L, Klein B, Viollier M (1987) A daily study of the diatom spring bloom at Roscoff (France) in 1985. I. The spring bloom within the annual cycle. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 25:355-367

- Stein F (1878) Der organismus der infusionsthier. III Die Naturgeschichte der Flagellatenoder Geisselinfusoria. I Hälfte. Engelmann W., Liepzig
- Stockner JG, Antia NJ (1986) Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 43:2472-2503
- Stoeck T, Fowle WH, Epstein SS (2003) Methodology of protistan discovery: from rRNA detection to quality scanning electron microscope images. Applied and Environmental Microbiology 69:6856-6863
- Stramma L, Lutjeharms JRE (1997) The flow field of the subtropical gyre of the South Indian Ocean. Journal of Geophysical Research 102:5513-5530
- Sym S, Pienaar R (1993) The class Prasinophyceae. In: Round F, Chapman D (eds) Progress in phycological research. Biopress Ltd, Bristol, p 281-376
- Swofford DL (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA
- Thomsen HA, Buck KR (1998) Nanoflagellates of the central California waters: taxonomy, biogeography and abundance of primitive, green flagellates (Pedinophyceae, Prasinophyceae). Deep-Sea Research Part II Topical Studies in Oceanography 45:1687-1707
- Thronsen J (1969) Flagellates of Norwegian coastal waters. Nytt Magasin for Botanikk 16:161-214
- Thronsen J (1970) Flagellates from Arctic waters. Nytt Magasin for Botanikk 17:49-57
- Thronsen J (1976) Occurrence and productivity of small marine flagellates. Norwegian Journal of Botany 23:269-293
- Thronsen J (1978) The dilution culture method. In: Sournia A (ed) Phytoplankton Manual, Vol 6. UNESCO, Paris, p 218-224
- Thronsen J, Kristiansen S (1991) *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) as part of pico- and nanoplankton communities of the Barents Sea. Polar Research 10:201-207
- Thronsen J, Zingone A (1994) Micronomads of the Mediterranean sea. Giornale Botanico Italiano 128:1031-1044
- Urdea MS, Warner BD, Running JA, Stempien M, Clyne J, Horn T (1988) A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent, and enzyme labeled oligodeoxyribonucleotide probes. Nucleic Acids Research 16:4937-4956

- Valentin K, Not F, Romari K, Massana R, Vaultot D, Medlin L (soumis) New algal group comes to light. *Nature*
- Vargas C de, Norris R, Zaninetti L, Gibb SW, Pawlowski J (1999) Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifers and their relation to oceanic provinces. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A.* 96:2864-2868
- Vaultot D (1989) CYTOPC: Processing software for flow cytometric data. *Signal and Noise* 2:8
- Vaultot D, Le Gall F, Marie D, Guillou L, Partensky F (2004) The Roscoff Culture Collection (RCC): a collection dedicated to marine picoplankton. *Nova Hedwigia* 79
- Vaultot D, Romari K, Not F (2002) Are autotrophs less diverse than heterotrophs in marine picoplankton? *Trends in Microbiology* 10:266-267
- Verity PG, Wassmann P, Frischer ME, Howard-Jones MN, Allen AE (2002) Grazing of phytoplankton by microzooplankton in the Barents Sea during early summer. *Journal of Marine Systems* 38:109-123
- Verity PG, Wassmann P, Rat'kova TN, Andreassen IJ, Nordby E (1999) Seasonal patterns in composition and biomass of autotrophic and heterotrophic nano- and microplankton communities on the north Norwegian shelf. *Sarsia* 84:265-277
- Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield PV (2000) Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods* 243:191-210
- Wallner G, Amann R, Beisker W (1993) Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14:136-143
- Waterbury JB, Watson SW, Guillard RRL, Brand LE (1979) Widespread occurrence of a unicellular, marine planktonic, cyanobacterium. *Nature* 77:293-294
- Wauthy B, Desrosières R, Le Bourhis J (1967) Importance présumée de l'ultraplancton dans les eaux tropicales oligotrophes du Pacifique central sud. *Cahier O.R.S.T.O.M. Série Océanographique* 5:109-116
- Wintzingerode Fv, Göbel UB, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *Fems Microbiology Reviews* 21:213-229
- Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 74:5088-5090

- Worden AZ, Nolan JK, Palenik B (2004) Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: The importance of the eukaryotic component. *Limnology and Oceanography* 49:168-179
- Zapata M, Jeffrey SW, Wright SW, Rodríguez F, Garrido JL, Clementson L (sous presse) Photosynthetic pigments in 37 species (65 strains) of Haptophyta: implications for oceanography and chemotaxonomy. *Marine Ecology - Progress Series*
- Zapata M, Rodriguez F, Garrido JL (2000) Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C-8 column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series* 195:29-45
- Zhu F, Not F, Massana R, Marie D, Vaultot D (soumis) Mapping of the picoeucaryotes in marine with quantitative PCR of 18S rRNA gene. *Aquatic Microbial Ecology*
- Zingone A, Sarno D, Forlani G (1999) Seasonal dynamics in the abundance of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) and its viruses in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *Journal of Plankton Research* 21:2143-2159

ANNEXE I

Quantitative Assessment of Picoeukaryotes in the Natural Environment by Using Taxon-Specific Oligonucleotide Probes in Association with Tyramide Signal Amplification-Fluorescence In Situ Hybridization and Flow Cytometry

Isabelle C. Biegala, Fabrice Not, Daniel Vaultot,* and Nathalie Simon

Station Biologique de Roscoff, UMR 7127 et CNRS, Université Pierre et Marie Curie, F-29682 Roscoff cedex, France

Received 26 December 2002/Accepted 1 May 2003

Picoeukaryotes (cells of <3 μm in diameter) contribute significantly to marine plankton biomass and productivity, and recently molecular studies have brought to light their wide diversity. Among the methods that have been used so far to quantify aquatic microorganisms, fluorescence in situ hybridization of oligonucleotide probes combined with flow cytometry offers the advantages of both high resolution for taxonomic identification and automated cell counting. However, cell losses, cell clumps, and low signal-to-background ratio have often been mentioned as major problems for routine application of this combination of techniques. We developed a new protocol associating tyramide signal amplification-fluorescence in situ hybridization and flow cytometry, which allows the detection of picoeukaryotes in cultures during both the exponential and stationary phases. The use of surfactant and sonication proved to be essential for the detection and quantification of picoeukaryotes from the natural environment, with as little as a few tenths of a milliliter of 3- μm -pore-size prefiltered sea water. The routine application of the technique was tested along a coastal transect off Brittany (France), where the different groups of picoeukaryotes were investigated using already published specific probes and a newly designed probe that targets the order Mamiellales (Prasinophyceae, Chlorophyta). Among the picoeukaryotes, Mamiellales outnumbered by 1 order of magnitude both the cyanobacteria and the non-Chlorophyta, which were represented mainly by the Pelagophyceae class. Picoeukaryote abundance increased from open toward more estuarine water, probably following changes in water temperature and stability.

Picoeukaryotes (cells smaller than 3 μm in diameter) (22) are widely distributed in aquatic environments. Their important biomass and their high productivity suggest that they play a major role in oceanic, coastal, and freshwater ecosystems (27, 28, 48). Because of their small size and their simple morphology, a detailed study of these organisms is difficult. It is only recently that their diversity has been revealed, in particular by phylogenetic studies based on 18S rDNA sequence analysis (31, 34). It is necessary to quantify the dominating phylogenetic groups of picoeukaryotes in the natural environment in order to understand their contribution to the microbial food web and biogeochemical cycles.

So far, the abundance of marine picoeukaryotes has been estimated based on their natural fluorescence by flow cytometry (28, 54) or by analysis of their pigment composition by high-performance liquid chromatography (56). The taxonomic resolution of these techniques is limited (e.g., class level only for high-performance liquid chromatography) and they do not allow the quantification of heterotrophic organisms. Molecular techniques based on full or partial sequence analysis of 18S rDNA allow us to determine species composition very precisely but are labor-intensive, and only a few samples can be analyzed at once (31, 34). To acquire a more extensive data set, van Hannen et al. (53) and Diez et al. (15) used denaturing

gradient gel electrophoresis to compare rapidly the picoeukaryote species composition at various sites in natural ecosystems. Still, these techniques are not fully quantitative since they rely on PCR amplification.

Oligonucleotide probes designed to target specific taxa (phylum, division, class, or genus) have proven to be useful in estimating the abundance of nano- or picoeukaryotes (21, 30, 39). Such probes can be hybridized either on PCR-amplified rDNA immobilized on membranes (i.e., dot blot analysis) or directly on rRNA from fixed whole cells (i.e., in situ hybridization). While the dot blot method gives an approximate abundance of target organisms, in situ hybridization allows us to distinguish whole target cells within a natural assemblage of organisms. Fluorescence in situ hybridization (FISH) of probes directly labeled with a fluorochrome (i.e., monolabeled probes) has been widely used during the last 10 years to enumerate marine bacteria by epifluorescence microscopy (14, 18). Early on, scientists had thought of increasing the speed and reliability of the analysis by coupling FISH with flow cytometry (2, 57). Such coupling has also been attempted on nano- and picoeukaryotes (29, 45). However, the signal-to-background ratio was often too low for the smallest cells (<3 μm) to be detected by flow cytometry, and several methods of fluorescence amplification have been proposed (e.g., the use of multiple probes or multiple fluor labels on one probe) (1, 14). The success of these amplification techniques was limited: when nonspecific binding was not an obstacle to cell detection, only rapidly growing or large cells (>3 μm) could be detected

* Corresponding author. Mailing address: Station Biologique de Roscoff, BP 74, F-29682 Roscoff cedex, France. Phone: 33 (2) 98 29 23 23. Fax: 33 (2) 98 29 23 24. E-mail: vaultot@sb-roscoff.fr.

ANNEXE II

who had not been previously infected were almost twice as likely to develop HCV infection compared with people who had been infected in the past. Approximately 170 million people worldwide are chronically infected with HCV and many will develop liver cirrhosis or cancer. Although the use of injected drugs and unscreened blood transfusions are major methods of transmission, in developing countries there is also a risk of infection from using improperly sterilized tools for body piercing, tattooing, circumcision and other traditional practices. The source of 10% of acute cases of HCV infection in the United States is unknown. AV <http://www.who.int/emc/diseases/hepatiti/index.html>
<http://www.hopkinsmedicine.org>

Close relatives

Camelpox virus appears to be even closer to smallpox virus than originally thought, a finding that heightens concern about its

possible development and use as a biological weapon, particularly as Iraq is believed to be working on the virus. The central region of the genome of poxviruses contains genes essential for virus replication and thus does not vary much between species. Peripheral regions of the genome harbor genes controlling characteristics such as host range, infectivity and means of evading host immunity. Normally these parts of the genome show variation between species but camelpox virus has now been shown to have similarities to smallpox virus in these areas. Disturbingly, this implies that camelpox virus might already possess some of the genes required for human pathogenesis. CK <http://www.newscientist.com/news>

HIV and TB in Europe

HIV infection and tuberculosis (TB) are rising rapidly in Eastern Europe, placing the whole of Europe at risk of a major health crisis, according to Knut Ipsen,

president of the German Red Cross. Speaking at the April European Regional Red Cross and Red Crescent Conference in Berlin, Ipsen said that although Africa and Asia have the highest number of AIDS cases, Eastern Europe has the fastest growth rate, with 250 000 new cases in 2001. Approximately 30 000 people die each year from TB in Russia, which, in 2000, had a rate of 90.7 cases per 100 000 people, double the European average. Large numbers of economic migrants from the East could pose a major problem for the countries of Western Europe. Ipsen estimates there could be as many as 2 million deaths from HIV and TB across Europe in the coming years, unless preventive action is taken. CK <http://www.medscape.com/infectiousdiseaseshome>

In Brief compiled by Cathel Kerr (c.kerr@sol.co.uk) and Alexandra Venter (alexventer@hotmail.com)

Letters

Are autotrophs less diverse than heterotrophs in marine picoplankton?

In a recent *Trends in Microbiology* review [1], Moreira and López-García highlighted the very large diversity that has recently been unveiled among marine protists, especially in the wake of several studies performed on oceanic picoplankton, that is, the organisms with an average size $2-3\ \mu\text{m}$ [2-4]. This diversity is comparable to that now well established for bacteria following the pioneering work of Giovannoni *et al.* [5]. Surprisingly, although the biomass of autotrophic prokaryotes in the euphotic zone of the ocean is of the same order of magnitude as that of heterotrophic ones [6], their diversity is strikingly low. In fact, there are only four genera of marine cyanobacteria that are globally significant: *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Trichodesmium* and the recently discovered N_2 -fixing *Synechocystis* [7]. To these, one could add two types of newly recognized facultative phototrophs of potential

significance, belonging respectively to the α - and γ -proteobacteria [8,9]. This contrasts with the puzzling diversity of marine heterotrophic bacteria observed within many groups such as the Proteobacteria, the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* cluster or the Actinobacteria [10].

In the euphotic zone of oceanic waters, the abundance and biomass of pico- and nano-planktonic heterotrophic eukaryotes is commensurate with that of the autotrophic ones. However, analysis of published data and work in progress in the framework of the European program PICODIV reveals that the diversity of the former could be much wider than that of the latter, as observed for prokaryotes. In the equatorial Pacific at 75 m depth [4], the number of unique 18S rDNA sequences that could be attributed to heterotrophic organisms was almost twice as large as those from autotrophic organisms (Table 1). At a coastal site in the English Channel, we recovered only 21 autotrophic sequences among 145 different partial sequences obtained from seven different clone libraries (Table 1; Romari unpublished). A significant fraction of these sequences corresponded to previously described

genera belonging in particular to the Prasinophyceae, such as *Bathycoccus*, *Micromonas* or *Ostreococcus*. The low diversity of autotrophic eukaryotes at this coastal site was also supported by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) data. Based on the analysis of seven samples taken throughout the summer, a probe targeting a single species, *Micromonas pusilla*, recognized between 36% and 63% of eukaryotic cells (Not, unpublished). By contrast, we recovered 108 sequences that could be linked to groups that are most likely heterotrophic, in particular to novel lineages within the stramenopiles and alveolates [1]. Moreover, within these groups, diversity is apparently high. For example, the average similarity among stramenopile sequences was only 83% compared with 90% among Prasinophyceae.

Why would the diversity of autotrophs be lower than that of heterotrophs? The diversity of heterotrophic prokaryotes can be explained by the fact that they are involved in the degradation of the numerous organic molecules produced in the marine environment, in particular as a result of photosynthesis by phytoplankton: each taxonomic entity is

ANNEXE III

New algal group comes to light

Klaus Valentin^{1,2}, Fabrice Not^{1,3}, Khadidja Romari³, Ramon Massana⁴, Daniel Vaillot³, & Linda Medlin^{2,1}

²Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Am Handelshafen 12, D.27570 Bremerhaven, Germany

³Station Biologique, UMR 7127 CNRS and UPMC, BP 74, F 29682 Roscoff, ⁴Institut

⁴Institut de Ciències del Mar, Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003 Barcelona, Spain

We report a novel group of picoplanktonic algae presently recognised from sequence data with additional observations from Fluorescent In Situ Hybridisation (FISH) on its morphology and pigmentation. This new algal group is sister to the Glaucocystophytes, an obscure and rare group in freshwater systems that is the third member of the consortium of the three primary endosymbiotic algae¹. The new lineage probably represents a marine counterpart of this ancient endosymbiosis and from our observations from clone library distributions, it appears more common and successful than the Glaucocystophytes and contributes significantly to picoplankton diversity from coastal waters.

Clone libraries for the eukaryotic 18S rRNA gene were constructed quarterly to bimonthly from fractionated water samples from three coastal sites: Helgoland time series site (54°11'N, 7°54'E) in the south-east corner of the North Sea; Roscoff ASTAN station (48°46'N, 3°56'E) in the southern English Channel, and Blanes Bay (41°40'N, 2°48'E) in the western Mediterranean Sea off the Spanish coast. One additional library was established from a sample from the Orkney Islands, Scotland in the North East Atlantic. At each site, a particular group of sequences, as seen in a tree based on partial 18S sequences (Rosko II in²), were recovered irregularly throughout the year (Table 1). Full length sequences recovered from the corresponding clones showed highest similarity to red algae when blasted against GENBANK. Using the most recent phylogenetic reconstruction of the red algae³ as a basis for an in-depth analysis of these novel sequences, we discovered that actually they were not

¹ KV and FN contributed equally to this work

novel unicellular red picoplanktonic algae, but formed a totally new marine group (Fig. 1). Bootstrap support from neighbour-joining, maximum parsimony and log det analyses and posterior probabilities from Mr. Bayes analysis were exceedingly strong (100, 81, 99, 100, respectively) in support of a sister clade relationship to the Glaucocystophytes. We rooted our tree with animals and fungi and found that the true red algae were sister to a clade containing one *Cyanidium* at the base of cryptomonad nucleomorph clade. This suggests an origin of the Cryptophyte plastid within the Cyanidiales and that among the Cyanidiales, we are likely to find the red algal source for the secondary endosymbiosis forming the plastids of the most successful phytoplankton species of the oceans in the present day: the haptophytes, stramenopiles and cryptomonads^{1,4}.

Our novel algal group consists of two different lineages. The fact that there is a long branch before the two clades diverge makes it possible to identify signature sequences to delineate the lineages. Two rRNA probes ENV01 (5'GCGTGATGCCAAAATCCG 3') and ENV02 (5'ATATGCCCGTCAAACCGT 3') were designed to target each clade (Not and Vaultot, unpubl.). These probes had at least 2 mismatches with all available GenBank sequences from cultivated protists and 7-12 mismatches to the Glaucocystophytes and did not display any fluorescence when hybridised with a variety of algal strains from the Roscoff Culture Collection⁵ belonging to the Cryptophytes, Chlorophytes, and photosynthetic stramenopiles. Both probes allowed to recover successfully the morphology of these novel cells from the Roscoff site. The cells of clade 2 are unicellular and probably photosynthetic (Fig. 2a). They possess an organelle-like structure that likely contains phycobiliproteins (PBP): it produces a red autofluorescence similar to that of PBP-containing red algae and cryptomonads when excited with blue light under the fluorescent microscope (Fig. 2b). PBP, as opposed to chlorophylls, are not totally removed with the alcohol dehydration steps in the FISH protocol because they are water soluble pigments⁶. Their presence in red algae, cyanobacteria, Cryptophytes and Glaucocystophytes is in good agreement with the sister relationship to Glaucocystophytes that we recovered. The size of the cells identified with the probe is approximately 2 x 6 µm and their shape is slightly oblong, well within the range of the water sample initially size fractionated by filtration for clone library construction (i.e., below 3 µm in diameter). Their concentration reached up to 80 cells ml⁻¹ and could account for 1.6 % of the total picoeukaryotes in cell counts using FISH. Cells recognised by FISH occurred mostly in fall and winter and were absent in summer, although their sequences could be detected at this period (see Table 1). Is this new group of algae restricted only to the smallest fraction of eukaryotes in the marine environment? Evidence for this assumption

comes from their absence from well-investigated nano- and micro- phytoplankton fractions to suggest that they are truly pico-sized algae.

These algae are highly diverse, as judged by their sequence divergence, and appear to be successful in the coastal picoplankton community, as judged by their relative frequency in clone libraries from three different coastal locations, especially in those from cold temperate sites² and their notable absence from clone libraries from more oceanic picoplanktonic water samples^{7,8,9,10} with the possible exception of clone ANT37.27 from the Antarctic^{2,10}. The fact that they are only just now being reported from the eukaryotic picoplankton community is testament as to how much this community has been under-investigated by oceanographers. And of course, the outstanding questions are: How similar will these cells be ultrastructurally to the Glaucocystophytes and what other groups are waiting to be discovered?

Acknowledgments: This work was supported mainly by the EU project PICODIV (EVK2-1999-00119) and in addition by the following sources of funds: PICMANCHE (Region Bretagne), CNRS-Aventis foundation.

Email address for correspondence: kvalentin@awi-bremerhaven.de

Cited references

1. Bhattacharya, D. & Medlin, L. The phylogeny of the plastids: A review based on comparisons of small-unit ribosomal RNA coding regions. *J. Phycol.* **31**, 489-498. (1995).
2. Romari, K. & Vaulot, D. Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. *Limnol. Oceanogr.* In press. (2004).
3. Müller, K.M., Oliveira, M.C., Sheath, R.C. & Bhattacharya, D. Ribosomal DNA phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the origin of secondary plastids. *AM. J. Bot.* **88**, 1390- 1400 (2001).
4. Moreria, D., Le Guyader, H., & Phillippe, H. The origin of the red algae and the evolution of the chloroplasts. *Nature* **405**, 69-72 (2000).

5. Vaultot, D., Le Gall, F., Marie, D., Guillou, L. & Partensky, F. The Roscoff Culture Collection (RCC): a collection dedicated to marine picoplankton. *Nova Hedwigia* **in press** (2004).
6. Jeffrey, S. Mantoura, F., & Wright, S.W. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO Paris, (1997).
7. Díez B., Pedrós-Alió, C. & Massana, R. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2340-2443 (2001).
8. López-García, P., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C. & Moreria, D. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature* **409**, 603-607. (2001).
9. Moon -van der Stay, S.Y., De Wachter, R. & Vaultot, D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* **409**, 607-610 (2001).
10. Massana, R., Guillou, L. Díez, B. & Pedrós-Alió, C. Unveiling the organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4554-4558 (2002).
11. Not, F., Simon. N., Biegala, I. & Vaultot, D. Application of fluorescent *in-situ* hybridization coupled with Tyramide signal amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**, 157-166. (2002).

Table 1. Relative frequency (number of target clones/number of clones sequenced) of novel marine algal clade in clone libraries from four sites.

Date	Sites			
	Helgoland	Roscoff	Blanes	Orkney Islands
March 2000	0/46	x	x	x
April 2000	1/94	1/82	x	4/64
June 2000	x	2/42	x	x
Aug 2000	1/103	x	x	x
Sept 2000	x	7/40	1/71	x
Oct 2000	2/73	x	x	x
Dec 2000	0/36	2/34	0/106	x
Feb/March 2001	0/86	x	0/81	x
April 2001	x	0/47	x	x
May 2001		0/41	x	x
June 2001	x	2/41	0/81	x
x = no clone library				

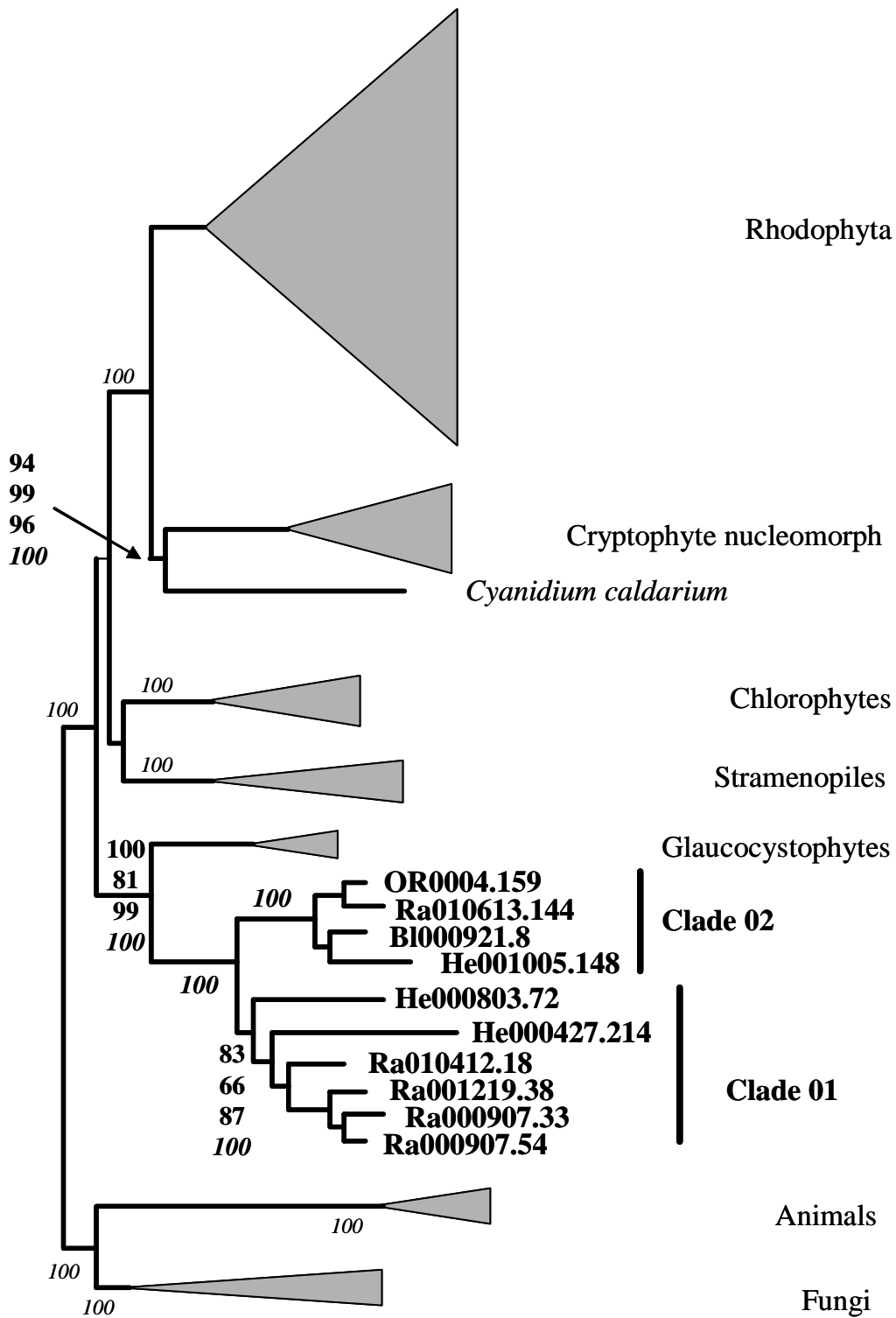


Fig. 1. Phylogenetic tree reconstructed from full-length 18S rRNA sequence data and inferred with the Bayesian analysis. Support for each node was determined with 1000 replicated bootstraps of a neighbor-joining, maximum parsimony and log det analysis and from 1 million trees assessed by posterior probabilities from Mr. Bayes. Only Bayesian values are shown at the non-critical nodes (*italic*). The remaining three critical nodes show the results of each analysis.

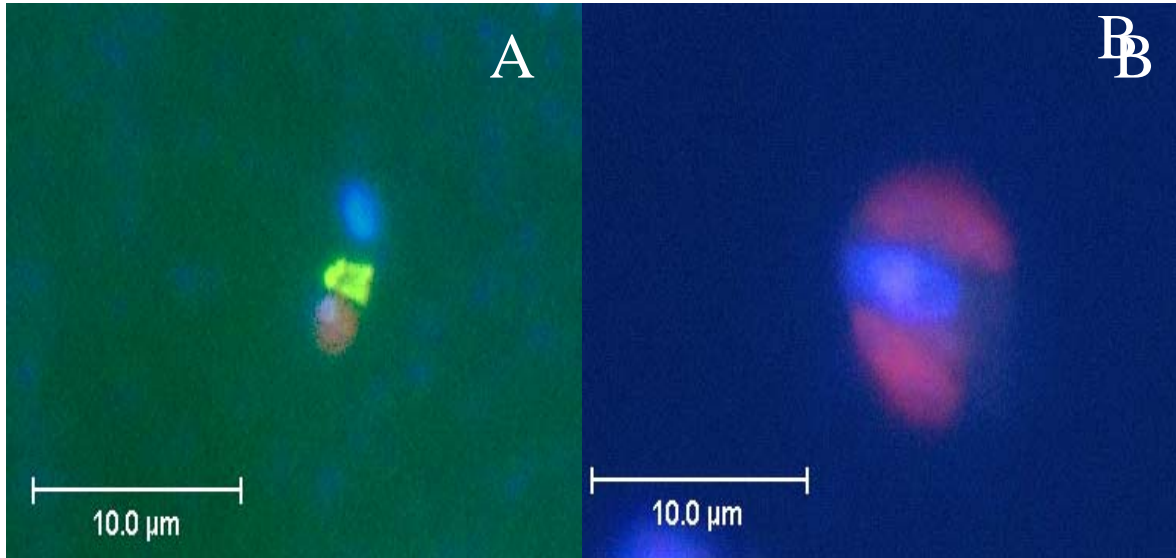


Fig. 2. **Application of probe ENV02 through FISH TSA¹¹ to detect marine picoeukaryotes.** A. A cell from Roscoff with overlaid pictures showing the nucleus stained with DAPI in blue (UV excitation), and the probe fluorescence of the cytoplasm in green (blue excitation). The red fluorescence likely originated from the autofluorescence of a phycobilin- containing plastid under blue excitation, such as those from the red algae and the cryptophytes (see B). B. A cell of the cryptophyte *Rhodomonas salina* labelled with the ENV02 probe. The absence of a green colour indicates that the probe did not recognise the cell. The plastid shows a clear red autofluorescence similar to that in the cell from the natural samples (A).

ANNEXE IV

Aude Houdan^{*1}, Chantal Billard¹, Dominique Marie², Fabrice Not², Alberto G. Sáez³, Jeremy R. Young⁴ & Ian Probert¹

¹ Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, Université de Caen, 14032 Caen, France

² Station Biologique, CNRS et Université de Paris 6, BP74, 29682 Roscoff, France

³ Alfred Wegener Institute, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven, Germany

⁴ Palaeontology Department, The Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, UK

submitted April 2003

accepted November 2003

Holococcolithophore-heterococcolithophore (Haptophyta) life cycles: flow cytometric analysis of relative ploidy levels

Abstract Several coccolithophore species are known to exhibit heteromorphic life cycles. In certain species, notably *Emiliania huxleyi*, the heterococcolith-bearing phase alternates with a non-calcifying stage, whereas in others the heterococcolith-bearing phase alternates with a holococcolith-bearing phase. Heterococcolithophore-holococcolithophore life cycles have previously been observed for only one species in culture, but have also been inferred from an increasing number of observations of combination coccospheres. 18S rDNA sequences from pure cultures of both the heterococcolith-bearing and holococcolith-bearing phases of *Coccolithus pelagicus* were identical, providing an additional indication of their identity as different life cycle stages of the same species. Flow cytometric analyses have been undertaken on SybrGreen-stained nuclei isolated from pure cultures of the two phases of four coccolithophore species (*Coccolithus pelagicus*, *Calcidiscus leptoporus*, *Coronosphaera mediterranea* and *Emiliania huxleyi*) in order to determine relative DNA content. Results confirm the hypothesis that holococcolithophore-heterococcolithophore life cycles are haplo-diploid in nature. Light microscope observations of the processes of sexual fusion and meiosis are reported for two of the experimental species. The results are discussed in the context of the evolution of biomineralization in the coccolithophores and the possible ubiquity of haplo-diploidy in the haptophytes.

Key words Coccolithophore, haplo-diploid, Haptophyta, heterococcolith, holococcolith, life cycle, microalgae, ploidy

Introduction

Marine phytoplankton are responsible for approximately 40% of global primary production and carbon fixation (Field *et al.*, 1998), but our knowledge of their ecology and natural history is remarkably imperfect. A prime example of this in the coccolithophores (division Haptophyta) is that life cycles have been documented from only very few species, resulting in considerable uncertainty as to the general pattern. Here we present critical new observations on a phylogenetically diverse set of coccolithophore species allowing definitive conclusions to be drawn.

Heteromorphic life histories have been documented in several members of the haptophyte class Prymnesiophyceae Hibberd, a group which includes both non-calcifying and cal-

cifying members (the latter being the coccolithophores). These life histories include alternations between non-motile and flagellated stages, between colonial and single cell stages, and between benthic and planktonic stages. In eukaryotes, the extent of the vegetative phase (the number of mitotic divisions) between the two events of sexual reproduction, meiosis and syngamy, defines three different kinds of life cycle: haploid, diploid and haplo-diploid with alternation of generations (Fig. 1). Reviewing the available data, Billard (1994) suggested that haptophyte life cycles typically include haploid and diploid phases, each capable of independent asexual reproduction (haplo-diploidy), with distinct patterns of scale ornamentation characteristic of each ploidy state (N.B. members of the class Prymnesiophyceae are typically covered by two layers of scales: an inner layer of organic 'body scales' and an outer layer of organic scales on which calcification occurs in the coccolithophores). This life cycle type would differ from that

* Corresponding author. Email: houdan@ibfa.unicaen.fr

ANNEXE V

Uncovering picoplankton biodiversity by sequencing of environmental rRNA genes

Klaus Valentin,* Khadidja Romari,† and Fabrice Not†

* Alfred Wegener Institute, Bremerhaven, Germany.

† Station Biologique, CNRS and Université Pierre et Marie Curie, Roscoff, France.

Picoplankton, small oceanic organisms that play a major role in the world's primary photosynthetic production, are not well characterized. This article describes the sequencing of marker genes, performed by QIAGEN Genomics Sequencing Services, as an efficient tool to examine the biodiversity of picoplankton.

Picoplankton

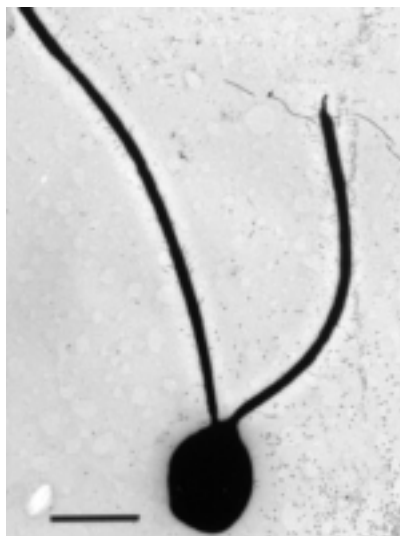


Figure 1 *Pseudoscurfieldia marina*, one species of marine picoplankton. The bar represents 1 μ m.

Phytoplankton, microscopic unicellular algae found in the ocean, dominate the world's photosynthetic primary production. However, large areas of the open oceans are oligotrophic, i.e., lacking in nutrients, such as nitrogen, phosphorus, or iron, that are essential for algal growth. A morphological adaptation of the phytoplankton in such waters is a reduction in size, with the corresponding increase in the cell surface-to-mass ratio permitting easier uptake of nutrients. Indeed, in many oceanic regions small organisms called picoplankton (Figure 1), 3 μ m or less in size, contribute up to 80% of the total chlorophyll (1, 2).

Despite their obvious importance, picoplankton have not been extensively studied until recently. Most picoplankton species are difficult to culture and, due to their small size, often lack characteristic features that can be distinguished by light microscopy. Molecular techniques such as the sequencing of marker genes or FISH (fluorescence in situ hybridization) can overcome these problems and help in the determination of picoplankton biodiversity. Recently published data based on molecular studies confirmed the presence of new eukaryotic groups in the picoplankton (3, 4, 5).

The aim of the European Union PICODIV project† is to analyze the biodiversity and abundance of picoplankton at various sites throughout the year. For these studies, molecular approaches are combined with "classical" methods such as light/electron microscopy,

culturing, and pigment analysis. Here we describe the large-scale sequencing of environmental rRNA genes by QIAGEN Genomics Sequencing Services as an efficient way to examine the biodiversity of picoplankton.

Materials and methods

Samples were collected on a monthly or bimonthly basis at three sites in European coastal waters (Roscoff, France; Barcelona/Blanes Bay, Spain; and Helgoland, Germany). 5–10 liters of seawater was filtered through 3 μ m filters, and this filtrate was then passed through 0.2 μ m filters.

Environmental DNA was isolated from the 0.2 μ m filters, and complete 18S and 16S rRNA genes were amplified by PCR using universal primers. PCR products were purified by agarose gel electrophoresis or using the QIAquick® PCR Purification Kit. Purified PCR products were cloned into a TA vector, generating at least 500 clones per sample. Clones were assessed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of either reamplified inserts or of plasmid DNA isolated using QIAprep® columns. Unique clones (as judged by RFLP analysis) were sequenced by QIAGEN Genomics Sequencing Services using an internal primer.

Sequences provided by QIAGEN Genomics Sequencing Services were compared to each other (to sort out redundant clones) and to 18S/16S rRNA gene databanks (RDP,

† www.sb-roscoff.fr/Phyto/PICODIV/index.html

ANNEXE VI

LISTE DES PUBLICATIONS DE L'AUTEUR

- En prep. Not F., R. Massana, M. Latasa, D. Marie, W. Eikrem, C. Colson, D. Vaultot and N. Simon. Composition and abundance of photosynthetic picoplankton in Arctic waters. En preparation pour *Deep-sea research part I oceanographic research paper*. **Publication présentée dans le Chapitre IV.**
- En prep. Blanchot J., B. Beker, L. Charpy, L.L. Huong, J.L. Martin, Y. Montel, F. Not, J. Populus. Comparisons between Camau and Tra Vinh Provinces (Mekong delta), N° 2, population structure of Phytoplankton. En préparation pour *Continental Shelf Research*.
- En prep. Zhu, F., Not, F., Massana, R., Marie, D. and Vaultot, D. Mapping of the picoeucaryotes in marine systems with quantitative PCR of 18S rRNA gene. En préparation pour *Aquatic Microbial Ecology*.
- Soumis Valentin K., F. Not, K. Romari, R. Massana, D. Vaultot and L. Medlin. New algal group comes to light. Soumis à *Nature*. **Publication présentée en Annexe III.**
- Sous presse Not, F., M. Latasa, D. Marie, T. Cariou, D. Vaultot, and N. Simon. Picoplanktonic Prasinophyceae abundances in the western English Channel determined by Fluorescent *in situ* Hybridization (F.I.S.H.). Applied and Environmental Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*. **Publication présentée dans le Chapitre III.**
- Sous presse Houdan, A., C. Billard, D. Marie, F. Not, A. G. Saez, J. R. Young, and I. Probert. Flow cytometric analysis of relative ploidy levels in holococcolithophore-heterococcolithophore (Haptophyta) life cycles. *Systematics and Biodiversity*. **Publication présentée en Annexe IV.**

- 2003 Biegala, I. C., **F. Not**, D. Vaultot, and N. Simon. Quantitative assessment of picoeukaryotes in the natural environment using taxon specific oligonucleotide probes in association with TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification - Fluorescent *In Situ* Hybridization) and flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:5519-5529. **Publication présentée en Annexe I.**
- 2002 **Not, F.**, N. Simon, I. C. Biegala, and D. Vaultot. Application of fluorescent in situ hybridization coupled with tyramide signal amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. *Aquatic Microbial Ecology*. 28:157-166. **Publication présentée dans le Chapitre II.**
- 2002 Vaultot, D., K. Romari, and **F. Not**. Are autotrophes less diverse than heterotrophs in marine picoplankton? *Trends in Microbiology*. 10:266-267. **Publication présentée en Annexe II.**
- Publication sans comité de lecture
- 2001 Valentin K., K. Romari and **F. Not**. Uncovering picoplankton biodiversity by sequencing of environmental rRNA genes. *QIAGEN NEWS* Issue N°5: 16-17. **Publication présentée en Annexe V.**

RESUME

Les picoeucaryotes photosynthétiques marins (cellules < 3 µm) regroupent des organismes distribués dans la plupart des lignées d'algues connues à ce jour. Ils contribuent de façon significative à la biomasse et à la production primaire dans les océans. Actuellement, seule une quarantaine d'espèces de picoeucaryotes a fait l'objet d'une description taxinomique. La répartition de ces espèces et leurs contributions respectives à la biomasse chlorophyllienne sont encore très mal connues. La première étape pour passer de la description de la diversité d'un écosystème à son écologie est d'appréhender l'importance relative des espèces qui le composent. C'est pourquoi nous avons tenté dans un premier temps d'identifier et de quantifier les taxons qui composent la communauté picoeucaryotique dans l'environnement. Nous avons ensuite cherché à décrire leurs répartitions dans des régions contrastées de l'Océan mondial.

Tout d'abord, un protocole d'hybridation *in situ* associé à une amplification du signal fluorescent (FISH-TSA) a été mis au point afin de dénombrer les picoeucaryotes appartenant à un taxon donné dans le milieu naturel à l'aide de sondes moléculaires spécifiques. Un jeu de sondes spécifiques d'ordres, de genres et d'espèces de Prasinophyceae a par ailleurs été développé. A l'aide de ces outils, la diversité et la distribution spatio-temporelle des communautés de picoeucaryotes et plus particulièrement des Prasinophyceae ont été explorées dans des milieux présentant des caractéristiques physico-chimiques variées : mers Arctiques, océan Indien, Manche.

Il est apparu très clairement que les Prasinophyceae et plus particulièrement l'espèce *Micromonas pusilla* dominant dans les eaux côtières et ce tout au long de l'année en Manche. La situation est différente dans les zones oligotrophes où l'on observe une stratification des communautés avec des cellules appartenant à la division des Haptophyta en surface et des cellules appartenant à la Division des Chlorophyta au maximum profond de chlorophylle.

Par ailleurs, nos études en milieu côtier nous ont permis de mettre en évidence, pour la première fois en milieu marin, des organismes photosynthétiques apparentés aux Glaucophyta.

Mots clés : picoplancton – hybridation *in situ* fluorescente – Prasinophyceae - biogéographie

ABSTRACT

Marine photosynthetic picoeukaryotes (cells < 3 μm) are composed of organisms widespread in all algal lineages known to date. They contribute significantly to both biomass and primary production in the ocean. To date, only about 40 species are formally described. The distribution of those species and their contribution to chlorophyll biomass are virtually unknown. The knowledge of such basic data is of prime importance to understand the diversity and ecology of an ecosystem. For this reason, we developed and utilized approaches to simultaneously identify and quantify the taxa which compose environmental picoeukaryotic communities and studied their distribution across various regions of the ocean.

We first adapted the fluorescent *in situ* hybridization technique coupled with signal amplification (TSA-FISH) to quantify specifically targeted picoeukaryote taxon in natural samples with oligonucleotide probes. In addition, we developed a set of probes specific for orders, genera and species of algae belonging to the class Prasinophyceae. With these tools, we investigated the distribution of picoeukaryotes communities, and more specifically of Prasinophyceae organisms. Marine regions exhibiting various physico-chemical properties, such as the Arctic seas, the Indian Ocean and the English Channel, were studied.

We demonstrated that picoeukaryotes belonging to the class Prasinophyceae, and more precisely to the species *Micromonas pusilla*, dominated coastal waters off Roscoff throughout the year and Arctic seas during the period studied. In contrast, in oligotrophic waters where picoeukaryotes communities were stratified based on water column depth, with Haptophyta in sub-surface waters and cells belonging to the Chlorophyta division at the deep chlorophyll maximum.

Furthermore, our study on coastal sampling sites revealed the presence of photosynthetic organisms related to the Glaucophyta, a primitive group of eukaryotes for which only 14 freshwater species were known.

Key words: Picoplankton – Fluorescent *in situ* hybridization – Prasinophyceae - Biogeography