

Université de Montréal

**Dynamique saisonnière des communautés nitrifiantes dans
un petit lac oligotrophe**

par

Stéphanie Massé

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biologiques

Janvier 2015

© Stéphanie Massé, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Dynamique saisonnière des communautés nitrifiantes dans un petit lac oligotrophe

Présenté par :
Stéphanie Massé

évalué par un jury composé des personnes suivantes :

David Morse, président-rapporteur
Roxane Maranger, directrice de recherche
David Walsh, co-directeur, membre du jury
Jesse Shapiro, membre du jury

Résumé

Depuis la découverte d'archées capables d'oxyder l'ammoniac en milieu aérobie, de nombreuses études ont mesuré en simultanée les taux de nitrification et la diversité des organismes oxydant l'ammoniac dans la colonne d'eau des milieux marins. Malgré l'importance globale des lacs d'eau douce, beaucoup moins d'études ont fait la même chose dans ces milieux. Dans cette étude, nous avons évalué l'importance de la nitrification et caractérisé la communauté microbienne responsable de la première étape limitante de la nitrification dans un lac tempéré durant une année entière. L'utilisation de traceur isotopique $^{15}\text{NH}_4$ nous a permis de mesurer des taux d'oxydation d'ammoniac à deux profondeurs dans la zone photique tout au long de l'année. Les taux d'oxydation d'ammoniac varient de non détectable à $333 \text{ nmol L}^{-1} \text{ j}^{-1}$ avec un pic d'activité sous la glace. De toutes les variables environnementales mesurées, la concentration d'ammonium dans la colonne d'eau semble avoir le plus grand contrôle sur les taux d'oxydation d'ammoniac. Nous avons détecté la présence d'archées (AOA) et de bactéries oxydante d'ammoniac (BOA) à l'aide de tests par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) ciblant une partie du gène ammoniac monoxygénase (*amoA*). Les AOA et les BOA ont été détectées dans la zone photique du lac, cependant seules les AOA étaient omniprésentes durant l'année. Le séquençage du gène *amoA* des archées révèle que la majorité des AOA dans le lac sont membres du groupe phylogénétique *Nitrosotalea* (également appelé SAGMGC-1 ou groupe I.1a associé), ce qui confirme la pertinence écologique de ce groupe dans les eaux douces oligotrophes. Globalement, nos résultats indiquent l'hiver comme étant un moment propice pour l'oxydation de l'ammoniac dans les lacs tempérés. Cette étude fournit un point de référence pour la compréhension du processus d'oxydation de l'ammoniac dans les petits lacs oligotrophes.

Mots-clés : Oxydation de l'ammoniac; nitrification; taux; gène *amoA*; azote; bactérie; archée; Thaumarchaeota; traceur isotopique; lacs; eaux douces; régions tempérées; lac Croche; Laurentides.

Abstract

Since the discovery that some archaea are able to oxidize ammonia aerobically, several studies have focused on measuring nitrification rates and identifying the diversity of planktonic ammonia oxidizers in marine systems. Despite the global importance of freshwater lakes, far fewer studies have done the same in these ecosystems. Here we investigated the importance of nitrification and characterize the microbial community catalyzing the first rate-limiting step of nitrification over an annual cycle in a temperate lake. The measurements of ammonia oxidation rates, using the $^{15}\text{NH}_4^+$ isotope tracer method, at two depths in the photic zone show that this process occurred throughout the entire year in the lake. Rates of ammonia oxidation ranged from undetectable to $333 \text{ nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ with a peak of activity during winter. Of all environmental variables measured, ammonium concentrations in the water-column seem to have the strongest effect on the magnitude of ammonia oxidation rates. We detected the presence of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) using polymerase chain reaction (PCR) assays targeting part of the ammonia monooxygenase (*amoA*) gene. Both AOA and AOB were detected in the photic zone of the lake, although only AOA were omnipresent over the year. The sequencing of archaeal *amoA* genes reveals that most of the AOA in the lake are members of the *Nitrosotalea* cluster (also referred as SAGMGC-1 or group I.1a associated), which confirms the ecological relevance of this cluster in oligotrophic freshwaters. Altogether, our results indicate that winter may be a critical time for ammonia oxidation in temperate lakes and provide a baseline for the understanding of ammonia oxidation in small oligotrophic lakes.

Keywords : Ammonia oxidation; nitrification; rates; *amoA* gene; nitrogen; Bacteria; Archaea; Thaumarchaeota; isotopic tracer; lakes; freshwaters; temperate climate.

Avant-propos

Le présent mémoire expose les travaux de recherche réalisés dans le cadre de ma maîtrise. Ce projet de recherche a été supervisé par le professeur Roxane Maranger et codirigée par le professeur David Walsh. Ce manuscrit est organisé en trois chapitres. Le premier chapitre comporte une revue de littérature sur la nitrification dans la colonne d'eau par les procaryotes autotrophes et énonce les problématiques ainsi que nos objectifs et hypothèses de recherche. Le deuxième chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique rédigé en anglais dans le but d'être présenté à la revue *ISME Journal* prochainement. Finalement, le troisième chapitre clos le mémoire par une conclusion générale. J'ai personnellement participé à chaque étape ayant permis de présenter ce manuscrit. Ceci comprend l'organisation et la réalisation d'un échantillonnage mensuel sur le lac Croche qui s'est échelonné sur une année. Ceci a permis la récolte de l'intégralité des données présentées dans ce mémoire. J'ai également réalisé toutes les analyses de laboratoires, ainsi que celles statistiques.

Une maîtrise de recherche est souvent accompagnée de plusieurs opportunités permettant de compléter la formation académique d'une façon unique. Celle-ci n'y faisant pas exception, j'ai eu la chance au cours de mon parcours de participer à l'organisation et aux manipulations expérimentales de deux missions scientifiques sur l'Estuaire et le Golfe du St-Laurent à bord du navire de recherche Coriolis II en 2011 et 2013. Ces missions ont été réalisées dans le but de mieux comprendre le phénomène d'anoxie dans le Saint-Laurent. J'ai également participé à une campagne d'échantillonnage sur le lac St-Pierre, un lac fluvial du St-Laurent, dans le cadre du projet GRIL « Fleuve : les herbiers des lacs fluviaux ». J'ai eu la chance de participer aussi à plusieurs congrès. J'ai notamment présenté oralement à l'ASLO meeting, en Nouvelle-Orléans en 2013, ainsi qu'à la conférence conjointe Genomes to/aux biomes réalisée à Montréal en 2014. Étant une étudiante membre du groupe de recherche interuniversitaire en limnologie et en environnement aquatique (GRIL), j'ai pu présenter à plusieurs reprises mes travaux de recherche sous forme de présentation orale ou d'affiche aux symposiums annuels du groupe de recherche.

Je tiens à remercier Roxane Maranger de m'avoir donné ces opportunités.

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT.....	II
AVANT-PROPOS.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
REMERCIEMENTS	XIII
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 CONTEXTE	2
1.2 ORGANISMES RESPONSABLES DE L' OXYDATION DE L' AMMONIAC	3
1.3 RÔLE DE LA NITRIFICATION DANS L' ENVIRONNEMENT	5
1.3.1 <i>Couplage nitrification-dénitrification</i>	<i>5</i>
1.3.2 <i>Modifie la disponibilité des formes d' N pour le phytoplancton</i>	<i>6</i>
1.3.3 <i>Puits d' O₂</i>	<i>6</i>
1.3.4 <i>Production de N₂O</i>	<i>7</i>
1.4 VARIATION DES TAUX D' OXYDATION DE L' AMMONIAC	7
1.4.1 <i>Influence des facteurs environnementaux.....</i>	<i>7</i>
1.4.2 <i>Variabilité spatiale.....</i>	<i>9</i>
1.4.3 <i>Variabilité temporelle.....</i>	<i>10</i>
1.5 VARIATION DE LA COMMUNAUTÉ OXYDANTE D' AMMONIAC	12
1.5.1 <i>Influence des facteurs environnementaux sur les AOA et les BOA.....</i>	<i>12</i>
1.5.2 <i>Variabilité spatiale.....</i>	<i>13</i>
1.5.3 <i>Variabilité temporelle.....</i>	<i>15</i>
1.6 MÉTHODES MESURANT LES TAUX DE NITRIFICATION	15
1.7 PROBLÉMATIQUES	17
1.7.1 <i>Découverte des archées oxydantes d' ammoniac</i>	<i>17</i>
1.7.2 <i>Méthodes utilisées en milieux lacustres.....</i>	<i>17</i>
1.8 OBJECTIFS DU PROJET DE MAÎTRISE	18

1.9 TABLEAUX ET FIGURES	20
CHAPITRE 2 : SEASONAL DYNAMICS OF NITRIFYING PROKARYOTES IN A SMALL OLIGOTROPHIC LAKE.....	30
ABSTRACT.....	31
INTRODUCTION.....	32
MATERIALS AND METHODS	34
RESULTS.....	43
DISCUSSION.....	47
ACKNOWLEDGEMENTS.....	54
TABLES AND FIGURES.....	55
CHAPITRE 3 : CONCLUSIONS GÉNÉRALES	67
BIBLIOGRAPHIE.....	72
ANNEXE A : SUPPLÉMENT POUR LE CHAPITRE 2	I

Liste des sigles et abréviations

‰	Partie par mille / <i>Per mille</i>
ACP / PCA	Analyse en composantes principales / <i>Principal component analysis</i>
AMO / <i>amo</i>	Ammoniac monooxygénase / <i>Ammonia monooxygenase</i>
<i>amoA</i>	Site actif de la protéine ammoniac monooxygénase / <i>alpha-subunit of amo</i>
AOA	Archées oxydantes d'ammoniac / <i>Ammonia-oxidizing archaea</i>
ARNr 16S / <i>16S rRNA</i>	ARN ribosomique 16S / <i>16S ribosomal RNA</i>
ARU / <i>URT</i>	Arbre de régression univarié / <i>Univariate regression tree</i>
BOA / <i>AOB</i>	Bactéries oxydante d'ammoniac / <i>Ammonia-oxidizing bacteria</i>
BON / <i>NOB</i>	Bactéries oxydante de nitrite / <i>Nitrite-oxidizing bacteria</i>
C	Carbone / <i>Carbon</i>
CO ₂	Dioxyde de carbone
¹⁴ CO ₂	Radio-isotope de carbone / <i>Radioactive isotope of carbon 14</i>
δ	Notation <i>delta</i> / <i>delta notation</i>
ΔN ₂ O	Excès d'oxyde nitreux dans l'eau ou écart par rapport à la saturation / <i>Excess of nitrous oxide in the water or deviation from saturation</i>
HAO	Hydroxylamine oxydoréductase / <i>Hydroxylamine oxidoreductase</i>
I ₀	Lumière incidente / <i>Incident light</i>
I _z	Intensité lumineuse à une profondeur z / <i>Light intensity at depth z</i>
MCO / <i>OLS</i>	Moindres carrés ordinaires / <i>Ordinary least squares</i>
N	Azote / <i>Nitrogen</i>
¹⁵ N	Isotope stable d'azote 15 / <i>Stable isotope of nitrogen 15</i>
N ₂	Azote gazeux / <i>Dinitrogen</i>
NH ₃	Ammoniac / <i>Ammonia</i>
NH ₄ ⁺	Ammonium
NH ₂ OH	Hydroxylamine

NID / <i>DIN</i>	Azote inorganique dissous / <i>Dissolved inorganic nitrogen</i>
NO	Monoxyde d'azote / <i>Nitric oxide</i>
NO ₂ ⁻	Nitrite
NO ₃ ⁻	Nitrate
N ₂ O	Oxyde nitreux / <i>Nitrous oxide</i>
O ₂	Oxygène / <i>Oxygen</i>
OA / <i>AO</i>	Oxydation de l'ammoniac / <i>Ammonia oxidation</i>
OD	Oxygène dissous / <i>Dissolved oxygen</i>
OTU	Unité taxonomique opérationnelle / <i>Operational taxonomic unit</i>
PCR	Réaction en chaîne par polymérase / <i>Polymerase chain reaction</i>
<i>p</i> N ₂ O	Pression partielle d'oxyde nitreux / <i>Partial pressure of nitrous oxide</i>
POA / <i>AOP</i>	Procaryotes oxydants d'ammoniac / <i>Ammonia-oxidizing prokaryotes</i>
<i>Q</i> ₁₀	Coefficient de température/ <i>Temperature coefficient</i>
RFLPs	Polymorphismes de longueur des fragments de restriction / <i>Restriction fragment lenght polymorphisms</i>
RPA / <i>PAR</i>	Rayonnement photosynthétiquement actif / <i>Photosynthetically active radiation</i>

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Méthodes mesurant les taux d'oxydation d'ammoniac dans la colonne d'eau...26	
Table 2.1. Summary of simple linear regressions using ordinary least squares (OLS) of square root transformed ammonia oxidation rates vs transformed environmental variables. ... 60	
Table 2.2. Comparison of ammonia oxidation rates reported for pelagic environments..... 66	
Table A.1. Summary of ratio of irradiance at depth z to irradiance at the surface of the lake, irradiance at depth z, temperature of water, dissolved oxygen saturation, dissolved oxygen concentration, pH, ammonium, nitrite and nitrate concentration, ammonia oxidation rate, and delta nitrous oxide concentration in water for the sampled period of October 2011 to October 2012 in Lake Croche..... II	

Liste des figures

Figure 1.1. Représentation schématique des principales transformations biologiques de l'azote (N) dans l'environnement.....	20
Figure 1.2. Arbre phylogénétique basé sur le gène <i>amoA</i> de bactéries oxydante d'ammoniac (AOB) du groupe des betaprotéobactéries.	21
Figure 1.3. Arbre consensus illustrant les cinq groupes phylogénétiques principaux d'archées basé sur le gène <i>amoA</i>	22
Figure 1.4. Représentation schématique simplifiée résumant le rôle de la nitrification sur son environnement immédiat et, à plus grande échelle, sur le climat.....	23
Figure 1.5. Dendrogramme basé sur des séquences du gène 16s rDNA montrant la relation phylogénétique entre des bactéries oxydantes d'ammoniac isolées en culture.....	24
Figure 1.6. Arbre phylogénétique basé sur des séquences du gène <i>amoA</i> des archées provenant d'échantillons de huit types d'habitat (sols, eaux douces, sédiment des eaux douces, sédiments estuariens, eaux marines, sédiments marins, systèmes géothermiques et symbiose).....	25
Figure 1.7. (A) Évolution du nombre d'articles portant sur la nitrification publiés par années depuis 1872 jusqu'au 31 mai 2014 et en (B), l'évolution du nombre des séquences du gène <i>amoA</i> des archées et des bactéries soumit à la base de données National Center for Biotechnology Information (NCBI).	27
Figure 1.8. Carte représentant la base de données « Global Lakes and Wetlands Database (GLWD) » créée par Lehner and Döll et al 2004 qui inclus les lacs $\geq 0.1 \text{ km}^2$	28

Figure 1.9. (A) Densité des lacs sur le continent selon leur aire de surface. (B) Densité des lacs en fonction de leur aire de surface déterminée par des analyses à l'aide de système d'information géographique (SIG) et de recensements..... 29

Figure 2.1. Geographical location of Lake Croche..... 55

Figure 2.2. Temporal variation of ammonium concentrations in (A), and nitrite+nitrate concentrations in (B) at both depths sampled during day and night. 56

Figure 2.3. Principal component analysis (PCA) of environmental factors at both depths sampled during day and night, scaling type 1 (=distance biplot)..... 57

Figure 2.4. Seasonal variation of ammonia oxidation rates at both depths sampled during day and night. 58

Figure 2.5. Box and dot plots of ammonia oxidation rates according to (A) the season and (B) the depth for all the dataset and (C) the sampling time over the diel cycle. 59

Figure 2.6. In (A), linear regression of ammonia oxidation rate vs ammonium concentration. In (B), univariate regression tree analysis of the ammonia oxidation rate..... 61

Figure 2.7. Box and dot plots of delta nitrous oxide concentrations in water (deviation from equilibrium with air) according to the season for the dataset from February to October 2012 (=28 sites)..... 62

Figure 2.8. Presence of archaeal and bacterial *amoA* gene fragment at both depths during the day. 63

Figure 2.9. Phylogenetic relationships among archaeal *amoA* sequences from Lake Croche (in color) and previously reported environmental sequences. 64

Figure 2.10. Phylogenetic relationships among bacterial *amoA* sequences from Lake Croche (in color) and previously reported environmental sequences..... 65

Figure A.1. Temporal variation of light at both depths sampled during day and night..... I

Figure A.2. Annual variation in (A) water temperature, (B) dissolved oxygen, (C) pH and (D) light through the day..... IV

Figure A.3. Principal component analysis (PCA) of environmental factors at both depths sampled during day and night, scaling type 1 (=distance biplot)..... V

*À ma mère qui m'a toujours encouragé à étudier
ce que j'aimais, à Marie-Pier et Cynthia, mes
sœurs de maîtrise et à Florian qui a toujours été
là pour moi malgré l'océan qui nous sépare.*

*We have the habit in writing articles published
in scientific journals to make the work as
finished as possible, to cover all the tracks, to
not worry about the blind alleys or to describe
how you had the wrong idea first, and so on. So
there isn't any place to publish, in a dignified
manner, what you actually did in order to get to
do the work. – Richard Feynman, physicist
(Nobel Lecture, 11 December 1965)*

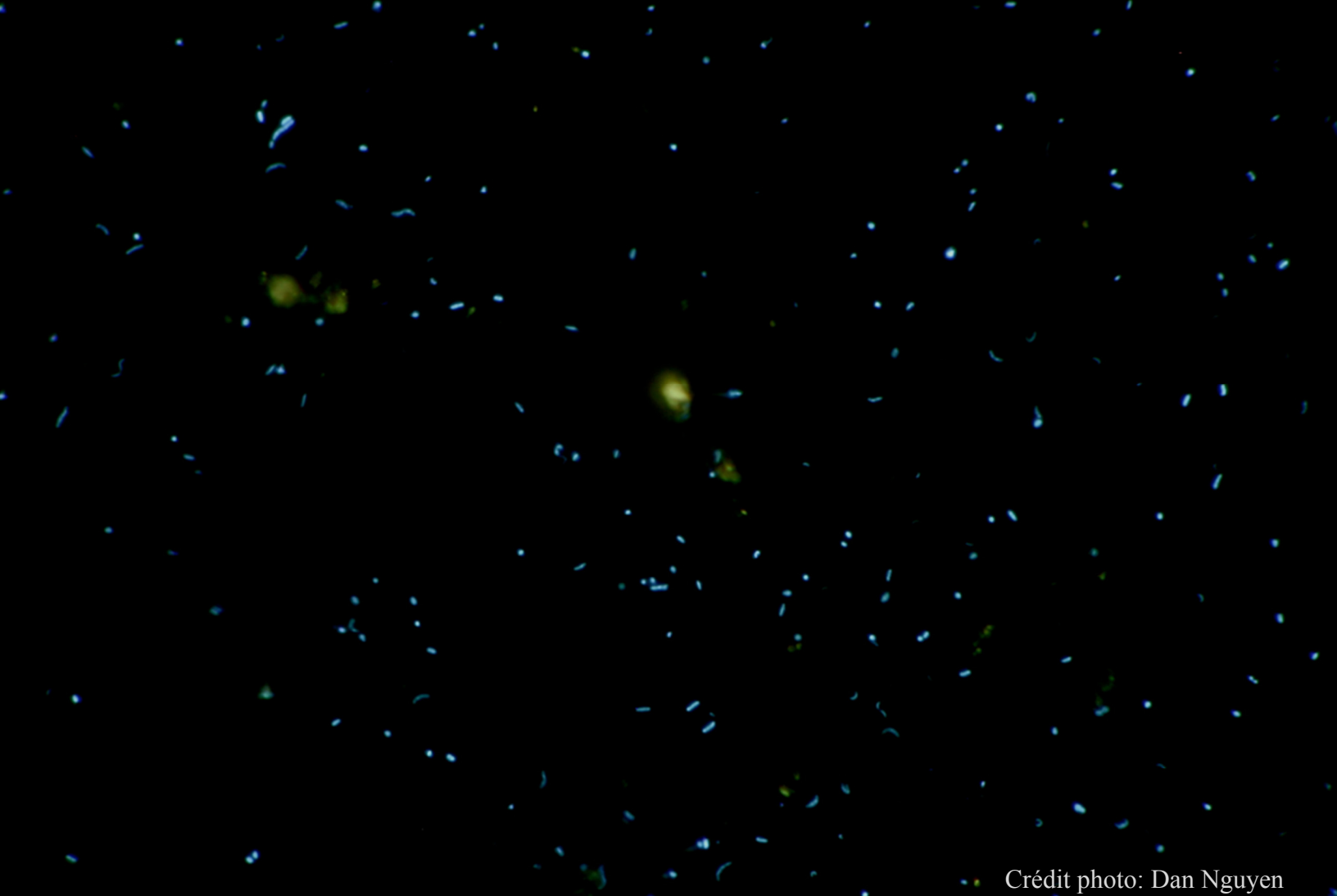
Remerciements

Je tiens à remercier Roxane Maranger, ma directrice, de m'avoir fait confiance avec ce projet et de m'avoir permis de découvrir l'univers fascinant des procaryotes. Les archées et les bactéries auront dorénavant une place importante dans mon cœur et je l'espère dans mon avenir. Merci à mon co-directeur, David Walsh, pour son enthousiasme contagieux, sa bonne humeur et sa disponibilité.

Je voudrais remercier les membres de mon laboratoire qui sont devenus des amis très chers. Un merci spécial à ceux qui, un à la fois, m'ont accompagné lors de mes périodes d'échantillonnage. Ils ont bravé le froid, la pluie et le manque de sommeil. Dans l'ordre chronologique de l'échantillonnage: Marie-Pier Hébert, Sara Dupont, Jean-Olivier Goyette, Cynthia Soued et Philippe Galipeau St-Pierre. Je remercie les employés de la Station de biologie des Laurentides de l'Université de Montréal pour la logistique lors des échantillonnages et pour les bons repas. Je remercie également les membres du laboratoire de David Walsh; Ting Ting Cui, Heba El-Swais, David Colatriano, Michael Gasse, Arthi Ramachandran et Travis Dawson, pour m'avoir initié aux méthodes utilisées dans leur laboratoire et pour avoir pris le temps de répondre à mes questions concernant les analyses au moment de mes balbutiements en biologie moléculaire.

Je remercie Marie-Pier et Cynthia grâce à qui je ne me suis jamais sentie seule durant ce projet, avec qui j'ai pu échanger des idées et demander conseil. J'espère sincèrement qu'il en restera de même pour la suite. Je remercie Josée, ma mère, qui croit toujours en ce que j'entreprends et qui est toujours là pour me rassurer dans les moments de doutes. Je remercie Florian d'appuyer mes choix de carrière même lorsqu'ils nous éloignent géographiquement l'un de l'autre.

Merci à Dominic Bélanger, Damian Grundle, Laura Bristow et Xuenfang « Nick » Peng pour leurs précieux conseils concernant la mesure de l'activité nitrifiante. Merci à Morgan Botrel pour son aide dans les analyses isotopiques. Merci à Alisson Santoro de m'avoir envoyé des clones afin que je puisse disposer de contrôles positifs. Je remercie Catherine Baltazar, Marie-Pier Hébert, Dan Nguyen, Cynthia Soued et Katerine Goyer d'avoir pris le temps de relire des sections de ce mémoire.



Crédit photo: Dan Nguyen

Chapitre 1 : Introduction générale

1.1 Contexte

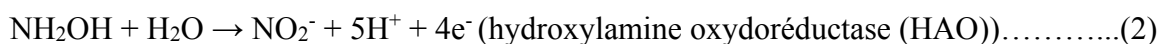
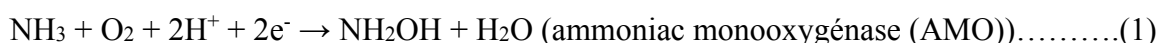
L'azote (N) se distingue de la majorité des autres éléments dans l'environnement de par sa grande diversité de formes chimiques et de ce fait par la multitude de transformations propres à cet élément (Figure 1.1). Dans les milieux aquatiques, pratiquement toutes ces transformations font partie du métabolisme de microorganismes. Certains de ces organismes assimilent l'azote sous différentes formes afin de synthétiser des composants structurels, alors que d'autres le transforment afin d'obtenir de l'énergie pour croître. La nitrification est l'une de ces transformations par lequel l'ammoniac (NH_3) ou l'ammonium (NH_4^+) est premièrement oxydé en nitrite (NO_2^-) et ensuite en nitrate (NO_3^-). Elle est réalisée par des procaryotes afin d'acquérir de l'énergie. C'est un processus clé ayant un impact sur son environnement immédiat en contribuant à la distribution et à la disponibilité de ces trois formes d'azote dans le milieu. C'est ainsi que la nitrification influe sur la croissance et la composition des communautés de phytoplancton et autres procaryotes. Plus précisément, la nitrification peut supporter une part importante de la demande en NO_3^- du phytoplancton (Grundle et al, 2013) et par le fait même influencer la composition de la communauté phytoplanctonique en favorisant certaines espèces. La nitrification fournit également le substrat à la dénitrification, qui transforme le nitrate en azote gazeux (N_2), menant à une perte d'azote du système sous forme gazeuse. La nitrification a aussi un impact sur le climat en produisant un puissant gaz à effet de serre, l'oxyde nitreux (N_2O), comme sous-produit de la réaction.

Les deux étapes de la nitrification sont réalisées par des microorganismes appartenant à des groupes fonctionnels différents. Jusqu'à ce jour, on ne connaît aucun organisme capable d'effectuer à la fois la première et la deuxième étape de la nitrification (Teske et al, 1994; Ward, 2008). Dans les milieux naturels, la nitrification classique (aérobie) est considérée comme étant effectuée majoritairement par des organismes autotrophes obligatoires (Ward, 2008). Néanmoins, certaines archées possèdent des gènes impliqués dans le processus de la nitrification sans toutefois être autotrophes obligatoires. En étant mixotrophes, cela leur permet d'utiliser également des formes organiques de carbone afin d'acquérir leur énergie (Hallam et al, 2006). Ce projet porte sur la première étape de la nitrification, l'oxydation de

l'ammoniac, étant considérée comme l'étape limitant ce processus. De plus, c'est lors de l'oxydation de l'ammoniac qu'il y a production de N₂O (Stein, 2011).

1.2 Organismes responsables de l'oxydation de l'ammoniac

On retrouve des organismes oxydant l'ammoniac dans le domaine des Archées et le domaine des Bactéries. La majorité connue jusqu'à ce jour sont chimiolithoautotrophes, c.-à-d. qu'ils utilisent le NH₃ ou le NH₄⁺ comme seul pouvoir réducteur afin de fixer le dioxyde de carbone (CO₂), leur source de carbone. Ils utilisent comme substrat davantage le NH₃ que le NH₄⁺ (Martens-Habbena et al, 2009; Suzuki et al, 1974; Ward, 1987b), car ce dernier nécessite un transport membranaire actif au lieu d'une simple diffusion (Nicol et al, 2008). La réaction globale de la première étape de la nitrification, effectuée par les bactéries oxydant l'ammoniac (BOA), [Eq.(4)] montre que ce processus consomme de l'oxygène (O₂) et produit des ions hydrogènes en plus du NO₂⁻. Les BOA possèdent l'enzyme ammoniac monooxygénase (AMO) qui leur permet d'oxyder l'ammoniac en hydroxylamine (NH₂OH) [Eq.(1)]. Le NH₂OH est ensuite oxydé en NO₂⁻ par l'enzyme hydroxylamine oxydoréductase (HAO) [Eq.(2)]. Finalement, la dernière oxydase [Eq.(3)] consomme à nouveau de l'oxygène afin de produire de l'ATP pour le métabolisme de la cellule.



Les archées oxydant l'ammoniac (AOA), quant à elles, possèdent dans leur génome un gène homologue à celui des BOA, codant pour l'enzyme AMO. Néanmoins, la biochimie de la réaction chez les archées diffère de celle des BOA. En effet, jusqu'à maintenant aucun

homologue au gène codant pour le deuxième enzyme impliquée dans l'oxydation de l'ammoniac (c.-à-d., HAO) n'a été retrouvé dans le (méta-) génome des AOA (Martens-Habbenha & Stahl, 2011; Vajrala et al, 2013). Récemment, des expériences physiologiques combinées à l'usage de traceur isotopique ont démontré que les archées utilisent bien la conversion de l'ammoniac en nitrite afin d'acquérir leur énergie en passant par la production et la consommation de NH_2OH . Elles utiliseraient donc un complexe d'enzyme non connu à ce jour (Vajrala et al, 2013). Malgré les différences au sein de la biochimie de la réaction entre les bactéries et les archées, le ratio de molécule de carbone (C) fixée par molécule d'ammoniac oxydée est semblable chez les BOA et les AOA; soit de 8 à 42 mol de NH_3 par mole de C assimilée pour les BOA (Billen, 1976; Carlucci & Strickland, 1968; Glover, 1985) et 25 mol de NH_3 par mole de C fixée pour les AOA (Könneke et al, 2005). Ainsi, même si les AOA utilisent un processus différent des BOA pour oxyder l'ammoniac et pour fixer le CO_2 , leurs impacts stœchiométriques respectifs sur le cycle du carbone et de l'azote demeurent semblables (Ward, 2011b).

On connaît l'existence de bactéries oxydant l'ammoniac depuis plus de 100 ans, la première ayant été isolée en 1890 (Winogradsky, 1890). Toutes les BOA sont restreintes aux groupes monophylétiques des Gamma- et des Betaprotéobactéries (Purkhold et al, 2000). La phylogénie des BOA est basée sur le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), mais également sur le gène codant pour le site actif de la protéine AMO : *amoA*. En effet, le gène *amoA* est largement utilisé comme marqueur génétique, car il est très conservé et est présent chez toutes les BOA (Francis et al, 2005). Les BOA du groupe des Betaprotéobactéries sont distribuées selon sept lignées distinctes (Figure 1.2). Le grand groupe *Nitrosomonas* comprend six de ces lignées : *Nitrosomonas europaea*/*Nc. mobilis*, *Nitrosomonas communis*, *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas cryotolerans*, *Nitrosomonas sp Nm143*. À cela s'ajoute le groupe phylogénétique *Nitrospira*. Le groupe des Gammaprotéobactéries ne comprend qu'un genre : *Nitrosococcus* (Koops et al, 2006).

La découverte d'un gène homologue à celui des BOA codant pour l'enzyme AMO chez des archées est très récente (Treich et al, 2005; Venter et al, 2004). La première isolation d'une AOA, *Nitrosopumilus maritimus*, ne remonte qu'en 2005 (Könneke et al,

2005). Les AOA ont d'abord été classées avec les archées du phylum des Crenarchaeota, reposant sur la diversité du gène codant l'ARNr 16S. En 2008, basé sur le séquençage intégral du génome de l'archée *Cenarchaeum symbiosum*, Brochier-Armanet et al (2008) proposent de créer un nouvel embranchement du nom de Thaumarchaeota (« thaumas » du grecque signifiant étonnement ou merveille), divisant les archées en trois phylum : les Crenarchaeota, les Thaumarchaeota et les Euryarchaeota. Le regroupement des AOA dans leur propre phylum a par la suite été confirmé par le séquençage du génome complet de deux autres espèces de AOA (Pester et al, 2011; Spang et al, 2010). Selon la phylogénie de Pester et al (2012) basée sur les séquences du gène *amoA*, les AOA se répartissent selon cinq groupes monophylétiques principaux (Figure 1.3). Le nom de chaque groupe correspond au genre de la première archée représentative du groupe mise en culture.

1.3 Rôle de la nitrification dans l'environnement

La nitrification joue un rôle central dans la biogéochimie des écosystèmes. Son impact sur le milieu est résumé dans la figure 1.4 et détaillé dans les sections suivantes.

1.3.1 Couplage nitrification-dénitrification

La nitrification nécessite de l'oxygène alors que la dénitrification, le processus par lequel le NO_3^- est transformé par une série d'étapes semi-indépendantes en N_2 , est généralement effectuée par des organismes hétérotrophes anaérobiques facultatifs. Puisque la nitrification produit le substrat de la dénitrification, et en raison du caractère microaérophiles des organismes nitrifiants, ces deux réactions sont souvent couplées aux interfaces oxygène/anoxique dans la colonne d'eau ou les sédiments (Ward, 1996). Ce couplage est d'une grande importance, car la dénitrification constitue la principale sortie d'azote du système (Ward, 1996). Ainsi, l'interaction entre la nitrification et la dénitrification influence l'inventaire d'azote autant dans les systèmes naturels que dans ceux aménagés par l'Homme (Ward, 2011b).

1.3.2 Modifie la disponibilité des formes d’N pour le phytoplancton

Les deux étapes de la nitrification permettent de transformer le NH_3 ou le NH_4^+ présent dans le milieu en NO_2^- et en NO_3^- modifiant ainsi le *pool* de ces différentes formes d’azote dans l’eau. Le phytoplancton fixe le CO_2 et assimile l’azote inorganique dissous durant la photosynthèse et la croissance. Le coût métabolique associé à l’assimilation diffère toutefois selon la forme d’azote utilisée, mais aussi selon les organismes (Blomqvist et al, 1994; Présing et al, 2008; Watson & McCauley, 2005). Par exemple, les cyanobactéries non-fixatrice d’azote sont favorisées dans les milieux où l’azote est présent majoritairement sous forme de NH_4^+ , alors que dans les milieux riches en NO_3^- le phytoplancton eucaryote s’avère plus compétitif que les cyanobactéries (Blomqvist et al, 1994). La nitrification peut donc influencer la composition de la communauté phytoplanctonique. De plus, des études démontrent que la nitrification fournit une partie de la demande en NO_3^- de la communauté phytoplanctonique (ex., Ward et al, 1989). L’oxydation de l’ammoniac peut supporter entre 2 et 150% de la demande journalière en NO_3^- en milieu marin (Grundle & Juniper, 2011; McCarthy et al, 1999). La contribution relative de la nitrification aux apports totaux de NO_3^- en système lacustre dépend des caractéristiques du lac; elle semble plus élevée dans les lacs stratifiés que dans les lacs peu profonds (Stewart et al, 1982). L’importance des différentes sources de NO_3^- semble aussi varier selon les saisons dans les lacs; la proportion des apports totaux en NO_3^- attribuée à la nitrification est plus élevée au printemps, correspondant à la mise en place de la stratification, et au cours de l’été (Hall, 1986).

1.3.3 Puits d’O₂

La première étape de la nitrification constitue une fraction de la consommation totale d’oxygène dissous (ex., 25% dans le lac Grasmere (Hall et al, 1978) et l’inlet Saanich (Grundle & Juniper, 2011)). Dans certain cas, elle peut représenter une part importante de la consommation d’oxygène dans un lac, particulièrement lorsque le lac est recouvert de glace en hiver. En effet, une étude réalisée dans un lac mésotrophe en hiver a attribué 71% de la consommation d’O₂ à la nitrification (Knowles & Lean, 1987).

1.3.4 Production de N₂O

Le N₂O est un puissant gaz à effet de serre avec un potentiel de réchauffement 310 fois supérieur au CO₂ (Trogler, 1999). La contribution des milieux aquatiques aux émissions de N₂O est estimée à 35% (Seitzinger et al, 2000). La nitrification est considérée comme l'un des processus contribuant de façon majeure aux émissions de N₂O (Carini & Joye, 2008; de Wilde & de Bie, 2000). Ce gaz est produit par les BOA : (1) durant l'oxydation aérobie du NH₂OH, au cours de la première étape de la nitrification et (2) durant la nitrification-dénitrification, un processus réduisant le NO₂⁻ en N₂O via le monoxyde d'azote (NO) (Stein, 2011). La proportion d'azote converti en NO et en N₂O par les BOA durant la nitrification-dénitrification est augmentée dans des conditions microaérobies (Goreau et al, 1980; Kester et al, 1997; Lipschultz et al, 1981; Stieglmeier et al, 2014). Les AOA sont également capable de produire du N₂O (Santoro et al, 2011). Toutefois, les résultats d'une étude récente réalisée sur des AOA en cultures pures, *Nitrosphaera viennensis* et *Nitrosopumilus maritimus*, révèlent que contrairement aux BOA, les archées ne sont pas capables de nitrification-dénitrification. Ainsi, elles ne produisent pas davantage de N₂O dans les milieux pauvres en oxygène (Stieglmeier et al, 2014).

1.4 Variation des taux d'oxydation de l'ammoniac

1.4.1 Influence des facteurs environnementaux

Les lacs des régions tempérées sont des systèmes hétérogènes ayant des caractéristiques physiques et chimiques très différentes dépendamment de la profondeur dans la colonne d'eau. Ces systèmes sont également très dynamiques subissant des changements physico-chimiques selon les cycles circadien et saisonnier. Plusieurs facteurs environnementaux déterminent la variabilité spatiale et temporelle de l'oxydation de l'ammoniac dans l'environnement :

Concentration d' NH_4^+ . Des études antérieures ont démontré que la disponibilité du substrat de l'oxydation de l'ammoniac, le NH_4^+ , est un facteur déterminant pouvant limiter les taux de nitrification. L'effet du NH_4^+ a été plus particulièrement observé dans les milieux pauvres en nutriment, notamment dans les sites d'un fjord marin caractérisés par des concentrations en $\text{NH}_4^+ < 0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$. En effet, les taux de nitrification étaient corrélés positivement aux concentrations de NH_4^+ (Grundle & Juniper, 2011). De plus, une étude réalisée dans un lac oligotrophe, a démontré le pouvoir limitant du NH_4^+ dans certains milieux : l'ajout de NH_4^+ ayant provoqué une augmentation de l'activité nitrifiante dans les eaux de l'hypolimnion (Small et al, 2013). Une autre étude met en évidence le rôle du NH_4^+ sur l'ordre de grandeur des taux dans la mer de Chukchi : les taux maximaux mesurés dans la couche d'eau au dessus des sédiments étaient corrélés positivement avec les taux de régénération de l'ammonium (Souza et al, 2014).

Intensité lumineuse. La lumière joue un rôle de première importance en inhibant la nitrification (Ward, 2008, spécialement les références dans la section 4.4). Plus précisément, des expériences sur des organismes en culture montrent que la lumière affecte la première étape de la nitrification, catalysée par l'enzyme AMO, chez les AOA et les BOA (Merbt et al, 2012). Il semble qu'en milieu naturel il en soit de même. En effet, une étude réalisée en milieu marin sur une période de deux ans, a toujours mesuré les taux de nitrification les plus élevés aux intensités lumineuses les plus faibles (Ward, 2005). Étonnamment, des taux de nitrification faibles étaient tout de même mesurés à toutes les intensités lumineuses, démontrant ainsi qu'une activité nitrifiante est également possible dans les régions éclairées par les rayons du soleil. La turbidité et la turbulence pourraient expliquer l'occurrence de tels taux dans la zone photique en diminuant la photoinhibition des organismes nitrifiants (Ward, 2008).

Concentration d' O_2 . Malgré que l'oxydation de l'ammoniac requiert de l'oxygène, des taux d'oxydation d'ammoniac ont fréquemment été mesurés dans des milieux caractérisés par des concentrations d'oxygène dissous (OD) aussi faibles que $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Caffrey et al, 2007; Grundle & Juniper, 2011; Lipschultz et al, 1990; Newell et al, 2011; Ward & Zafiriou, 1988). Ceci démontre la versatilité des organismes nitrifiants face aux concentrations d' O_2 .

pH. Une baisse du pH réduit de manière exponentielle le substrat préférentiel de la première étape de la nitrification, le NH_3 (Zeebe & Wolf-Gladrow, 2001). Des expériences en laboratoire ont permis de démontrer qu'une baisse de pH de l'eau de mer de seulement 0,05 à 0,14 unité de pH était suffisante pour diminuer les taux de nitrification de 3 à 44 % d'une communauté d'organismes nitrifiants marins (Beman et al, 2011).

Température. La température peut jouer un rôle dans le contrôle des taux comme le démontre l'étude de Berounsky and Nixon (1990). Cette étude, réalisée en système côtier au cours d'une année, montrait des taux saisonniers fortement corrélés à la température. Néanmoins, la première étude à tester expérimentalement l'effet de la température sur un assemblage naturel marin d'organismes oxydants d'ammoniac dominé par des AOA a conclu que la température n'avait pas d'effet significatif sur les taux d'oxydation d'ammoniac (Horak et al, 2013). La gamme de température testée était celle que le milieu subit naturellement (8 à 20 °C).

1.4.2 Variabilité spatiale

Les facteurs environnementaux qui ont un effet potentiel sur la nitrification peuvent différer grandement d'un lac à l'autre ou d'un type d'écosystème à l'autre (ex., lacs d'eau douce, systèmes côtiers, haute mer). C'est pourquoi on observe une grande variabilité dans l'étendue des valeurs d'activité oxydante d'ammoniac mesurées jusqu'à présent, celles-ci variant de 0 à 550 $\text{nmol L}^{-1} \text{ j}^{-1}$ (Tables and figures, Table 2.2).

On observe cette variabilité également au sein d'un même système. Dans les océans, les taux de nitrification varient selon la profondeur : les taux maximum sont souvent observés à la base de la zone euphotique entre 17 et 1% de la lumière incidente (I_0) (Grundle & Juniper, 2011; Ward et al, 1984; Ward, 1987a; Ward & Kilpatrick, 1990; Ward, 2005; Yool, 2007). Une telle distribution peut s'expliquer par le fait qu'à cette profondeur, les organismes nitrifiants subissent une plus faible photoinhibition et font face à une plus faible compétition pour leur substrat avec le phytoplancton. Le caractère microaérophile des AOA et des BOA

leur permet de croître près des zones hypoxiques où l'on retrouve une accumulation de NH_4^+ . C'est pourquoi, dans les lacs, les taux de nitrification tendent à augmenter avec la profondeur. De plus, la stratification du lac peut influencer la distribution de la nitrification dans la colonne d'eau, comme par exemple lorsqu'un hypolimnion anoxique se développe au cours de l'été, la nitrification n'a plus lieu dans cette zone (Stewart et al, 1982).

1.4.3 Variabilité temporelle

Dans les lacs des régions tempérées, la température joue un rôle indirect en induisant la stratification et les périodes de brassage. Ces mécanismes changent la distribution du NH_4^+ dans la colonne d'eau et par le fait même les taux d'oxydation d'ammoniac. Vissers et al (2013) ont mesuré les plus grandes quantités de transcrits du gène *amoA* des AOA et des BOA juste avant et après la période de stratification. Ceci démontre une plus grande activité métabolique de ces organismes au moment des périodes de brassage. Les auteurs en concluent que la communauté oxydante d'ammoniac est capable de répondre rapidement aux changements de conditions dans le lac, comme de la disponibilité du NH_4^+ .

Dans les couches supérieures d'un lac, la disponibilité du NH_4^+ est également influencée par la taille de la communauté d'organismes photosynthétique, ces derniers assimilant le NH_4^+ . Le pic d'abondance du phytoplancton se produit typiquement en été, ce qui rend cette saison moins favorable à la présence de procaryotes nitrifiants en surface. Effectivement, malgré que les suivis saisonniers sur le sujet soient rares, ceux-ci supportent une plus grande activité en dehors de la période de stratification en été. Une étude réalisée dans les eaux de surface en région polaire a mesuré des taux de nitrification 24 fois plus élevés en hiver sous la glace qu'en été (Christman et al, 2011). Ils proposent, pour expliquer cette différence entre les deux saisons, la faible abondance de phytoplancton, les fortes concentrations de NH_4^+ combinées à la faible quantité de lumière pénétrant la colonne d'eau due à la couverture de glace et de neige. Ceci ne semble pas être limité aux régions polaires, comme des taux de nitrification dans un lac en région tempérée et une augmentation de la croissance des populations oxydante d'ammoniac dans un lac en région péréalpine ont été

mesurés dans les eaux de surface en lac durant l'hiver (Knowles & Lean, 1987; Vissers et al, 2013a).

D'autres organismes présents dans la colonne d'eau peuvent avoir, comme le phytoplancton, un impact sur la nitrification illustrant bien l'état dynamique des interactions biotiques existant en lacs. Plus précisément, une étude réalisée dans un lac périalpin, a montré que le nombre de transcrits du gène *amoA* des AOA et des BOA dans toute la colonne d'eau pouvait être corrélé à l'abondance de zooplancton herbivore et de cyanobactérie fixatrice de N₂ (Vissers et al, 2013a). Les auteurs émettent l'hypothèse que ces organismes fourniraient le NH₄⁺ directement ou indirectement, via la minéralisation de la matière organique, nécessaire aux organismes oxydant d'ammoniac.

Nous avons vu dans les sections précédentes que les facteurs physico-chimiques ainsi que les interactions biotiques varient temporellement selon les saisons, affectant ainsi les taux de nitrification. Comme ces mêmes facteurs peuvent varier dans un lac entre le jour et la nuit, cela nous amène à se demander si les taux de nitrification varient également. Surprenamment, la dynamique circadienne des procaryotes nitrifiants, comme beaucoup d'autres procaryotes, est inconnue. À notre connaissance, toutes les mesures *in situ* de taux reportées dans la littérature ont été prises durant le jour. Comme les AOA et les BOA sont inhibées complètement ou partiellement par la lumière (Merbt et al, 2012), on peut s'attendre à ce qu'il y ait plus d'activité nitrifiante durant la nuit dans la zone euphotique des milieux aquatiques que durant le jour. De plus, en absence de lumière pour la photosynthèse, il n'y a plus de compétition avec le phytoplancton pour le NH₄⁺. Cela reste toutefois à vérifier.

1.5 Variation de la communauté oxydante d'ammoniac

1.5.1 Influence des facteurs environnementaux sur les AOA et les BOA

Bien que l'on retrouve des organismes oxydant l'ammoniac à la fois dans le domaine des Archées et des Bactéries, plusieurs études arrivent à la conclusion que les AOA et les BOA occupent des niches écologiques différentes. Ceci s'expliquerait par le fait qu'elles ne sont pas affectées par l'environnement de la même façon (French et al, 2012; Martens-Habbena et al, 2009; Merbt et al, 2012). Cependant, les AOA et les BOA peuvent également coexister dans un même habitat comme le démontre une étude réalisée en lac périalpin (Vissers et al, 2013a).

Concentration d' NH_4^+ . Les archées sont capables d'acquérir leur énergie par l'oxydation de l'ammoniac dans des milieux extrêmement pauvre en NH_4^+ comparativement aux bactéries. Ces dernières possèdent une forte affinité pour le substrat (seuil de concentration extrêmement bas: $< 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$), comparativement aux bactéries qui ont besoin d'un seuil de concentration 100 fois supérieur ($> 1 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Martens-Habbena et al, 2009).

Intensité lumineuse. La lumière influence également différemment les AOA des BOA. Afin de déterminer si l'inhibition par la lumière peut influencer la distribution des AOA et des BOA dans les milieux aquatiques, deux études ont conduit des expériences réalisées à la fois sur des espèces en cultures d'AOA et de BOA (French et al, 2012; Merbt et al, 2012). Leurs résultats montrent que les archées étudiées ont une plus grande photosensibilité que les BOA. De plus, après l'arrêt de croissance occasionnée par une exposition à la lumière, il n'y avait pas reprise de la croissance des archées une fois resoumises à l'obscurité contrairement aux bactéries. Par contre, il est important de noter que l'inhibition à la lumière varie probablement entre les différentes espèces d'AOA et également selon les doses et les longueurs d'onde de lumière comme c'est le cas chez les BOA (Guerrero & Jones, 1996). Ceci pourrait expliquer pourquoi les AOA dans l'océan Pacifique ont montré une plus grande activité transcriptionnelle dans la zone photique que dans le reste de la colonne d'eau (Church

et al, 2010). Une autre possibilité suggérée par les auteurs, est que l'activité transcriptionnelle ne serait pas nécessairement un proxy des taux de nitrification, mais reflèterait plutôt un taux de renouvellement accru de la protéine *amoA* en compensation pour des dommages photooxydatifs.

Concentration d'O₂. Une autre étude expérimentale réalisée sur des organismes en culture d'AOA et de BOA isolés à partir de sédiments de lac, laisse supposer que ces deux groupes d'organismes réagissent différemment à une variation de la concentration en O₂ (French et al, 2012). Leurs résultats suggèrent que les AOA sont mieux adaptées aux faibles concentrations d'O₂ que les BOA. En effet, les taux de croissance des archées, mesurés durant cette étude, étaient insensibles aux variations d'O₂ alors que ceux des bactéries augmentait avec l'O₂ dans le milieu ambiant.

pH. Comme mentionné dans les sections précédentes du présent ouvrage, une baisse de pH a le potentiel de diminuer les taux d'oxydation d'ammoniac. L'oxydation de l'ammoniac est toutefois possible dans des milieux à faible pH. Dans ces derniers, elle est réalisée par des populations distinctes d'archées (Erguder et al, 2009; Nicol et al, 2008; Yao et al, 2011). L'isolation de la première AOA acidophile, *Candidatus Nitrosotalea devanaterrea*, à partir d'un sol acide, laisse penser que les AOA pourraient avoir développé des mécanismes afin d'effectuer la nitrification à faible pH ou à des concentrations en substrat très faibles (Lehtovirta-Morley et al, 2011).

1.5.2 Variabilité spatiale

L'accumulation d'études portant sur les archées depuis leur découverte supporte de plus en plus l'idée que les AOA dominent la communauté oxydante d'ammoniac dans les océans (ex., Mincer et al, 2007) et les lacs oligotrophes (ex., Restrepo-Ortiz et al, 2014). Ceci s'explique en partie en raison de leur avantage par rapport aux BOA dans les milieux pauvres en NH₄⁺ (Stahl & de la Torre, 2012). Il est important de spécifier que la majorité des études montrant la dominance des AOA par rapport aux BOA sont basées sur la quantification du gène *amoA* (Monteiro et al, 2014), et non sur la mesure direct des taux de nitrification. En

effet, la détection du gène *amoA* n'implique pas nécessairement son expression (Mußmann et al, 2011; Prosser & Nicol, 2008; Stahl & de la Torre, 2012).

Au-delà de la dominance des AOA par rapport aux BOA dans un milieu et inversement, il existe des différences entre les espèces au sein de chacun des domaines. Les BOA sont présentes dans une grande diversité d'habitat : les sols, l'eau douce et salée, ainsi que les sédiments. Leur métabolisme de base est plus ou moins similaire à l'intérieur de chacun des groupes phylogénétiques. Néanmoins, dû à certaines différences écophysiologiques comme l'affinité pour le NH_4^+ , certains groupes d'espèces de BOA sont caractéristiques d'un type d'habitat particulier (Figure 1.5) (Koops & Pommerening-Röser, 2001). Les bactéries du groupe *Nitrosomonas oligotropha*, par exemple, sont particulièrement bien adaptées à de faibles concentrations en substrat et se retrouvent surtout dans des eaux douces oligotrophes (Bollmann et al, 2002). En contraste, les espèces de la lignée *N. europaea*, qui nécessitent des concentrations en NH_4^+ supérieures à 30 umol L^{-1} , se retrouve principalement dans les systèmes eutrophes (Koops & Pommerening-Röser, 2001). La tolérance ou les besoins en sel peut également expliquer la répartition spatiale des différents groupes d'espèces. Par exemple, on note que les BOA membres du groupe des Gammaprotéobactérie ne se retrouvent qu'en milieu marin, étant halophiles obligatoires (Koops & Pommerening-Röser, 2001).

Les différents groupes d'AOA, de manière similaire aux BOA, ne sont pas affectées de la même façon par les variables environnementales. Il est intéressant de noter qu'aucun des groupes monophylétiques d'AOA n'est contraint à un seul type d'habitat. Par contre certaines tendances s'observent, la figure 1.6 montre la distinction entre les AOA retrouvées en milieux marins versus celles retrouvées en eau douce. Les études récentes effectuées dans les eaux douces oligotrophes, ont permis de découvrir de nouvelles lignées d'archées oxydantes d'ammoniac, montrant que ces milieux contiennent des écotypes d'AOA propres aux eaux douces (Auguet et al, 2011; Restrepo-Ortiz et al, 2014). Une grande partie des séquences se retrouve dans le groupe *Nitrosotalea* selon la phylogénie de Pester et al (2012). Dans les eaux douces encore, plusieurs séquences d'archées font partie du groupe *Nitrosopumilus*. Ce groupe

comprend notamment l'archée *Nitrosoarchaeum limnia* qui a été isolée de sédiments dans une région à faible salinité en système estuarien (Mosier et al, 2012).

1.5.3 Variabilité temporelle

Les facteurs environnementaux mentionnés dans la section 1.5.1 influencent la communauté oxydante d'ammoniac en contrôlant l'abondance des AOA et des BOA. La concentration d' NH_4^+ ressort de plusieurs études comme une variable importante à la base de la variation saisonnière observée dans la communauté oxydante d'ammoniac. En effet, Christman et al (2011) ont observé une plus grande abondance du gène *amoA*, utilisé comme proxy de l'abondance des AOA et AOB, en hiver lorsque la compétition avec le phytoplancton était à son plus faible et que les concentrations de NH_4^+ étaient les plus élevées. Parallèlement, Vissers et al (2013) ont observé une corrélation négative entre le nombre de copie du gène *amoA* des archées et l'abondance d'organismes photosynthétique. Cette étude montre également que la taille de la communauté des AOA et la diversité des souches dominantes d'AOA sont significativement affectées par divers facteurs abiotiques et biotiques durant l'été. Cette variabilité saisonnière dans les assemblages d'espèces est aussi attribuée aux changements de température dans la colonne d'eau (Auguet et al, 2011). Une étude saisonnière dans les lacs alpins montre aussi l'occurrence de différents écotypes d'AOA à différents moments de l'année et à différents endroits dans la colonne d'eau. Les facteurs environnementaux variant le plus au court de l'étude dans le temps et l'espace étaient la concentration de NH_4^+ et l'intensité lumineuse. Les auteurs suspectent donc un rôle de ces deux variables environnementales dans la dominance d'un écotype par rapport à l'autre, mais n'exclut pas que plusieurs autres facteurs agissent en synergie (Restrepo-Ortiz et al, 2014).

1.6 Méthodes mesurant les taux de nitrification

Le tableau 1.1 représente un résumé des différentes méthodes utilisées pour mesurer les taux d'oxydation d'ammoniac et présente les principaux avantages et désavantages de chacune d'entre elles. La méthode de traceur isotopique stable d'azote (^{15}N) permet de suivre

la transformation de $^{15}\text{NH}_4^+$ (*pool* de substrat) en $^{15}\text{NO}_2^-$ (*pool* de produit) durant une incubation grâce à la spectrométrie de masse. Cette dernière possède plusieurs avantages par rapport à l'utilisation de radio-isotope de carbone ($^{14}\text{CO}_2$) et d'inhibiteur pour calculer les taux de nitrification. Le principal avantage découle du fait que cette méthode est une mesure directe de l'activité nitrifiante. Ce qui veut dire que l'incubation peut se faire aux conditions lumineuses du milieu. De plus, contrairement à l'utilisation de $^{14}\text{CO}_2$, aucun facteur de conversion (pouvant varier de 2 à 60) n'est requis dans le calcul des taux. La méthode ^{15}N semble donc la plus appropriée dans les milieux caractérisés par de fortes variations environnementales (Andersson et al, 2006). Finalement, elle ne requiert pas l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques à la nitrification. Effectivement, plusieurs inconvénients sont associés à l'utilisation d'inhibiteurs. Pour n'en nommer qu'un, ils n'inhibent pas totalement l'activité des microorganismes donnant une estimation erronée de l'activité réelle de ces derniers (Oremland & Capone, 1988).

Néanmoins, la méthode ^{15}N a certains désavantages. Elle nécessite l'ajout de traceur (c.-à-d., $^{15}\text{NH}_4^+$), augmentant artificiellement le *pool* de substrat pour la nitrification. Ce problème a toutefois été largement résolu par le développement d'une nouvelle méthode isotopique (McIlvin & Altabet, 2005) et de spectromètres de masse plus sensibles. Cela a permis de diminuer la durée des incubations et les concentrations de traceur, approchant les conditions *in situ* (Ward, 2008). Un autre inconvénient de la méthode ^{15}N est qu'elle ne considère pas l'effet du recyclage du NH_4^+ par la minéralisation de la matière organique et le zooplancton lors de la durée de l'incubation. Cela peut mener à une sous-estimation des taux de nitrification (Carini et al, 2010). Pour minimiser ce problème, on peut raccourcir la période d'incubation (Ward, 2011a).

1.7 Problématiques

1.7.1 Découverte des archées oxydantes d'ammoniac

La découverte des AOA, en 2004, a relancé plusieurs questions qu'on pensait jusque là résolues. Qui sont les organismes nitrifiants dominants dans l'environnement? Comment la composition de la communauté varie-t-elle selon les facteurs environnementaux? Cette découverte a eu pour effet de stimuler de manière fulgurante la recherche sur la nitrification (Figure 1.7.A) et d'acquérir ainsi rapidement une grande quantité d'information sur le sujet (Figure 1.7.B). Néanmoins, la grande majorité des études en milieux aquatiques ont été réalisées en milieux marins. Les lacs d'eaux douces, quant à eux, demeurent relativement peu explorés. Les études menées jusqu'à maintenant sur les AOA ont permis de démontrer leur grande abondance par rapport aux BOA dans la plupart des milieux jusqu'à maintenant investigués et leur capacité à croître à des concentrations de NH_4^+ bien plus basses que celles requises par les BOA (Martens-Habbena et al, 2009). Ces éléments mettent en évidence le besoin de mieux comprendre le rôle des AOA dans les lacs.

1.7.2 Méthodes utilisées en milieux lacustres

La grande diversité de méthodes utilisées pour mesurer les taux de nitrification, particulièrement dans les lacs, rend difficile la comparaison et l'interprétation des résultats disponibles jusqu'à maintenant dans la littérature (Hall, 1986; Lannbroek & Bollmann, 2011). Malgré les nombreux avantages de la méthode améliorée de ^{15}N par rapport aux autres méthodes, jusqu'à présent peu d'études ont appliqué cette méthode dans les lacs. De plus, la majorité des mesures d'activité nitrifiante dans les lacs sont le résultat d'études ponctuelles dans le temps, et à notre connaissance aucune n'a mesuré l'activité nitrifiante durant le jour et la nuit.

Pour combler les lacunes dans les connaissances existantes sur la nitrification dans les lacs, il apparaît nécessaire d'évaluer parallèlement l'activité et la communauté nitrifiante dans

les lacs, en explorant leur dynamique temporelle. D'autant plus que les lacs sont une composante importante du paysage continentale, en particulier, dans le biome tempéré et boréal (Figure 1.8). Dans le cadre de ce projet, nous avons étudié le lac Croche, un petit lac (0,179 km²) oligotrophe peu affecté par les activités anthropiques, situé dans la région des Laurentides. Ce système est représentatif d'une grande partie des lacs de la région. En effet, on retrouve une grande abondance de lacs de petite taille (superficie $\leq 0,1$ km²) au Canada (Figure 1.9A), particulièrement dans la région des Laurentides (Figure 1.9B).

1.8 Objectifs du projet de maîtrise

Cette étude adopte une approche descriptive et a principalement pour but d'approfondir les connaissances sur la variabilité jour-nuit et saisonnière du processus de la nitrification dans les lacs. L'objectif premier de ce projet consiste à mesurer les taux d'oxydation d'ammoniac dans un petit lac oligotrophe durant le jour et la nuit au cours d'une année entière et de déterminer quels facteurs environnementaux contrôlent ce processus. Plusieurs hypothèses ont été formulées au début de ce projet. Nous nous attendions à ce que les taux maximum d'oxydation d'ammoniac soient mesurés à la base de la zone euphotique (c.-à-d., à une profondeur correspondant à 1% de l'intensité lumineuse incidente), là où les organismes nitrifiants sont moins susceptibles à la photoinhibition et font face à une plus faible compétition pour leur substrat avec le phytoplancton. Nous avons également comme hypothèse qu'au cours de l'année, la plus grande activité nitrifiante soit mesurée au moment des brassages d'automne, lorsque le NH₄⁺ qui s'est accumulé durant tout l'été dans l'hypolimnion est redistribué dans la colonne d'eau. Nous nous attendions également à ce que les taux les plus faibles soient mesurés au cours de l'hiver, lorsque les réactions microbiennes sont limitées par la température.

Le deuxième objectif vise à déterminer les tendances dans la présence du gène fonctionnel *amoA* des BOA et des AOA au cours de l'année et à identifier la composition en espèces de la communauté oxydante d'ammoniac. Nous avons comme hypothèse que les

gènes *amoA* des BOA et des AOA seraient détectés plus facilement à la base de la zone euphotique qu'en surface. Nous nous attendions également à ce que le gène *amoA* des AOA soit plus fréquemment détecté dans le lac que celui des BOA en raison de la dominance des AOA par rapport aux BOA dans les milieux pauvres en NH_4^+ investigués jusqu'à ce jour.

1.9 Tableaux et figures

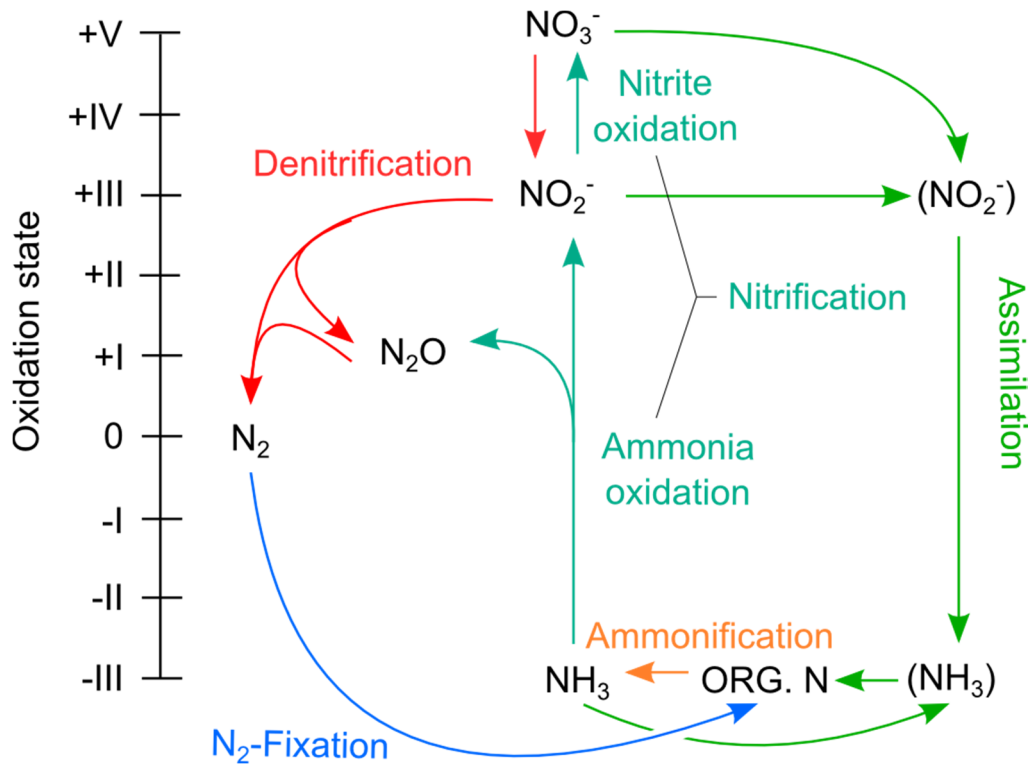


Figure 1.1. Représentation schématique des principales transformations biologiques de l'azote (N) dans l'environnement. Les multiples formes chimiques d'azote sont représentées selon leur état d'oxydation. En milieu d'eau douce et à pH faible (< 9) l'ammoniac (NH₃) est plutôt présent sous forme d'ammonium (NH₄⁺).

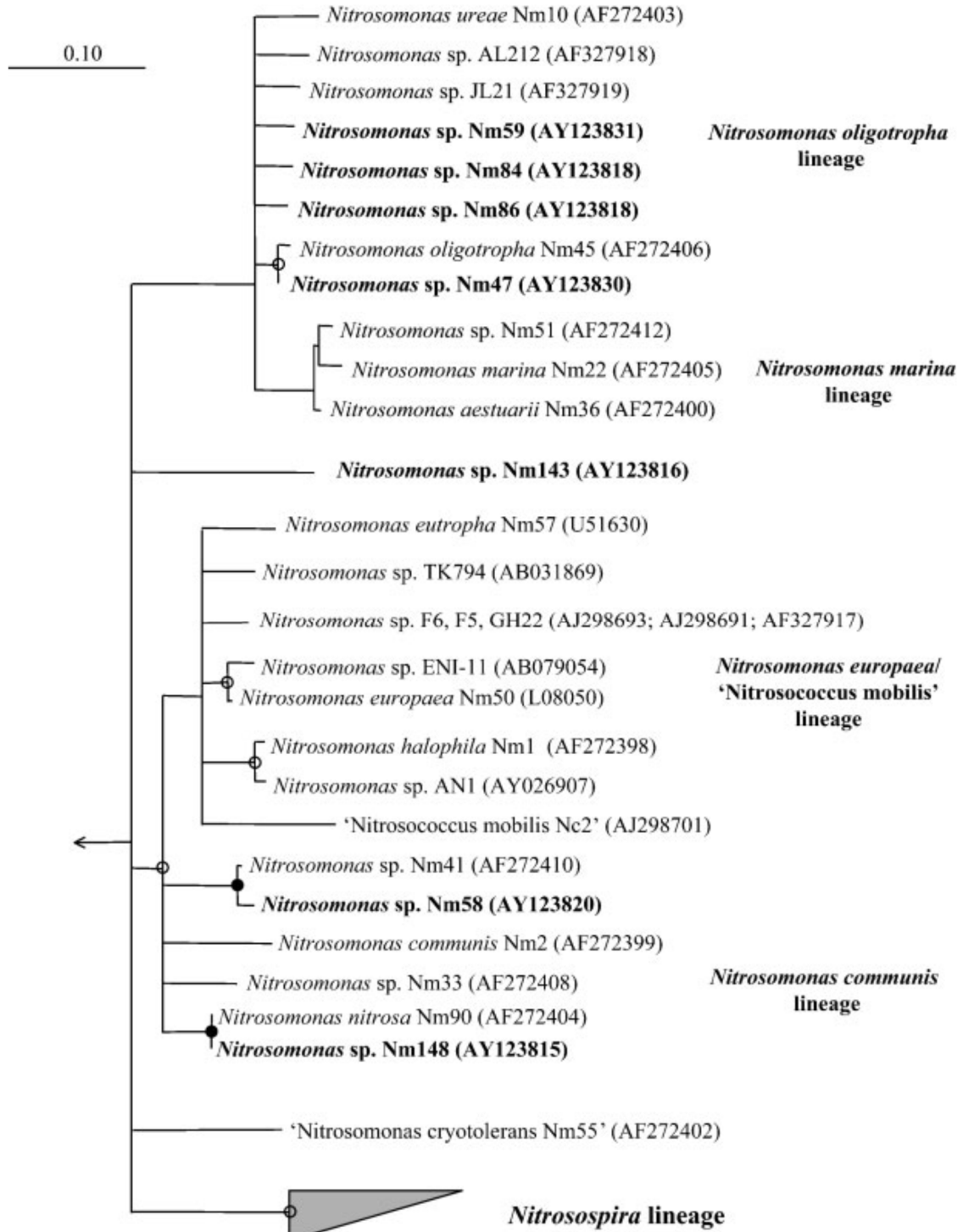


Figure 1.2. Arbre phylogénétique basé sur le gène *amoA* de bactéries oxydante d'ammoniac (AOB) du groupe des betaprotéobactéries. Figure tirée de Purkhold et al (2003).

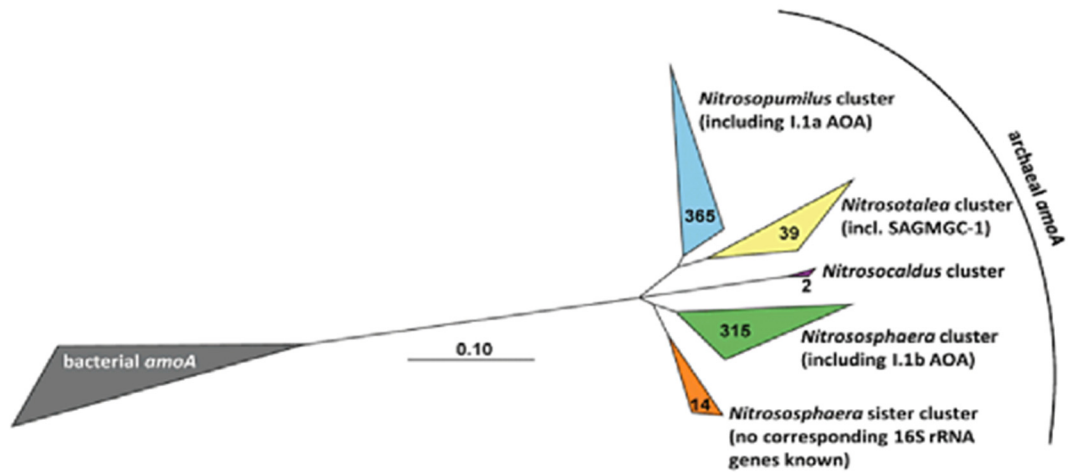


Figure 1.3. Arbre consensus illustrant les cinq groupes phylogénétiques principaux d'archées basé sur le gène *amoA*. L'arbre a été construit à partir de 735 séquences d'acide nucléique du gène *amoA*. Le nombre dans chaque grand groupe phylogénétique correspond au nombre de séquences que contient le groupe. Figure simplifiée de Pester et al (2012).

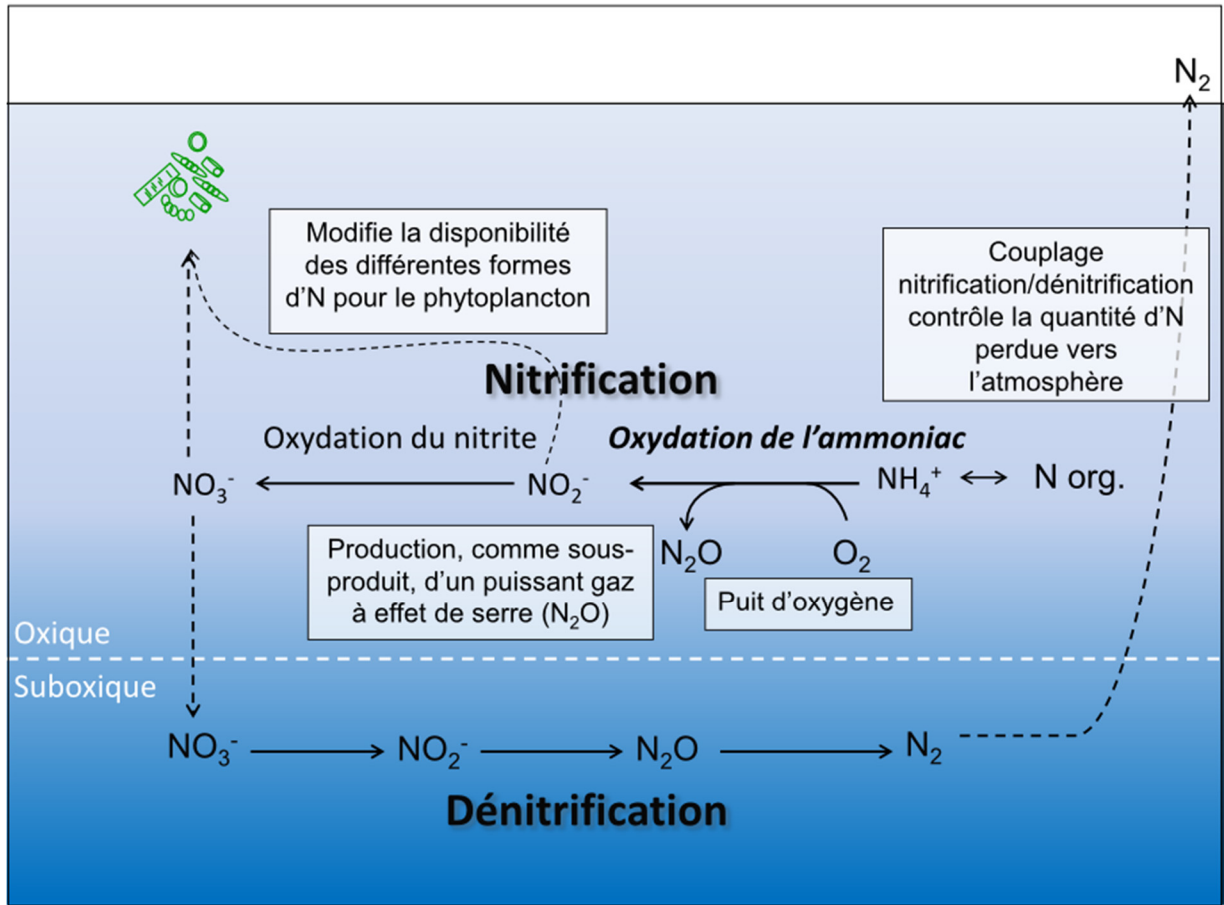


Figure 1.4. Représentation schématique simplifiée résumant le rôle de la nitrification sur son environnement immédiat et, à plus grande échelle, sur le climat.

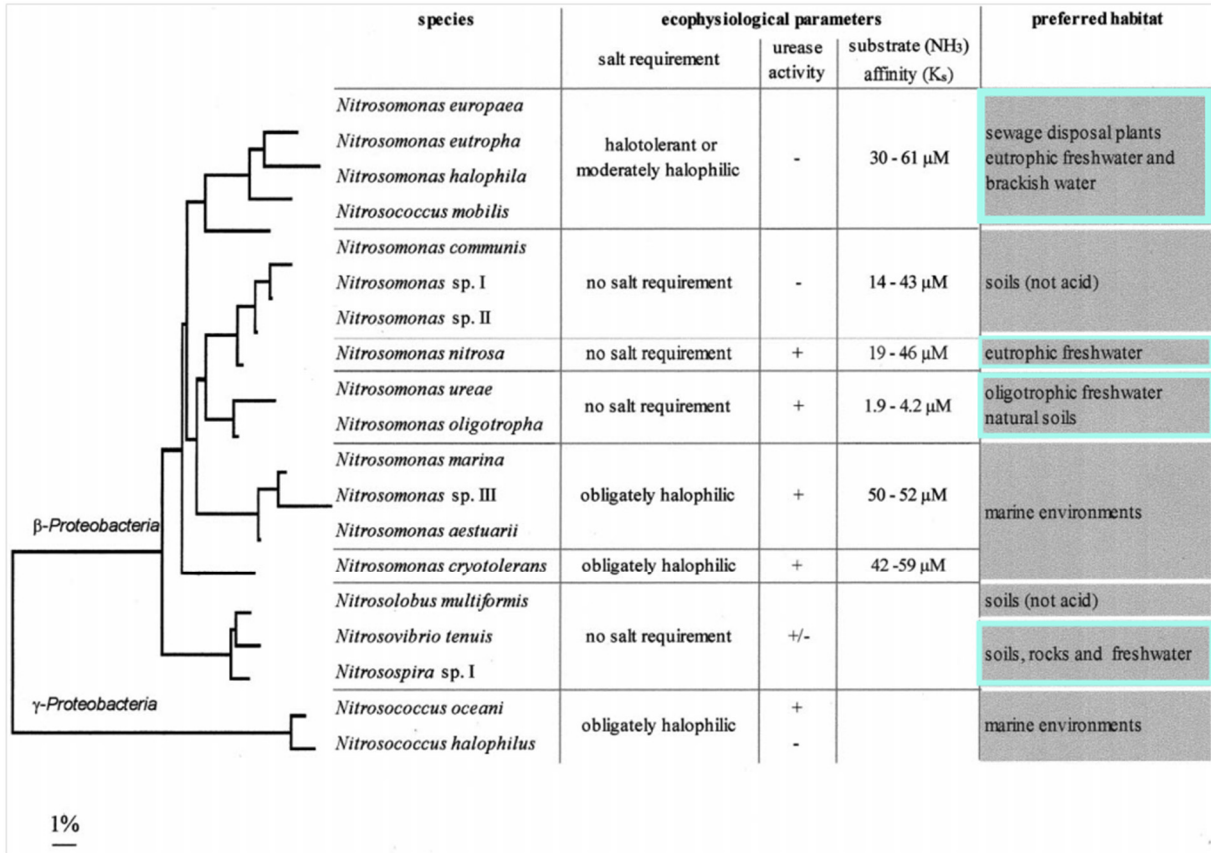


Figure 1.5. Dendrogramme basé sur des séquences du gène 16s rDNA montrant la relation phylogénétique entre des bactéries oxydantes d'ammoniac isolées en culture. Des informations sur l'écophysiologie de ces organismes et le type d'habitat où ils ont été extraits. Les milieux d'eau douce ont été mis en évidence par un cadre bleu. Figure modifiée de Koops and Pommerening-Röser (2001).

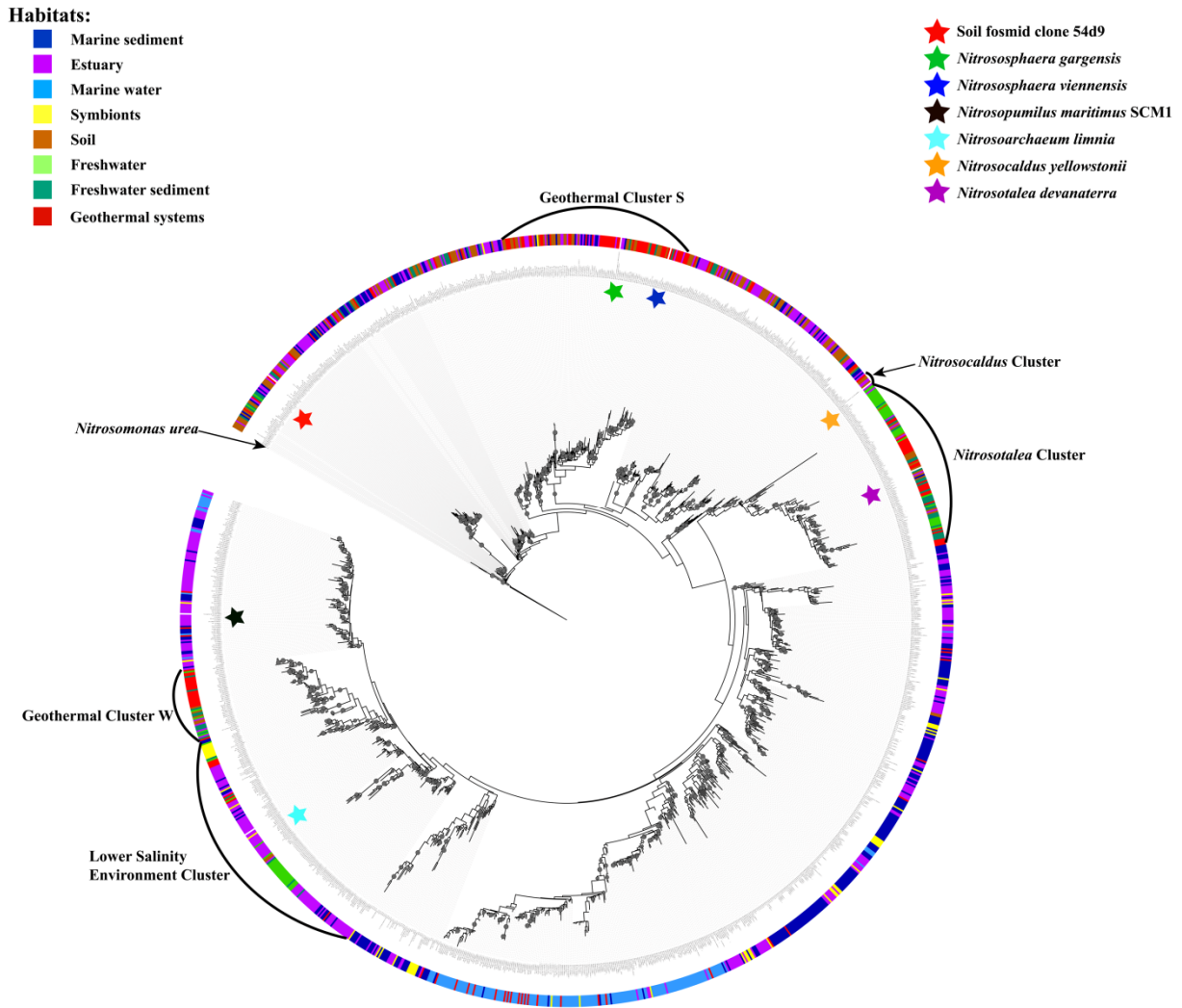


Figure 1.6. Arbre phylogénétique basé sur des séquences du gène *amoA* des archées provenant d'échantillons de huit types d'habitat (sols, eaux douces, sédiment des eaux douces, sédiments estuariens, eaux marines, sédiments marins, systèmes géothermiques et symbiose). Les séquences ayant été extraites à partir d'échantillons d'eau douce sont indiquées en vert pâle, alors que les séquences extraites des sédiments en eaux douces sont en vert foncé. Figure tirée de Cao et al (2013).

Tableau 1.1 : Méthodes mesurant les taux d'oxydation d'ammoniac dans la colonne d'eau.
Modifié de Ward (2011a).

	Analyte	Limitations	Advantages
DIN inventory with inhibitors	DIN	<ul style="list-style-type: none"> • Long incubations • Dark requirement to prevent assimilation by phytoplankton • Artifacts associated with the use of some inhibitors 	<ul style="list-style-type: none"> • Simple measurement requirement
¹⁴ CO ₂ uptake with inhibitor	¹⁴ C-particulate material	<ul style="list-style-type: none"> • Radio-isotope precaution • Need for conversion factor between CO₂ fixation and N oxidation • Dark requirement 	<ul style="list-style-type: none"> • Short incubations • High sensitivity
¹⁵ N tracer	¹⁵ NO ₂ ⁻ and ¹⁵ NO ₃ ⁻	<ul style="list-style-type: none"> • Mass spectrometry required • Does not account for effect of NH₄⁺ recycling, potentially underestimating the actual nitrification rate 	<ul style="list-style-type: none"> • Direct measurement of specific N transformation • Short incubations • High sensitivity • <i>in situ</i> light conditions can be used

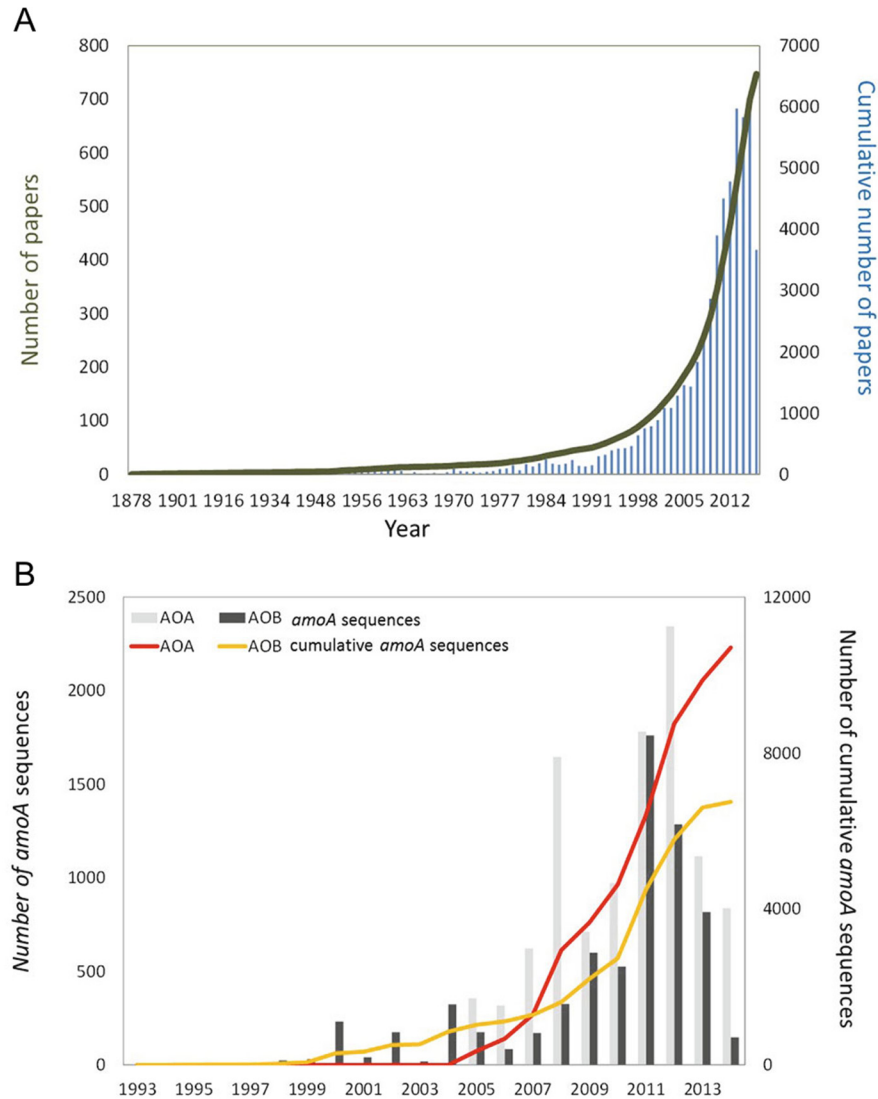


Figure 1.7. (A) Évolution du nombre d'articles portant sur la nitrification publiés par années depuis 1872 jusqu'au 31 mai 2014 et en (B), l'évolution du nombre des séquences du gène *amoA* des archées et des bactéries soumit à la base de données National Center for Biotechnology Information (NCBI). Figure modifiée à partir de deux figures de Monteiro et al (2014).

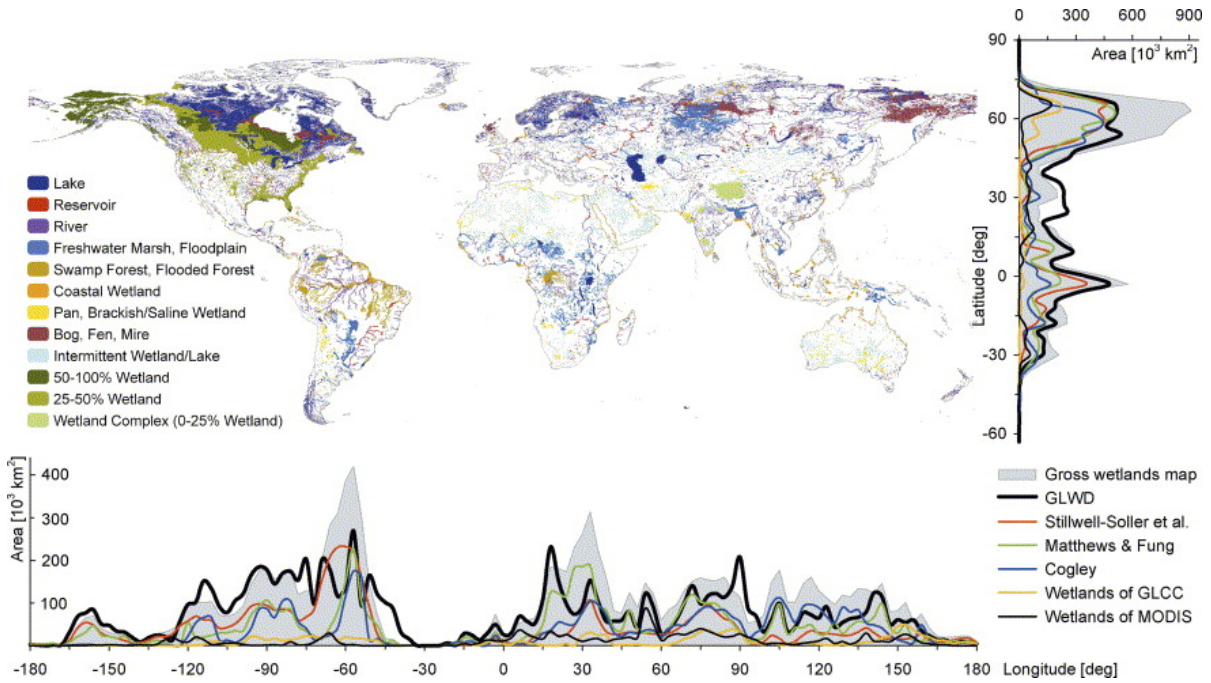


Figure 1.8. Carte représentant la base de données « Global Lakes and Wetlands Database (GLWD) » créée par Lehner and Döll (2004) qui inclut les lacs $\geq 0.1 \text{ km}^2$. Figure provenant de Lehner and Döll (2004).

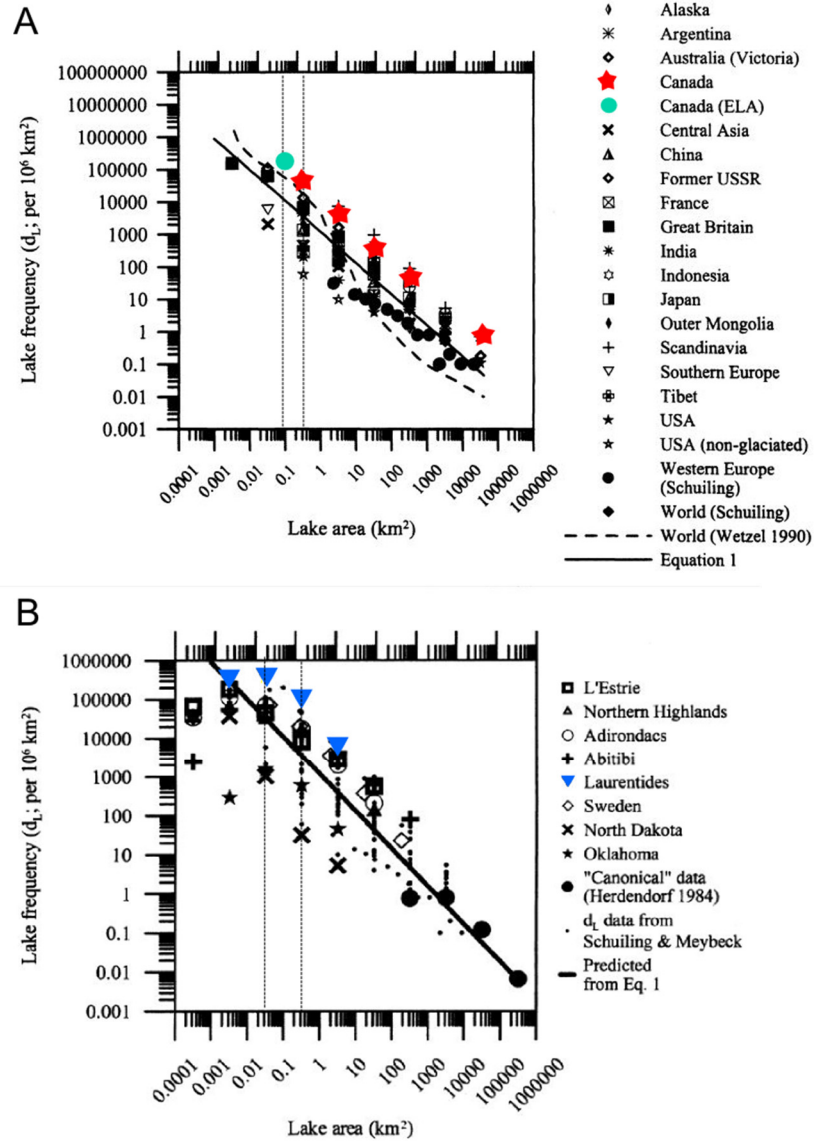


Figure 1.9. (A) Densité des lacs sur le continent selon leur aire de surface. La fréquence des lacs selon leur superficie au Canada est représentée par une étoile rouge et par un cercle turquoise spécifiquement pour la région des lacs expérimentaux (RLE ou « ELA » en anglais) située au Canada. (B) Densité des lacs en fonction de leur aire de surface déterminée par des analyses à l'aide de système d'information géographique (SIG) et de recensements. La fréquence des lacs pour la région des Laurentides est représentée par un triangle bleu. Figure modifiée à partir de deux figures de Downing et al (2006).



Crédit photo: Richard Carignan

Chapitre 2 : Seasonal dynamics of nitrifying prokaryotes in a small oligotrophic lake

Auteurs : Stéphanie Massé¹, David Walsh² et Roxane Maranger¹

Article en préparation pour la revue *The ISME Journal*.

¹ Université de Montréal, Département de Sciences Biologiques, Montréal Qc Canada

² University of Concordia, Department of Biology, Montreal Qc Canada

Abstract

Since the discovery that some archaea are able to oxidize ammonia aerobically, several studies have focused on measuring nitrification rates and identifying the diversity of planktonic ammonia oxidizers in marine systems. Despite the global importance of freshwater lakes, far fewer studies have done the same in these ecosystems. Here we investigated the importance of nitrification and characterize the microbial community catalyzing the first rate-limiting step of nitrification over an annual cycle in a temperate lake. The measurements of ammonia oxidation rates, using the $^{15}\text{NH}_4^+$ isotope tracer method, at two depths in the photic zone show that this process occurred throughout the entire year in the lake. Rates of ammonia oxidation ranged from undetectable to $333 \text{ nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ with a peak of activity during winter. Of all environmental variables measured, ammonium concentrations in the water-column seem to have the strongest effect on the magnitude of ammonia oxidation rates. We detected the presence of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) using polymerase chain reaction (PCR) assays targeting part of the ammonia monooxygenase (*amoA*) gene. Both AOA and AOB were detected in the photic zone of the lake, although only AOA were omnipresent over the year. The sequencing of archaeal *amoA* genes reveals that most of the AOA in the lake are members of the *Nitrosotalea* cluster (also referred as SAGMGC-1 or group I.1a associated), which confirms the ecological relevance of this cluster in oligotrophic freshwaters. Altogether, our results indicate that winter may be a critical time for ammonia oxidation in temperate lakes and provide a baseline for the understanding of ammonia oxidation in small oligotrophic lakes.

keywords : Ammonia oxidation; nitrification; rates; *amoA* gene; nitrogen; Bacteria; Archaea; Thaumarchaeota; isotopic tracer; lakes; freshwaters; temperate climate.

Introduction

Nitrification is a two-step process where ammonia (NH_3) or ammonium (NH_4^+) is first oxidized to nitrite (NO_2^-) by ammonia-oxidizing archaea (AOA) or bacteria (AOB) and then to nitrate (NO_3^-) by nitrite-oxidizing bacteria (NOB) in order to generate energy. Nitrification plays a key role in influencing the growth and the community composition of primary producers by mitigating the availability of different nitrogen (N) forms. Nitrification also provides the NO_3^- required for denitrification, the main N loss pathway from aquatic ecosystems. On a global scale, the first step of nitrification has a direct effect on climate change as it produces nitrous oxide (N_2O), a potent greenhouse gas, as a by-product (Goreau et al, 1980; Santoro et al, 2011). The existence of autotrophic AOB has been known for more than a century (Winogradsky, 1890) and this first step in the process was historically constrained to the clade of Gamma- and Beta-proteobacteria (Purkhold et al, 2000). However, ten years ago, this paradigm shifted with the discovery of an archaeal gene homologous to the bacterial ammonia monooxygenase (*amo*) gene, which catalyses the first step of nitrification (Könneke et al, 2005; Treusch et al, 2005; Venter et al, 2004). Recent phylogenetic analyses have classified AOA in a new archaeal phylum named Thaumarchaeota (Brochier-Armanet et al, 2008; Pester et al, 2011; Spang et al, 2010). This has led to an intensive research effort, mostly in marine ecosystems, which resulted in a rapid advancement of our understanding of AOA (Monteiro et al, 2014). For instance, we know that these archaea have the capacity to grow at NH_4^+ concentrations far below the substrate threshold of AOB (Martens-Habbena et al, 2009). This finding may explain why nitrification has been detected in very oligotrophic environments (*e.g.*, Newell et al, 2011; Small et al, 2013; Smith et al, 2014). Given the widespread distribution of the archaeal gene coding for the alpha-subunit of *amo* (*amoA*) in major oceanic regions, AOA may considerably influence the spatiotemporal dynamics of nitrification in the environments (Karner et al, 2001; Mincer et al, 2007; Wuchter et al, 2006).

Previous environmental studies have shown that the magnitude and the location of ammonia oxidation (AO) in the water column of marine systems are widely driven by light intensity (*e.g.*, Ward, 2005) and substrate concentration (*e.g.*, Grundle & Juniper, 2011).

Despite the obvious evidence for photoinhibition of nitrification (Guerrero & Jones, 1996; Horrigan, 1981; Merbt et al, 2012; Müller-Neuglück & Engel, 1961; Olson, 1981; Schön & Engel, 1962), maximum of AO rates often occurs near the bottom of the euphotic zone in marine ecosystems (*e.g.*, Grundle & Juniper, 2011; McCarthy et al, 1999; Ward et al, 1984; Ward, 1987a; Yool, 2007). This can be explained by a lower photoinhibition and less competition with phytoplankton for NH_4^+ in this area of the water column. It is unclear though if nitrification in lakes can also reach high rates of activity in the photic zone and thus supply phytoplankton with NO_2^- and NO_3^- .

Lakes cover a relatively small surface of the earth (3%), yet are very active N processors substantially impacting N dynamics at global scale (Harrison et al, 2009). Few studies have attempted to assess the nitrification process in the water column of freshwater lakes, especially compared to marine systems. Only one study has measured simultaneously nitrification rates and archaeal and bacterial abundances in freshwater lakes (*i.e.*, Small et al, 2013; table 2.2). Furthermore, the wide heterogeneity in physical, chemical and morphological conditions of studied sites makes results among different environments difficult to compare. Indeed, recent studies focused on high mountain (*e.g.*, Auguet et al, 2011), saline (Carini & Joye, 2008), deep (Vissers et al, 2013a), and large (Bollmann et al, 2014; Small et al, 2013) lakes, rather than lakes that are more frequently encountered on continental surface. As a result, our knowledge of nitrification in lakes is not representative of global lentic water bodies which are dominated by small (*i.e.*, $< 1 \text{ km}^2$) freshwater lakes (Downing et al, 2006). Another major constrain to a comprehensive understanding of nitrification in freshwater ecosystems is the lack of standardization in methods used to measure nitrification rates in lakes, making once again comparisons and interpretations of results among sites difficult (Hall, 1986; Lannbroek & Bollmann, 2011). Therefore, there is a need for better estimations of *in situ* nitrification rates concurrently with the characterization of ammonia-oxidizing community in freshwaters. More importantly, we need to better link nitrification dynamics to microbial communities along temporal changes in environmental parameters.

In order to advance our understanding of the dynamics and the roles of ammonia-oxidizing prokaryotes (AOP) in lakes, we followed changes in AO rates and the ammonia-

oxidizer community over an annual cycle in a small oligotrophic lake located in the temperate region in Québec (Canada). Sampling was conducted during day time and at night to capture all AO activity. We hypothesized that high rates in the water column would occur at the bottom of the euphotic zone as in marine systems. We thus followed the AO rates at two depths in the photic zone using an improved $^{15}\text{NH}_4^+$ isotope tracer method with *in situ* incubations. In parallel, we characterized trends in the presence of archaeal and bacterial *amoA* gene with PCR assays and we sequenced these genes to characterize the genetic diversity of the ammonia-oxidizing community. Furthermore, we tracked changes in environmental conditions with the aim of determining which environmental factors controlled the ammonia-oxidizing activity along the seasons. We expected that highest rates would occur during seasonal mixings of the lake when surface waters are supplied with NH_4^+ rich waters. Unexpectedly, highest AO rates occurred during winter. Waters were rich in NH_4^+ under the ice, but also at other periods during the year, suggesting other environmental factors impacting AO in surface water. In addition, based on the few studies available in freshwater environments suggesting an important role of AOA in oligotrophic lakes (Auguet et al, 2011; Bollmann et al, 2014; Restrepo-Ortiz et al, 2014; Vissers et al, 2013a; Vissers et al, 2013b), we expected a dominance of AOA over AOB in the lake. As expected, AOA were omnipresent in the water column over the year, however they coexist with AOB during some periods of the year. Our approach has the distinct advantage of allowing the measurement of biogeochemical activity concurrently with the community composition of AOA and AOB and the environmental factors from a seasonal perspective in the water column of a lake. Our data yields new insights into the dynamics of AOP in oligotrophic temperate lakes.

Materials and methods

Site description

For this study, we selected Lake Croche, a pristine headwater lake at the Station de biologie des Laurentides (Université de Montréal), located on the Canadian Shield in Quebec ($45^{\circ}59'34''\text{N}$, $74^{\circ}00'34''\text{W}$; Figure 1). Lake Croche is small (0.179 km^2), oligotrophic,

shallow (<12 m), dimictic and due to its morphometry, subject to seasonal anoxia. It has a small catchment area (1.071 km²) with Orthic Ferro-Humic Podzols soils (Canadian classification), and covered by mixed forest (>95%) (Carignan et al, 2000). During the sampling period (Oct-11 to Oct-12), precipitation totalled 1 200 mm, with ~ 20% falling as snow. The seasonal ice-cover was present from December 10 2011 (100% of the surface) until April 13 2012 (0% of the surface).

Sampling regime

Samples for water chemistry, ammonia oxidation rates, N₂O concentrations, and DNA analysis were collected monthly at the deepest area of the lake. During the ice-free period, samples were collected once during the day with full sunlight and once at night, a minimum of two hours after full sunset in darkness. During ice-cover period, samples were collected only during the day as very limited to no light could penetrate the ice. Discrete water samples were collected from depths corresponding to 10 and 1% of surface I₀, as determined using a LI-1400 data logger (LI-COR®) coupled with a LI-192 Underwater Quantum sensor and a LI-190 Surface Quantum PAR sensor (LI-190) both measuring photosynthetically active radiation (PAR). During our annual time series, 10 and 1% I₀ corresponded on average to 3 ± 0.4 m and 6 ± 0.3, respectively. For night measurements, samples were collected at the same depths as during the day. During the ice covered period, samples were collected at 3 and 6 m. Given the month to month variability in the precise sampling depth, for simplicity, the two different depths will be referred to depth 1 (10% light during the day) and 2 (1% light during the day) on graphics. Temporal variation of light and precise sampling depths can be found in Supplementary Material (Figure A.1). Sampling was not possible in December and March due to dangerous conditions related to ice formation and ice-out.

Physical and chemical measurements

Depth profiles of temperature, dissolved oxygen and pH were obtained using a YSI 556 multi-probe system (YSI Inc.) calibrated in vapor-saturated air. Vertical profiles of PAR were obtained as described above. Water was collected with a 4 l Van Dorn bottle for the first three months and with a diaphragm pump (WaterSpout I Mini Purge Pump, Proactive Environmental Products™) for the following eight months. Duplicates for NO₂⁻+NO₃⁻ and

NH_4^+ measurements were filtered with 0.45 mm Acrodisc® filters and kept at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ was measured spectrophotometrically using Lachat 10-107-04-1-B (Lachat instruments) after cadmium reduction. NH_4^+ was also measured spectrophotometrically but after heating with salicylate and hypochlorite in an alkaline phosphate buffer.

Ammonia oxidation rate experiments

AO rates were quantified using ^{15}N tracer experiments. This method measures the isotopically enriched portion of the NO_2^- pool after the addition of ^{15}N -labeled NH_4^+ . Four 10% HCl-washed and ultrapure water-rinsed clear 300 mL BOD bottles were filled with lake water from each depth after overflowing the bottle three times to preserve as closely as possible the *in situ* oxygen concentration. Efforts were made during collection and incubation preparation to minimize light exposure in order to reduce risk of ammonia oxidation rates bias. Each bottle received a tracer addition, NH_4^+Cl (99% ^{15}N), corresponding to 5% of the ambient NH_4^+ concentrations based on measurements at both depths that were taken one month before each experiment. When ambient concentrations were too low to calculate tracer addition, $0.05\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ of ^{15}N -labelled NH_4^+ was added. Carrier, $\text{Na}^{14}\text{NO}_2^-$, was also added to increase ambient levels by $0.25\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Tracer and carrier solutions were maintained colder than the sample temperature prior to addition to ensure that they were not displaced by the capping of bottle. Bottles were well mixed, with one set of bottles incubated for 3-4 h directly in the lake in transparent nets at their respective sampling depths, whereas the others were immediately filtered after tracer addition as time 0. The ^{15}N -labelled NH_4^+ spike was designed to be $\leq 10\%$ of ambient lake NH_4^+ concentration. Over the time series, NH_4^+ concentrations were temporally variable in the water column and often below the detection limits. For this reason, even if additions were based on real concentration levels measured one month before each experiment, we achieved this target for 55% of the incubations. Thus 18 incubations received a tracer addition superior to the targeted 10% maximum (additions ranging from 11 to 100% of *in situ* concentration), which might have resulted in overestimation of rates for those dates.

Analysis of $^{15}\text{NO}_2^-$

Water samples were filtered through pre-combusted (450 °C for 4 h) GF/F glass fiber filters (Whatman®) under low pressure. The filtrate was then kept at -20 °C until isotopic analysis. The $\delta^{15}\text{N}$ of NO_2^- was determined using the sodium azide method of McIlvin and Altabet (2005) converting NO_2^- into N_2O . Briefly, 10 mL of sample aliquots were placed in pre-combusted (450 °C, 4 h) glass vials and capped with air tight butyl seals. A fresh solution of 2 M sodium azide and 20% acetic acid, combined in a 1:1 ratio (v/v), was purged with helium for 30 min to remove any N_2O . A subsample of 0.6 mL of this mixture was then added by syringe in each of sample aliquots, which were subsequently shaken vigorously and incubated at 30 °C for 1 h. The reaction was neutralized by adding 0.38 mL of 10 M sodium hydroxide. The isotopic analyses of N_2O were performed at the GEOTOP, Geochemistry and *Geodynamics Research Center*. Specifically, the N_2O was purged from sample aliquots with helium, trapped and concentrated with liquid nitrogen, and purified using a Micromass TraceGas™ inlet. The isotopic composition of N was measured using a Micromass Isoprime™ continuous flow isotope ratio mass spectrometer. Replicate measurements of internal reference materials yield uncertainties better than 0.4‰. Samples were calibrated and blank corrected using four in-laboratory internal isotopic NO_2^- standards ($\delta^{15}\text{N}$ -76.9‰, $\delta^{15}\text{N}$ -35.6‰, $\delta^{15}\text{N}$ 1.7‰, and $\delta^{15}\text{N}$ 36.7‰). Standards were run before, at 15 sample intervals and at the end of each run. The detection limit was ~ 2 nmol N (corresponding to ~ 250 nM on the basis of the volume of sample used). Based on the analysis of 10% replicate samples, the reproducibility (1 σ) of $\delta^{15}\text{N}$ was better than 6.8‰. All N isotopic data are reported relative to the Atmospheric Air Primary Reference Scale.

Ammonia oxidation rate calculation

Rates of $^{15}\text{NH}_4^+$ oxidation were determined from the isotopic composition of NO_2^- measured at the beginning and end of single end-point ^{15}N tracer experiments using the following equation modified from Carini and Joye (2008) and Horak et al (2013) :

$$r(\text{nmol L}^{-1} \text{d}^{-1}) = \frac{2 \times [\text{atom}\%^{15}\text{NO}_{2(f)}^- - \text{atom}\%^{15}\text{NO}_{2(i)}^-] \times \text{NO}_{2(i)}^-}{\text{incubation time} \times \alpha}$$

where r is the AO rate ($\text{nmol L}^{-1} \text{d}^{-1}$), $\text{atom}\%^{15}\text{NO}_2^-_{(f)}$ is the atom percent of $^{15}\text{NO}_2^-$ at the end of the incubation, $\text{atom}\%^{15}\text{NO}_2^-_{(i)}$ is the initial atom percent of $^{15}\text{NO}_2^-$, and $\text{NO}_2^-_{(i)}$ is the initial ambient NO_2^- concentration in the incubation bottle immediately after tracer and carrier additions. α is the % $^{15}\text{NH}_4^+$ in the NH_4^+ pool (N_T / N_{TA}) where N_T is the concentration of $^{15}\text{NH}_4^+$ added and N_{TA} is the sum of the tracer concentration plus ambient NH_4^+ concentration. Because of the method used to measure $^{15}\text{NO}_2^-$, the right end product was multiplied by 2 to account for each of the N atoms of the N_2O molecule receiving one N atom from the non-enriched azide and one from the $^{15}\text{NO}_2^-$ pool (Horak et al, 2013). NO_2^- concentrations were measured spectrophotometrically as $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, by omitting the cadmium reduction step. Bottles were incubated at *in situ* light level which enables phytoplankton to perform photosynthesis during incubation. Therefore, we observed that NO_2^- was taken up into the particulate fraction during the incubation period. For this reason we used initial instead of final ambient NO_2^- concentrations in rate calculations and this likely resulted in an underestimation of rates. $^{15}\text{NO}_2^-$ has been also depleted relative to background for some measurements resulting in negative estimates of AO. These estimates have been considered as 0, because AO could not be detected. We did not account for ammonium regeneration, however the dilution of substrate pool should be minor considering the short incubation time (3-4 hours).

N₂O concentrations

The partial pressure of N_2O ($p \text{ N}_2\text{O}$) was measured from February to October 2012. $p \text{ N}_2\text{O}$ measurements were obtained using the headspace equilibration at ambient temperature method (Cole & Caraco, 2001). Glass serum bottles of 1.12 L were filled with lake water from both depths after three overflowing volumes. Water was removed from the sealed bottle to create a headspace of atmospheric air of 0.12 L. The bottle was mixed vigorously for 2 min to achieve headspace equilibration with the water. Nine milliliters of air was then sampled in triplicate using an airtight syringe and transferred into 9 mL pre-evacuated glass vials capped with an airtight butyl seal. Triplicates of ambient air were also collected. Samples were analyzed using a Shimadzu GC-2040 gas chromatograph, with a Poropaq Q column to separate gases. N_2O concentrations were determined using an ECD detector. $\Delta \text{N}_2\text{O}$ (deviation from saturation), was calculated using the following equation:

$$\Delta \text{N}_2\text{O} = C_{\text{water}} - C_{\text{eq}} \quad (2)$$

where C_{water} is the water concentration of N_2O and C_{eq} is the expected saturation concentration in water at air equilibrium. C_{water} and C_{eq} were corrected for sample temperature and atmospheric pressure.

DNA extraction

Discrete water samples at both depths were collected in 10% HCl-washed, ultrapure water-rinsed 4 L containers and stored in a cooler with ice until processing. Samples were prefiltered through a 20 μm nylon mesh to remove zooplankton and was then sequentially filtered onto a 3.0 μm pore size polycarbonate membrane and 0.2 μm pore size Sterivex unit (Millipore, USA) with a peristaltic pumping system at a flow rate of 0.10 – 0.80 L h⁻¹. All filtrations were run in duplicates. Sterivex units and 3.0 μm pore size filters were preserved by adding 1 mL of lysis buffer solution (40 mmol L⁻¹ EDTA [pH 8], 50 mmol L⁻¹ Tris [pH 8.3] and 0.75 mol L⁻¹ of sucrose). After flash-freeze, samples were stored in liquid nitrogen until final storage at – 80 °C.

DNA was extracted from 0.2 μm pore size Sterivex units using a modified protocol from Zaikova et al (2010). Briefly, Sterivex units were thawed on ice and then incubated at 37 °C for 1 h in a hybridization oven with 100 μL of lysozyme (125 mg mL⁻¹, Sigma® Life Science) and 20 μL of RNaseA (10 μg mL⁻¹). Samples were mixed with 100 μL proteinase K (10 mg/mL, Bio Basic Canada inc.) and 100 μL 20% SDS, and incubated a second time at 55°C for 2 h. After proteinase K digestion, the lysate was transferred from the Sterivex unit into centrifuge tubes (2 mL) by introducing air with a 5 mL syringe. We used protein precipitation instead of phenol/chloroform/isoamyl alcohol to eliminate proteins from the lysate by adding 0.583 volume of MPC reagent (Epicentre® Technologies Corporation an Illumina® Company). The mixture was vortexed and centrifuged at 10 000 $\times g$ for 10 min at 4°C. The aqueous layer was collected and the DNA precipitated by adding 0.95 volume of isopropanol alcohol. After gentle mixing, the mixture was centrifuged a second time at 10 000 $\times g$ for 10 min at 4°C. The DNA pellet was rinsed three times with 750 μL of 70% ethanol, air-dried and resuspended in 25 μL Tris buffer (pH 7.5). To improve amplification efficiency,

we added a supplementary step of purification using the PowerClean DNA Clean-Up kit (MO BIO[®] Laboratories).

PCR amplification of amoA gene

The archaeal and bacterial *amoA* genes were amplified from day samples at both depths. PCR amplification was performed using primers targeting the archaeal domain: Arch-amoAF (STA ATG GTC TGG CTT AGA CG) and Arch-amoAR (GCG GCC ATC CAT CTG TATGT) (Francis et al, 2005) and the bacterial domain: amoA-1F* (GGG GHT TYT ACT GGT GGT) (Stephen et al, 1999) and amoA-2R (CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC) (Rotthauwe et al, 1997). Amplification of both archaeal and bacteria *amoA* genes were performed with the following amplification conditions: initial denaturation at 98 °C for 3 min, 35 cycles of 98 °C for 5 sec, annealing at 55 °C for 5 sec, and extension at 72 °C for 10 sec, and final extension at 72 °C for 1 min. PCR were run in a 25 µL reaction mixture that contained 1 µL of purified DNA solution as template, 1.25 µL each 10 nM forward and reverse primers (conc. final 0.5 µM), 0.5 µL of 10 nM dNTP (conc. final 0.20 mM), 0.5 µL Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.), 5 µl 5X Phire Reaction Buffer (conc. final 1.5 mM MgCl₂), 1 µL of bovine serum albumin (New England BioLabs[®] Inc.) for a final concentration of 400 ng µL⁻¹, and 13.5 µL of sterile ultra pure water.

Cloning and sequencing

Clone libraries of archaeal and bacterial *amoA* genes respectively were generated for four and three discrete samplings, respectively, from the Lake Croche time series. Amplicons were visualized on 2 % agarose gels in 1 X TAE, purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen), and cloned using the CloneJET PCR Cloning Kit with the pJET vector and DH5α chemically competent cells (Thermo Fisher Scientific Inc.). Insert-containing cells were grown overnight at 37 °C on plates containing LB and 100 µg mL⁻¹ ampicillin. Ten colonies were selected in each library and examined for the insert by PCR using Taq polymerase (New England BioLabs[®] Inc.) and the pJet primers (Thermo Fisher Scientific Inc.). Colonies were screened by determining restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). Each 10 µL digestion reaction contained 5 µL of PCR product, 0.13 µL of HhaI (New England BioLabs[®] Inc.), 1 µL NE buffer 4, and 3.88 µL of sterile ultra pure water. Unique clones were

isolated (AOA: 11 clones, AOB: 14 clones) using the GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) and chosen for sequencing both directions with the Sanger technology (OPERON, Louisville, Kentucky). Nucleotide sequences were trimmed and edited using *MEGA* version 5 (Tamura et al, 2011). The resulting datasets were checked for chimeric sequences with UCHIME algorithm (Edgar et al, 2011).

Phylogenetic analyses

Archaeal and bacterial *amoA* sequences were compared and aligned with published sequences obtained from the NCBI nucleotide database (GenBank). For archaea phylogenetic analysis, we incorporated operational taxonomic units (OTUs) retrieved in oligotrophic lakes situated on the Limnological Observatory of the Pyrenees (LOOP) and defined by Auguet and Casamayor (2013): *amoA* OTU1 clone N18-B8 Lake Aixeus (HE797984), *amoA* OTU2 clone N19-G11 Lake Roi (HE798124), and *amoA* OTU3 clone N18-G7 Lake Muntanyo d'Arreu (HE798039). All phylogenetic analyses were conducted using *MEGA* version 5. The best-fit models of nucleotide substitution for the construction of phylogenetic trees were statistically chosen based on the Bayesian Information Criterion (BIC) using jModelTest (Darriba et al, 2012; Guindon & Gascuel, 2003). Archaeal and bacterial phylogenetic trees were inferred using maximum likelihood method based on the Hasegawa-Kishino-Yano model (Hasegawa et al, 1985) and the Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993), respectively. Bootstrap analysis was used to estimate the confidence of each node (1 000 replicates).

Accession numbers

Representative sequences for archaeal and bacterial clones recovered from the Lake Croche water column were deposited in GenBank under the accession numbers XXXXXXXX to XXXXXXXX.

Statistics

All computations and statistical analyses were performed using R 3.0.0 (R Core Team, 2013). Data were examined for normality and those variables that did not meet normality assumptions from some of the tests were subsequently transformed: AO rates and NH_4^+ concentrations were square root transformed, pH, DO saturations and DO concentrations were

square transformed, $\text{NO}_2^+ + \text{NO}_3^+$, Iz, Iz : Io and temperature were log transformed. To display diel, seasonal and spatial pattern of environmental factors, we used principal component analysis (PCA) calculated by the function *rda* in the R *vegan* package (Oksanen et al, 2013). Scaling type 1 (=distance biplot) was chosen to represent the best relationships among samples. We used box plots to illustrate the spread and differences of AO rates among seasons, depths and sampling times over the diel cycle (*i.e.*, day and night). Individual data points are indicated, since some groups had less than five observations, and jittered to prevent overplotting in graphs. Significant differences between groups were assessed by non-parametric tests in the R *stats* package. Wilcoxon test was used to compare two groups, while the Kruskal-Wallis test was used for higher number of groups. When the latter test was significant, a pairwise Wilcoxon rank sum test, using the holm correction for adjustment of the p-value, was performed to identify which groups were significantly different. The same procedure was applied to represent the spread and differences of $\Delta\text{N}_2\text{O}$ among seasons. To explain the variability of AO rates, ordinary least squares (OLS) regressions of AO rates as a function of each environmental variables were performed with the function *lmodel2* available in the *lmodel2* package (Legendre, 2013). The influence of environmental factors on AO rates was also investigated using a forward selection with the *forward.sel* function in the *packfor* package (Dray, 2012). We estimated the collinearity among variables using the variance inflation factor (VIF) by function available in *HH* package (Heiberger, 2014). Statistical significance of simple and multiple regressions were tested using two-tailed permutation test of the coefficient (β) and the R^2 with the function *lmorigin* in the *ape* package (Paradis et al, 2012). In addition, a univariate regression tree (URT) analysis of AO rates was performed to unveil possible non-linear relationships between AO rates and the set of explanatory variables. We used the same environmental variables used in the multiple linear regression, but this time not transformed, with the addition of season, depth, sampling time over 24-hour (*i.e.*, day and night) and presence-absence of archaeal and bacterial *amoA* genes during the sampling coded as factors. The most parsimonious tree was chosen with cross-validation using the function *mvpart* of the *mvpart* package (De'ath, 2012). Finally, we assessed the presence of outliers with the function *outlierTest* in the *car* package (Fox et al, 2012).

Results

Physico-chemical characterization of the lake

During our 11-month time series, dissolved NH_4^+ concentrations ranged from undetectable to $3.36 \mu\text{mol L}^{-1}$ at both sampling depths (*i.e.*, depth 1=10 and depth 2=1% of I_0 when no ice cover) (Figure 2.2). Break down of thermal stratification in November (Figure A.2) supplied the upper layer with NH_4^+ -rich water prior to ice-cover. High concentrations of NH_4^+ were observed throughout the winter. Near complete thermal mixing was observed in April (Figure A.2A), however NH_4^+ concentrations were not as high as those of November. Between May and September, temperature and DO profiles showed seasonal stratification with an oxycline fluctuating between 6 and 9 m (Figure A.2B). During this stratification period, high NH_4^+ concentrations were observed at the deeper site (*i.e.*, 7 m) in June. Dynamics of $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ concentrations follow a different pattern to NH_4^+ (Figure 2.2B). Near-zero concentrations were observed in October and November. $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ concentrations gradually increased throughout the winter and reached peak concentrations at both sampling depths in spring (3.01 ± 0.46 (SD) $\mu\text{mol L}^{-1}$). Concentrations declined during the stratified period and return to minimal values in autumn.

PCA ordination of environmental variables revealed distinct patterns in the distribution of physico-chemical variables among seasons (Figure 2.3A) and between both depths (Figure 2.3B). NH_4^+ , $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ concentrations, DO saturation, temperature and pH vary among samples. In turn, light intensity (I_z) shows little dynamics in our study. More specifically, samples in winter have the highest values in dissolved inorganic nitrogen (DIN) concentrations and the lowest in temperature. To a lesser extent, spring samples, with exception of surface waters in May, show similar values as in winter. Summer and autumn samples, excluding those taken during the overturn, are generally characterized by high temperatures and by low DIN concentrations. Additionally, deep samples display the lowest values in pH and DO saturation suggesting low photosynthesis activity at the bottom of the photic zone compared to in surface waters. In contrast to differences among seasons and

between depths, no sharp environmental gradients were observed between day and night sampling (Figure A.3).

Ammonia oxidation rates

AO rates across all seasons and depths ranged from undetectable to $333 \text{ nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, with a peak in activity observed under the ice (Figure 2.4). A particularly elevated AO rate observed at the 1% Io during the day in June ($579 \text{ nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) was considered an outlier due to methodological issues and excluded from statistical analyses. Interestingly, AO activity was observed throughout the photic zone of the water column all year long. We explored the difference in AO rates among seasons, between depths and day and night. Across seasons, winter rates were highest overall but only statistically significantly greater than those measured in autumn (Figure 2.5A; $P = 0.043$). Contrary to our expectations based on the physico-chemical patterns, no significant difference in AO rates was observed between depths (Figure 2.5B; $P = 0.95$). AO rates measured at night tended to be higher than those measured during the day, but this pattern was not statistically significant (Figure 2.5C; $P = 0.14$).

Ammonia oxidation rates in relation to environmental variables

We used an OLS regression approach to determine which environmental factors significantly explained the variability observed in AO rates throughout this study (Table 2.1). Of all variables tested, we found that AO rates were significantly positively related to NH_4^+ and $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ concentrations, and negatively related to temperature. However, only NH_4^+ concentration emerged as a significant variable after forward selection in a multiple regression. Indeed, this variable alone explained 41% of the variance in measured rates (Figure 2.6A). To reveal any non-linear relationship between AO rates and environmental data, we used URT analysis. This regression tree included all physico-chemical variables used for multiple linear regression with the addition of season, depth, sampling time over 24-hour (*i.e.*, day and night) and presence-absence of archaeal and bacterial *amoA* genes during the sampling as factors. The analysis explained 52% of the variance of AO rates and showed a two-leaf tree shaped by NH_4^+ concentrations (Figure 2.6B). In general, higher rates are found when NH_4^+ concentration was higher than $2.57 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. That corresponds to all samples

measured during the winter and to deep sites during the night in November and June (6 sites on 38).

Delta nitrous oxide concentrations in water

N₂O concentrations, a by-product of nitrification, were measured for eight months (February-October 2012) during the sampling period. Measured Δ N₂O (deviation from equilibrium with air) at both depths ranged from -2.72 to 5.57 nmol L⁻¹ (Table A.1). Highest Δ N₂O was observed under the ice in February (Figure 2.7). However, winter AO rates are not statistically significant from those measured during other season ($P \geq 0.15$).

Detection and diversity of ammonia oxidizers

The diversity of AOA and AOB in Lake Croche was also monitored for seasonal changes in community structure using *amoA* gene as a marker. Day samples were explored for diversity on all dates. Archaeal *amoA* gene fragments were detected in approximately 85% of samples and were present all year long in the water column (11 months) (Figure 2.8). In contrast, amplification of bacterial *amoA* gene was successful for less than half the dates (5 of 11 months) (Figure 2.8). The highest amplification for AOB was observed in samples collected during January and February.

Samples from deeper in the water column typically had greater amplification. In order to unveil the phylogenetic composition of AOA, archaeal *amoA* amplicons were cloned from four deep samples, one from each season. Clones were screened by RFLPs and 11 different clones were selected for sequencing. All archaeal sequences retrieved from the water column of the oligotrophic lake were members of *Nitrosotalea* (also referred as SAGMGC-1 or group I.1a associated) and *Nitrosopumilus* (also referred as Thaumarchaeal marine group I.1a) clusters based on the nomenclature of Pester et al (2012) (Figure 2.9). At the third phylogenetic level, most sequences, with the exception of one, fell into two different, but environmentally coherent subclusters (*Nitrosotalea* subcluster 1.1 and *Nitrosopumilus* subcluster 1.1). Both subclusters contain a large number of sequences recovered from freshwater environments (high mountains lakes: Auguet et al (2012), Auguet and Casamayor (2013), Restrepo-Ortiz et al (2014); drinking water: van der Wielen et al (2009)). However,

none of these subclusters contain exclusively *amoA* sequences retrieved from a single environment, but also include sequences from marine systems and soils. The sequences from Lake Croche were closely related (> 93% identity within the three following subclusters respectively) to the three most abundant AO Thaumarchaeota ecotypes (*Nitrosotalea* 1.1a, 1.1b and *Nitrosopumilus* 1.1) recently reported in high mountain lakes (Auguet & Casamayor, 2013; Restrepo-Ortiz et al, 2014; see Figure 2.9 stars). *Nitrosotalea* subcluster 1.1b was represented by sequences recovered from all four seasons (6 sequences out of 11). Three sequences from winter, spring and summer, respectively, matched the second group *Nitrosotalea* subcluster 1.1a. The latter were all closely related (between 95 and 99% identity) to AOA *Nitrosotalea devanaterre* (Lehtovirta-Morley et al, 2011). In summer, one sequence matched with the *Nitrosopumilus* subcluster 1.1, which includes Candidatus *Nitrosarchaeum koreensis* and Candidatus *Nitrosarchaeum limnia*. This sequence was closely related (95% identity in the *amoA* gene sequence) to the second organism, a novel AOA enriched from low-salinity sediments (Blainey et al, 2011). Finally, one of the *amoA* sequences collected in winter groups with *Nitrosopumilus* subcluster 5.1, a cluster dominated by freshwater and ground water sequences (Bollmann et al, 2014).

Bacterial *amoA* clone libraries were generated from samples collected during the day from bottom depth at three different months (February, May and July), which had the highest *amoA* gene amplification per season. The bacterial *amoA* gene was not detected in autumn samples. Fourteen clones were chosen based on RFLP analysis and sequenced. However, of the samples sequenced, only six matched the beta-proteobacterial *amoA* gene. Based on the nomenclature of Francis et al (2003), phylogenetic analysis revealed that these six sequences fell into two clusters (*Nitrosospira*-like clusters A and B) from which no cultured representatives are known (Figure 2.10). *Nitrosospira*-like cluster A includes Lake Croche sequences from winter, spring and summer. This cluster contains the majority of previously reported *amoA* beta-proteobacterial sequences retrieved from two freshwater lakes (Kim et al, 2008), a few sequences from oligohaline habitats in Chesapeake Bay (Francis et al, 2003) and from the roots of rice plants (Horz et al, 2000). Two sequences from summer sampling in Lake Croche were associated with the sequences contained in the *Nitrosospira*-like cluster B.

Interestingly, this latter cluster currently only contains sequences from brackish water and seawater habitats (*e.g.*, Francis et al, 2003; Kim et al, 2008; Santoro et al, 2010).

Discussion

This study is the first to measure simultaneously *in situ* AO rates and presence and diversity of AOA and AOB over the changing physico-chemical conditions of the seasons in a small oligotrophic lake. Four major outcomes were identified: (1) AOP were found to be active in the water column of the lake throughout the year; (2) NH_4^+ concentrations exerted the strongest influence on AO rates; (3) AOA, specific to oligotrophic freshwaters, play a dominant role in nitrification in Lake Croche; (4) winter appears to be a hot moment for AO, partly because of high substrate concentrations.

Physico-chemical determinants of ammonia oxidation rates and AOP communities

Our results show that AO occurs in Lake Croche at both 10% and 1% of surface light intensity throughout the year (Figure 2.4). This supports the body of evidence that AOP are active in the photic zone. Specifically, peaks of both nitrifying activity (*e.g.*, Grundle & Juniper, 2011; McCarthy et al, 1999; Santoro et al, 2010; Ward, 2005) and in the number of *amoA* transcripts (Pedneault et al, 2014) have been frequently measured at the bottom of the euphotic zone in marine environments. It is worth noting that many studies did dark incubations instead of simulating *in situ* light conditions. This could have overestimated the actual rates in the euphotic zone and therefore the role of nitrification in surface waters. This was tested in some light versus dark incubation studies, which have reported differential results. For example, Andersson et al (2006) and Yoshioka and Saijo (1985) found that rates measured under light conditions in laboratory (200 and $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively) were significantly lower than when incubated in the dark. In contrast, Small et al (2013) did not detect significant differences between bottles incubated *in situ* under light and dark conditions. However, this could also be a result of the low abundance of nitrifying organisms

that they observed in shallow depths. Given the influence of light on AO suggested by previous studies, we were curious to see whether rates would be more important at night than during the day in the area corresponding to the bottom of the euphotic zone. Lake Croche AO rates values suggest that night can be slightly more favourable for AO than the day, but to only a small extent as the difference between day and night rates was not statistically significant (Figure 2.5C). The absence of a significant difference could be due to the low light intensities at which we measured AO rates (Figure A.1) or by the absence of sharp environmental gradient observed between day and night samplings (Figure A.3).

The AO rates measured in this study are in the same range as those measured in other studies (Table 2.2). With the exception of the freshwater part of the Scheldt estuary, the reported range of NH_4^+ concentration ($\leq 25 \mu\text{mol L}^{-1}$) in those systems are relatively similar to the ones measured at the bottom of the euphotic zone in Lake Croche (Table 2.2). In addition, Lake Croche AO rates varied widely across seasons (from undetectable to $333 \text{ nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). This variation fits with strong changes in environmental gradients occurring in the lake. Surprisingly, only one freshwater study, carried out in Lake Superior, reported AO rates in the water column using stable isotopic tracers (Small et al, 2013). They found that AOA were the dominant ammonia-oxidizing organisms in the lake and that nitrification rates were low in the epilimnion during stratification because of the low abundance of these organisms. Lake Superior, however, is one of the largest freshwater lakes in the world and thus has characteristics that make it more similar to oceanic systems than other temperate lakes. Therefore, this study is the first to estimate rates using ^{15}N isotope tracer technique in a small temperate system. As mentioned earlier, we focused this study specifically on the euphotic zone. Considering that previous studies conducted in marine environments have shown that maximal AO rates often occurs near the bottom of the euphotic zone, it is reasonable to think that rates measured here also represent, at some moments, maximal rates in the water column of Lake Croche. This is more likely at the end of the summer, when the bottom of the euphotic zone coincided with the oxycline and the hypolimnion is anoxic (Figure A.2.B). However, AO in the water column of the lake still needs to be explored. Deeper areas of the water column in Lake Croche, excluding the period of anoxia during summer, might be more favorable to

greater AO activity, as there is usually more substrate. It has been shown, indeed, that nitrification activity generally increased with depth in lakes (Hall, 1986).

Our study shows the omnipresence of AOA over the year in Lake Croche, with AOB being present only intermittently (Figure 2.8). Our results agree with the growing evidence that AOA are more likely to dominate ammonia-oxidizing communities in oligotrophic freshwaters (Auguet et al, 2012; Restrepo-Ortiz et al, 2014; Small et al, 2013). Interestingly, many of the studies that reported AOA as the dominant ammonia-oxidizers share common features. The most obvious is the low ambient NH_4^+ concentrations, generally not exceeding $2 \mu\text{mol L}^{-1}$. In fact, cultivation-based studies have shown that AOA should have a competitive advantage over AOB in these poor substrate conditions. More precisely, cultured AOA have half-saturation constants (K_m) approximately 500 to 1 000 times lower than that of AOB (AOA: Martens-Habbena et al (2009), AOB: Schramm et al (1999), Bollmann et al (2002)). The amplification data thus suggest that AOA have a primary role in the occurrence of AO in the upper water-column of Lake Croche.

Ambient NH_4^+ concentration is a particularly important factor influencing AO in Lake Croche, as AO rates were well correlated with NH_4^+ (Figure 2.6A). AO rates were also positively correlated, but to a lower extent, with $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ concentration and negatively correlated with water temperature (Tab.2.1). These results make sense as highest rates were measured during the cold winter months, corresponding to maximum NH_4^+ and $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ concentrations (Figure 2.3A). A negative correlation between archaeal *amoA* genes and transcripts and temperature has been previously reported during the summer in lakes, where AOA were more abundant in the deeper waters (Vissers et al, 2013a). Besides that, the positive influence of NH_4^+ concentration on AO rates observed in Lake Croche (Figure 2.6) has also been observed in other systems (Andersson et al, 2006; Grundle & Juniper, 2011; Small et al, 2013). Probably one of the most striking examples of the effect of NH_4^+ on the range of nitrification rates occurred in the Scheldt estuary. Maximum rates were measured in the freshwater part of the estuary, characterized by NH_4^+ concentrations as high as $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. These rates were 35-fold higher than those measured in the marine part of the Scheldt estuary, in which NH_4^+ concentrations were barely detectable (Table 2.2). In fact, AOP can

respond rapidly to an elevation of substrate concentration occurring in the water column in increasing their *amoA* transcriptional activity (Pedneault et al, 2014; Vissers et al, 2013a). In Lake Croche, NH_4^+ concentration alone explained about 50% of the variability in AO rates (Figure 2.6), implying that other unidentified factors are also involved. The unexplained part of the variability in rates could be due to biotic environmental factors like competition with phytoplankton for the same substrate (Collos et al, 1988; Small et al, 2013) or to trophic effects such as protistan bacterivory (Lavrentyev et al, 1997) and changes in N recycling rates by zooplankton and heterotrophic bacteria (Souza et al, 2014; Vissers et al, 2013a).

Integrated AO rates revealed that maximum Lake Croche AO activity occurred in winter. As mentioned earlier, Lake Croche, due to its morphometry, has periodic anoxia in the hypolimnion during the summer up until fall mixing (Figure A.2B). Elevated concentrations of NH_4^+ in the hypolimnion, as a function of ammonification in these bottom waters and sediments, resulted in a redistribution of NH_4^+ through the entire water column during the lake turnover (Figure 2.2A). We observed concomitant elevated AO activity during this period of the year. Seasonal mixing has previously been identified as an important moment for nitrification in monomictic lakes (Carini & Joye, 2008; Cavari, 1977). Interestingly, AO activity stayed high during the winter and reached maximal value of $333 \text{ nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Figure 2.4). Nitrifying activity has been previously reported during winter in the water column of a temperate lake (Knowles & Lean, 1987). More interestingly, winter peaks of nitrifying activity have been observed in seasonal studies conducted in the coastal Arctic Ocean (Christman et al, 2011) and the Scheldt estuary (Andersson et al, 2006). The latter study reports no or very low growth of nitrifiers (measured as the incorporation of carbon). They concluded that high AO rates were likely due to an increase in abundance of nitrifiers instead of an increase of activity per cell. In our study, the best amplification of *amoA* genes of both AOA and AOB was observed in winter samples, suggesting a similar case in Lake Croche. Nonetheless, our work supports the idea that nitrifying organisms are active at the low temperatures ($\sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$) prevailing in winter (Collos et al, 1988; Horak et al, 2013). Since NH_4^+ is important in control of AO rates in Lake Croche (Figure 2.6), it is the high availability of this substrate that seems to explain the winter peak.

Even if it has been suggested that AOA and AOB occupy different ecological niches in aquatic systems based particularly on their AO kinetic differences (Martens-Habbena et al, 2009), it has been shown that both can sometimes have similar spatial distribution patterns (Vissers et al, 2013a). The co-occurrence of AOA and AOB in Lake Croche, principally during winter, might be due to peaks in ambient NH_4^+ concentration. NH_4^+ concentrations were also relatively high during the seasonal mixing in autumn and at the deeper sampling site in June. Therefore, there may be other factors than substrate concentration that are causing the greater abundance of AOB in winter. Competition for substrate in the water column may explain this pattern. A study in Arctic Ocean had observed that archaeal and bacterial *amoA* genes copies number were higher in winter (Christman et al, 2011) when the abundance and the production of heterotrophic prokaryotes as well as the chlorophyll a concentration were lower than in the summer. An additional explanation could be that planktonic protists bacterivory controls the AOB abundance during the ice-free period, enabling AOB only to reach high abundance during the winter months. A study realized on batch cultures shows the potential ability of planktonic protists (e.g., flagellates, nanociliates) to control AOB populations directly via grazing which would inhibit nitrification by reducing bacterial numbers as well as indirectly by prompting bacterial aggregation (Lavrentyev et al, 1997). Neubacher et al (2008) showed no selective feeding of AOB compared to other bacteria. However, among the AO community, AOB could be more vulnerable to predation than AOA given the large difference between cell size and biomass of cultured species (Martens-Habbena et al, 2009; supp. info.). Therefore, even if AOB were present in low abundance most of the year, they could still have a significant impact on the N cycle during winter.

Phylogenetic diversity of freshwater AOA and AOB

Over the last few years, studies looking at AOP in freshwater lakes had contributed to the identification of new archaeal *amoA* sequences giving new insights on the AOA present in these habitats (Auguet et al, 2012; Auguet & Casamayor, 2013; Restrepo-Ortiz et al, 2014). Many of these new sequences, like most of the archaeal sequences retrieved from Lake Croche, are clustered with *Candidatus Nitrosotalea devanaterra* (from acid soil) in the *Nitrosotalea* cluster (also referred as SAGMGC-1 or group I.1a associated) (Figure 2.8). Our findings support the ecological importance of this cluster in oligotrophic freshwaters. The

remaining Lake Croche sequences cluster within the *Nitrosopumilus* cluster, close to the low salinity archaeal *Nitrosoarchaeum limnia* as well as environmental sequences retrieved from freshwaters and low salinity environments (Cao et al, 2013). The most interesting finding of this work is that all archaeal sequences, except one, are very closely related to the three most abundant ammonia-oxidizing Thaumarcheota ecotypes recently reported in high mountains lakes (Figure 2.8). This shows that these ecotypes are also successful in temperate oligotrophic lakes.

AOB affiliated with *Nitrosospira* lineage seem to be prevalent at our study site over seasons (Figure 2.9). This lineage, which belongs to the beta subclass of Proteobacteria, is known to be ubiquitous in the environment, particularly in freshwaters and sediments (Bollmann et al, 2014; Hiorns et al, 1995; Kim et al, 2008). This is partly due to their ability to grow in relatively low NH_4^+ content habitats (half-saturation constant (K_m) of $\text{NH}_3 = 40 \mu\text{mol L}^{-1}$, (Schramm et al, 1999)). The fact that AOB in Lake Croche group with *Nitrosospira*-like cluster A highlights the importance of this cluster in the water column of freshwater lakes. Interestingly, this cluster contains sequences retrieved from the euphotic zone and deeper waters of mesotrophic and eutrophic lakes (Kim et al, 2008). This suggests that AOB members of *Nitrosospira*-like cluster A have the ability to be present under a wide range of N concentration and light intensity. We also found AOB sequences affiliated with members of *Nitrosospira*-like cluster B, a group previously thought to contain only marine organisms (Kim et al, 2008). This underlines the difficulty in associating phylogenetic clusters to a specific type of habitat. Surprisingly, we detected no AOB affiliated to *Nitrosomonas oligotropha*, an AOB known to be well adapted to poor substrate concentration and often recovered from oligotrophic freshwaters (Bollmann et al, 2002; Bollmann & Laanbroek, 2002; Koops & Pommerening-Röser, 2001). This may be due to the low number of sequences recovered in this study. Nonetheless, our results provide an overview of the major groups of AOB present in the water column over the year.

Role of ammonia oxidation in lake ecosystems

Nitrification seems to be important for the N availability in Lake Croche. This lake is a headwater lake whose catchment area is covered by a pristine forest, so it is to be expected that most of NO_3^- come from autochthonous sources. Therefore the phytoplankton $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ needs are likely supplied by nitrification during the ice-free period in Lake Croche. Previous studies in marine systems have estimated that nitrification can account for up to 150% of the daily phytoplankton NO_3^- demand in the euphotic zone (Grundle & Juniper, 2011; McCarthy et al, 1999). A similar observation was reported in Lake Superior, where 98% of the NO_3^- was estimated to be derived from nitrification (Small et al, 2013). Lake Croche is known to have a metalimnetic peak of chlorophyll ($\sim 7 \mu\text{g L}^{-1}$) in July (Ouellet Jobin & Beisner, 2014). We measured $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ concentrations about four times higher than NH_4^+ concentrations at the bottom of the euphotic zone during this same period (Figure 2.2). The N forms available in the systems can influence the composition in species of the phytoplankton community, as there is differential competition among algal species for the acquisition of diverse N forms (Berman & Chava, 1999; Blomqvist et al, 1994). Hence, the availability of NO_3^- could explain the dominance of eukaryotic phytoplankton (*i.e.*, diatoms, dinoflagellates and chrysophytes) observed in this deep chlorophyll maximum in Lake Croche (Ouellet Jobin & Beisner, 2014).

The $\Delta\text{N}_2\text{O}$ measured in Lake Croche are within the range of those previously measured in surface water of numerous natural N-poor boreal lakes (-5.1 and 16.4 nmol L^{-1}) (Soued et al, 2014 submitted). In Lake Croche, the large N_2O accumulation under the ice (Figure 2.7) concurred with high AO rates (Figure 2.5A) suggesting that AO is an important pathway for N_2O production especially in winter. Alternatively, the N_2O under-saturation ($\Delta\text{N}_2\text{O} < 0$; table A.1) of the bottom of the euphotic layer, except during winter and early spring, clearly indicate a consumption of this gas by denitrifiers. Denitrification is most likely to occur in the hypolimnion of Lake Croche as bottom waters are periodically anoxic. In Lake Croche, because NO_3^- probably comes principally from autochthonous sources, according to the little input from the watershed, coupling between nitrification and denitrification plays an important role in loss of N from the lake.

Data presented here clearly established the role of NH_4^+ concentration in influencing the magnitude of nitrification and in shaping AO communities in oligotrophic temperate lakes. Furthermore, pulses of NH_4^+ due to fall turnover explained the high AO activity measured under the ice. High rates in January and February are consistent with the accumulation of N_2O , as well as the high amplification of both AOA and AOB observed during this period. Together, these observations support the idea that winter is a hot moment of AO in the upper water column. This role is poorly understood in the global inland water N cycle and deserves further attention. Even if our diversity results most likely only scratch the surface of the overall diversity of freshwater AOP, they highlight successful AOA ecotypes in oligotrophic freshwaters. Moreover, the omnipresence of AOA over the year associated with measurable AO rates suggests a key role of archaea in the ammonia-oxidizing community of oligotrophic freshwater lakes. We hope that our results will stimulate research which combines biogeochemical rate measurements and molecular biology-based genetic analysis in small freshwater lakes in order to better link the community composition to their relative contribution in the N cycle. This study provides a baseline for our understanding of the natural AO process in small lakes.

Acknowledgements

We thank Marie-Pier Hébert, Sara Dupont, Jean-Olivier Goyette, Cynthia Soued and Philippe Galipeau St-Pierre who successively provided field assistance. Dominic Bélanger, Morgan Botrel, Laura Bristow, Damian Grundle and Xuenfang « Nick » Peng provided valuable advice on methods. Employees of the Station de biologie des Laurentides de l'Université de Montréal provided logistical support. Catherine Baltazar, Marie-Pier Hébert, Dan Nguyen et Cynthia Soued revised an early version of the manuscript. S.M was supported by the master's research scholarships from the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and from the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FQRNT).

Tables and figures

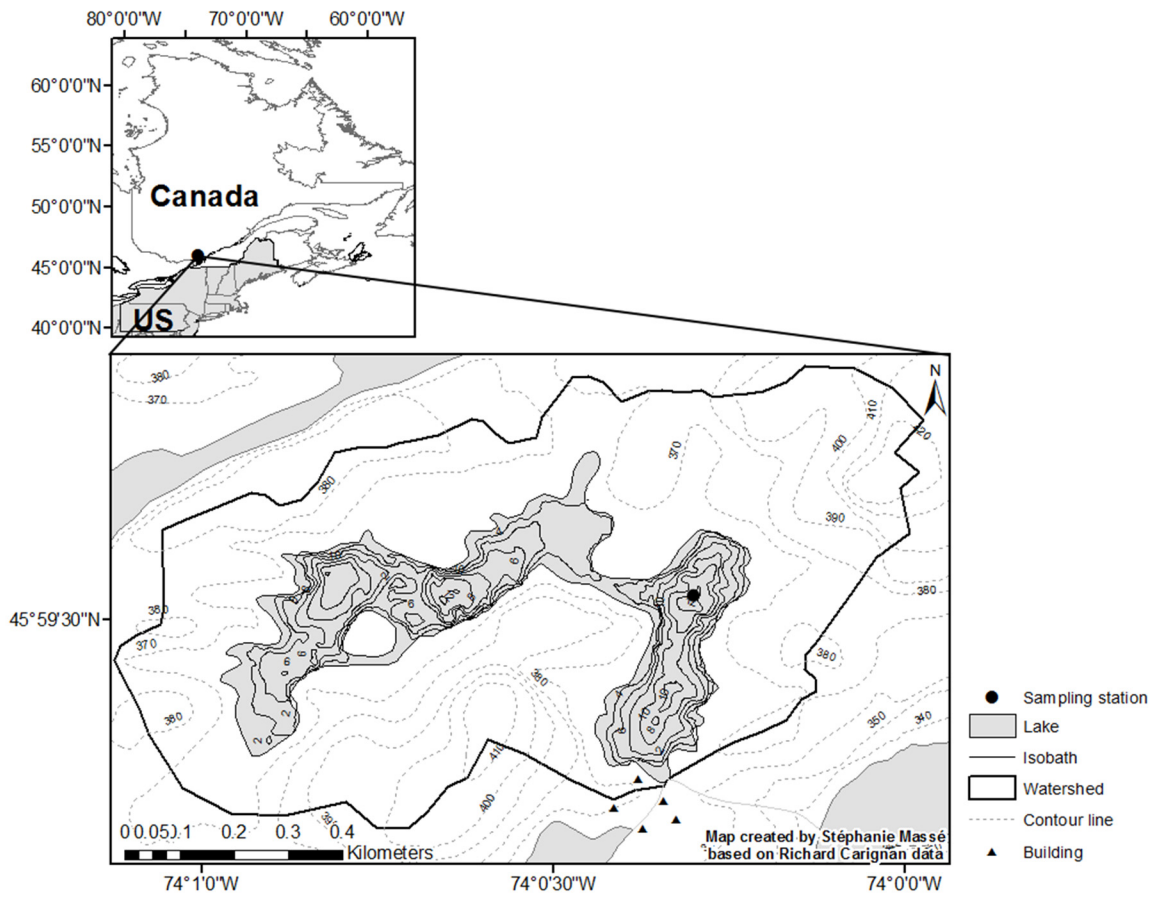


Figure 2.1. Geographical location of Lake Croche.

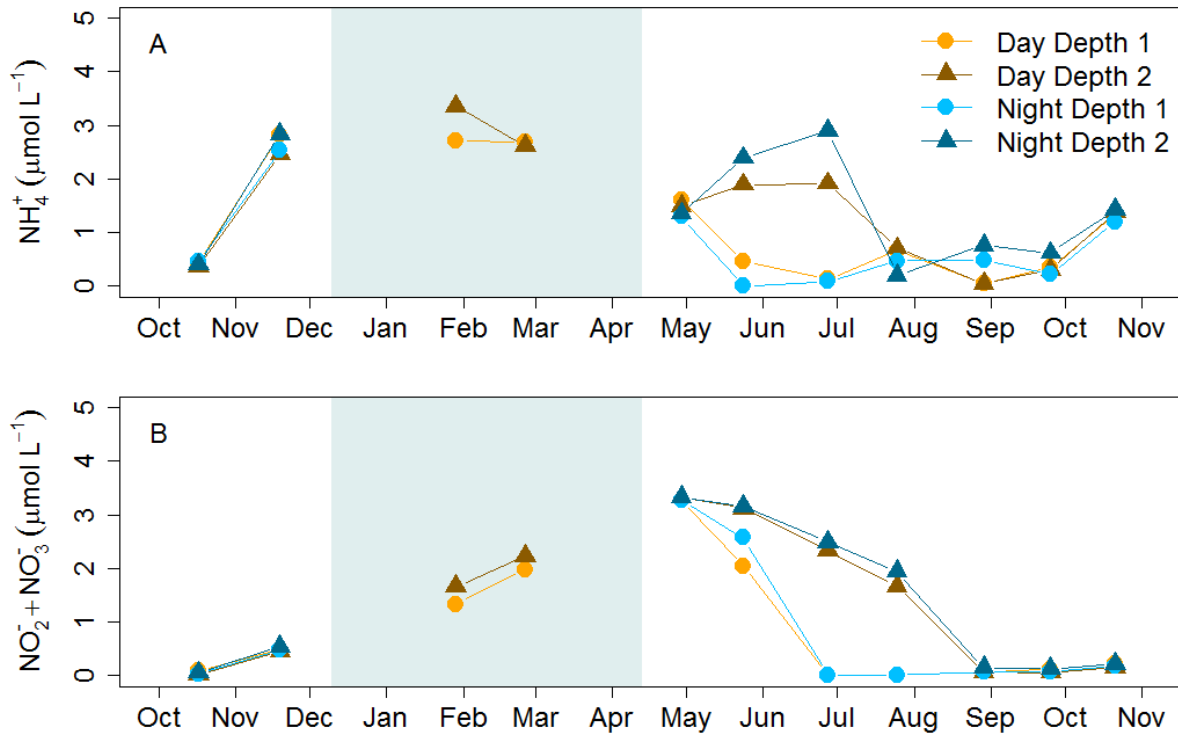


Figure 2.2. Temporal variation of ammonium concentrations in (A), and nitrite+nitrate concentrations in (B) at both depths sampled during day and night. Depth 1 and depth 2 refer to the depth where 10% and 1% of the incident light was measured during the day respectively. For night measurements, samples were collected at the same depths that were sampled during the day. During the ice covered period, samples were collected at 3 and 6 m. The period where the lake was covered by ice is depicted by a grey rectangle.

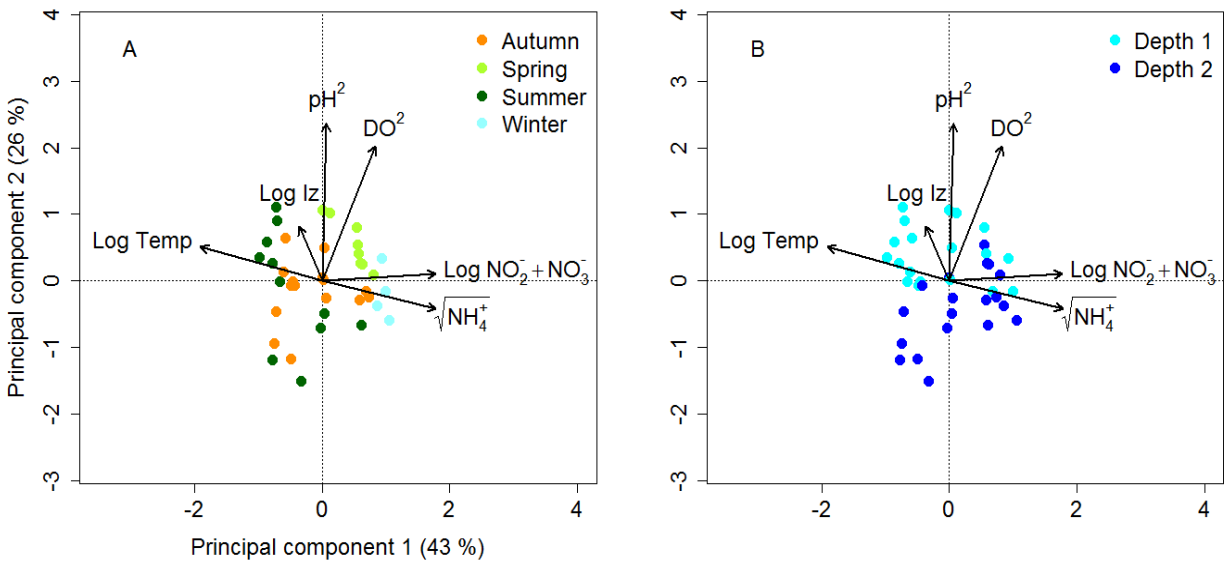


Figure 2.3. Principal component analysis (PCA) of environmental factors at both depths sampled during day and night, scaling type 1 (= distance biplot). The choice of symbols displays the seasonal pattern of the environmental factors in (A), and the environmental distinction between the two depths in (B).

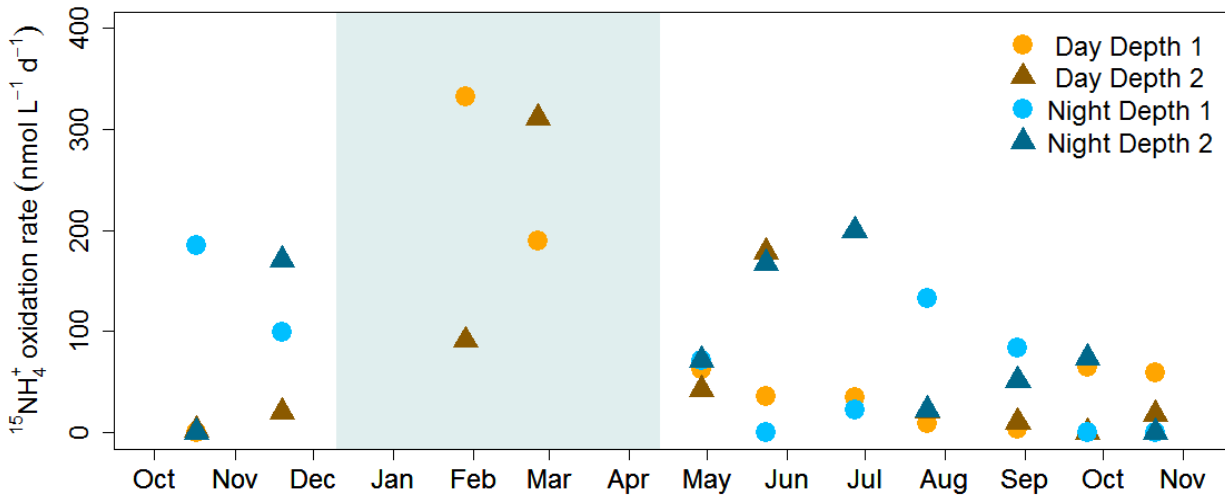


Figure 2.4. Seasonal variation of ammonia oxidation rates at both depths sampled during day and night. The following data points are hidden by closed triangles: day-depth 1 and 2 in October 2011, night-depth 1 in April, day-depth 2 in August and night-depth 1 in October 2012. The period where the lake was covered by ice is depicted by a grey rectangle. See Table A.1 for all values of ammonia oxidation rates, including the excluded value.

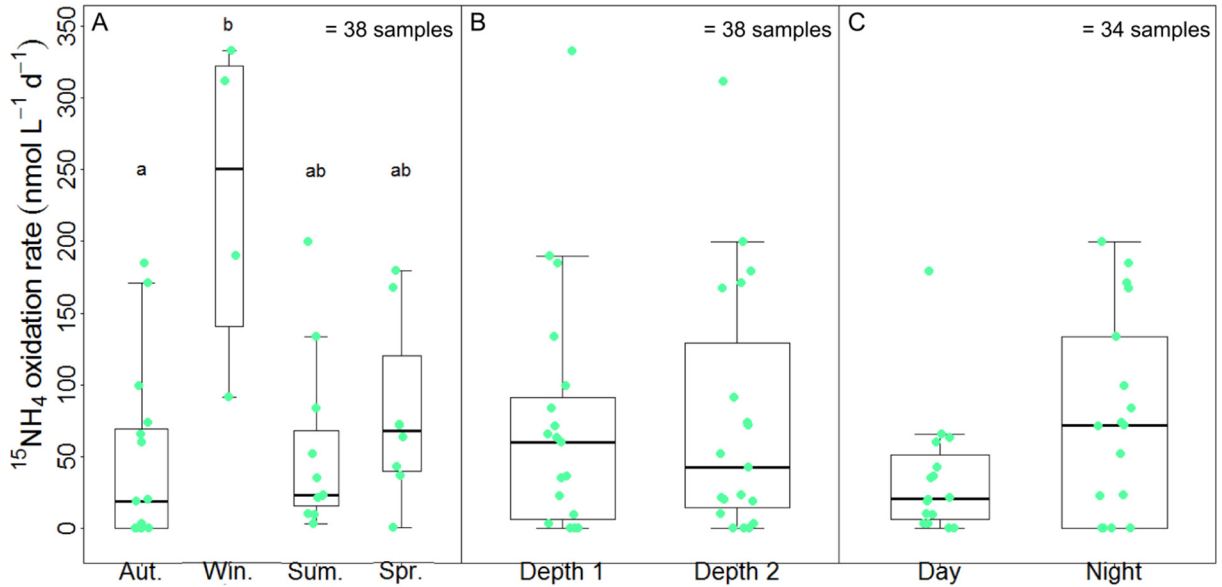


Figure 2.5. Box and dot plots of ammonia oxidation rates according to (A) the season and (B) the depth for all the dataset and (C) the sampling time over the diel cycle. Winter rates, measured during the day but under dark condition, were excluded from the analysis in (C). Medians are denoted by central lines and are bounded by the 25th and 75th percentiles. Whiskers show 10th and 90th percentiles. Dots outside boxes and whiskers are outliers. Box widths are proportional of the square root of samples sizes. Data points were jittered to prevent overplotting in graphs. Different letters represent significant difference among groups based on non-parametric pairwise wilcoxon rank sum test.

Table 2.1. Summary of simple linear regressions using ordinary least squares (OLS) of square root transformed ammonia oxidation rates vs transformed environmental variables. From October 2011 to October 2012 (38 samples).

Variable	simple linear regression (OLS)	
	β	R ²
sqrt(NH ₄ ⁺)	0.64***	0.41***
log(NO ₃ ⁻)	0.42**	0.17**
log(I _z)	-0.15	0.022
log(I _z : I ₀)	-0.19	0.035
log(Temp)	-0.54***	0.29***
(DO saturation) ²	-0.050	0.0025
(DO) ²	0.20	0.040
(pH) ²	0.017	0.00030

*p < 0.05. **p < 0.01. ***p < 0.001 by two-tailed permutation test of the regression coefficient (β) and the R²

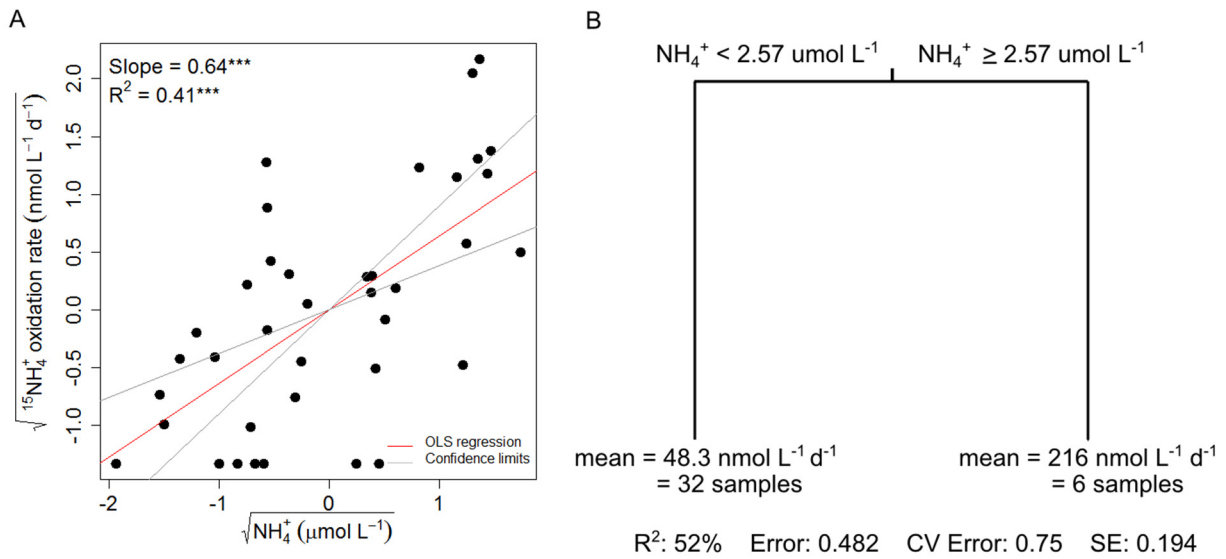


Figure 2.6. In (A), linear regression of ammonia oxidation rate vs ammonium concentration. Scatter diagram shows the ordinary least squares (OLS) regression line and its 95% confidence region (=38 samples. $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$ by two-tailed permutation test of the regression coefficient (Slope) and the R^2). In (B), univariate regression tree analysis of the ammonia oxidation rate. The explanatory variable used to split (nonterminal node) the data was the ambient concentration of ammonium. The split is labeled with the variable and the concentration in this case that determines the split. Each node is labeled with the mean rating and the number of sites in the group.

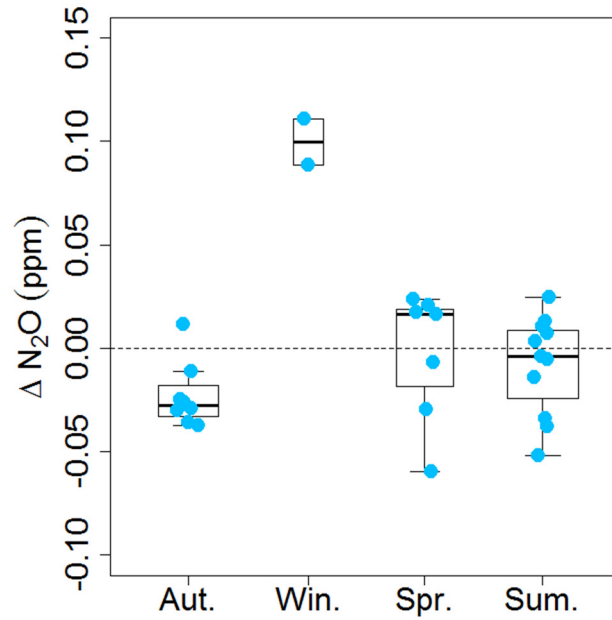


Figure 2.7. Box and dot plots of delta nitrous oxide concentrations in water (deviation from equilibrium with air) according to the season for the dataset from February to October 2012 (=28 samples). Medians are denoted by central lines and are bounded by the 25th and 75th percentiles. Whiskers show 10th and 90th percentiles. Dots outside boxes and whiskers are outliers. Widths boxes are proportional of the square root of samples sizes. Data points were jittered to prevent overplotting in graphs.

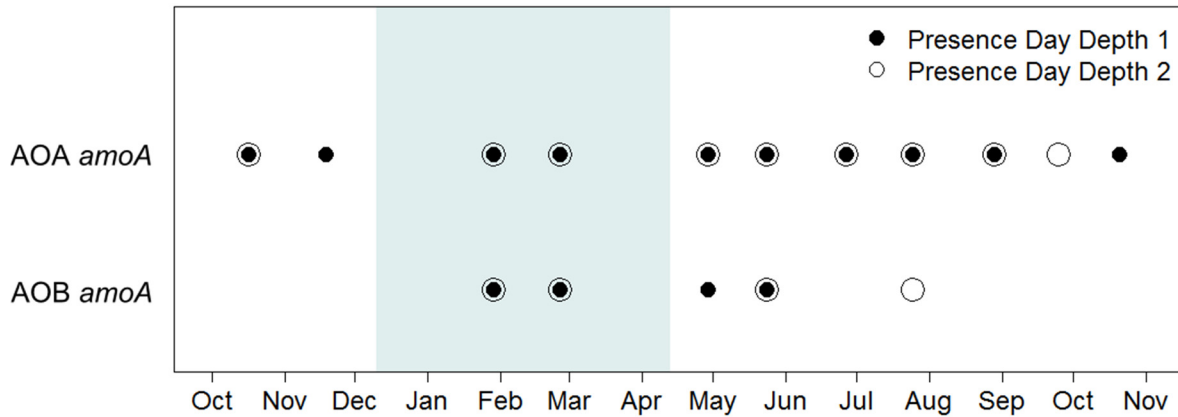


Figure 2.8. Presence of archaeal and bacterial *amoA* gene fragment at both depths during the day. Presence is assumed when PCR amplicon was obtained. The period where the lake was covered by ice is depicted by a grey rectangle.

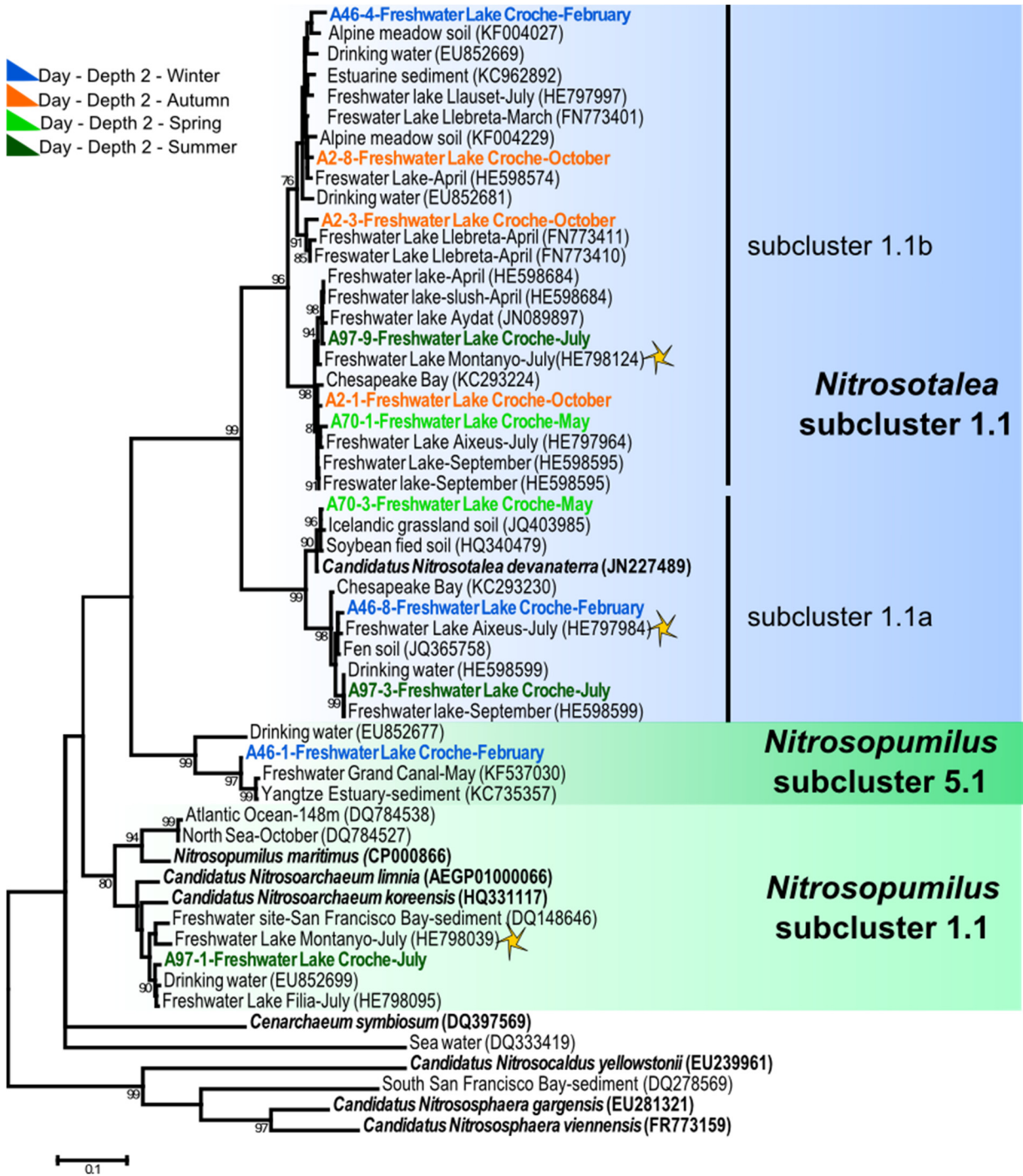


Figure 2.9. Phylogenetic relationships among archaeal *amoA* sequences from Lake Croche (in color) and previously reported environmental sequences. Nomenclature of clusters according to Pester et al (2012) and Restrepo-Ortiz et al (2014). This tree is a maximum likelihood tree based on the Hasegawa-Kishino-Yano model (Hasegawa et al, 1985). Bootstrap values (>75%; 1 000 replicates) are indicated at branch points. The scale bar represents 0.1 estimated

number of substitutions per nucleotide position. Three most abundant AO Thaumarchaeota ecotypes previously found in high mountains lakes (Auguet & Casamayor, 2013; Restrepo-Ortiz et al, 2014) are indicated by stars.

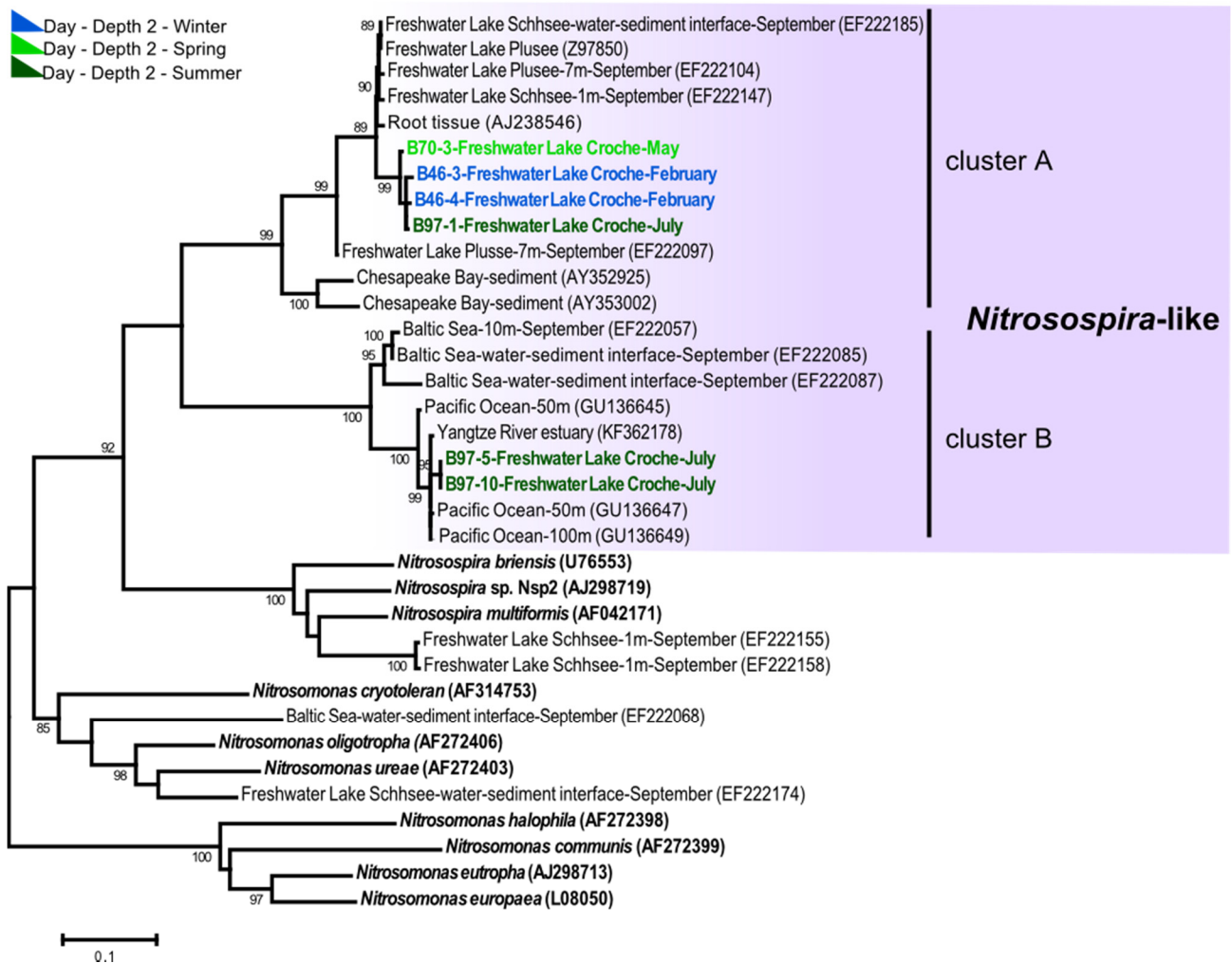


Figure 2.10. Phylogenetic relationships among bacterial *amoA* sequences from Lake Croche (in color) and previously reported environmental sequences. Nomenclature of clusters according to Francis et al (2003). This tree is a maximum likelihood tree based on the Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993). Bootstrap values (>75%; 1 000 replicates) are indicated at branch points. The scale bar represents 0.05 estimated number of substitutions per nucleotide position.

Table 2.2. Comparison of ammonia oxidation rates reported for pelagic environments. All rates were obtained by measuring the oxidation of ^{15}N -labeled NH_4^+ . Values with one asterisk correspond to rates that were calculated based on the accumulation of the ^{15}N in both NO_2^- and NO_3^- pools, instead of NO_2^- pool. Values with two asterisks correspond to rates that were calculated based on the accumulation of the ^{15}N in the NO_3^- pool only. The type of system, the depths sampled, the range of ambient ammonium (NH_4^+) or ammonia (NH_3) concentrations and the light condition during incubation are presented.

Location	Type of system	Depth	NH_4^+ or NH_3 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Nitrification rate ($\text{nmol L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Light condition	Reference
Lake Croche, Quebec	small oligotrophic lake	Bottom of the photic zone	0-3.36	0-333	<i>In situ</i>	This study
Lake Superior, US and Canada	largest freshwater lake (oligotrophic)	2-150 m	0.09-1.11	0-83*	Dark	Small et al (2013)
Mono Lake, California	alkaline and saline lake	Surface to oxycline layer	0-20	4-480*	Dark	Carini and Joye (2008)
Scheldt estuary, Netherlands and Belgium	freshwater part of the estuary	2 m	≤ 150	3600-16800**	Dark	Andersson et al (2006)
Hood Canal, Washington	marine part of the estuary		≤ 25	0-480**		
	fjord	0-120 m	0-0.646	0-550*	Dark	Horak et al (2013)
	fjord	Between photic zone and the oxic-anoxic interface (~140 m)	0-3.5	0-120	Dark	Ward and Kilpatrick (1990)
Saanich Inlet, British columbia						
Gulf of California	coastal waters	Upper water column (30-60 m)	0.01-0.05	0-93*	<i>In situ</i>	Beman et al (2008)
Monterey Bay, California	coastal waters	Photic zone and 3 depths below	Undetectable	20-80	<i>In situ</i>	Ward (2005)
Central California Current	open ocean	Photic zone	0-1	2-210*	Dark	Santoro et al (2010)
Arabian Sea	open ocean	60-0.1% Io	≤ 1	5-100	<i>In situ</i>	McCarthy et al (1999)
Arabian Sea	open ocean	40-1500 m	undetectable	0-22	Dark	Newell et al (2011)



Chapitre 3 : Conclusions générales

Conclusions générales

La perception générale de la première étape limitante de la nitrification, c.-à-d. de l'oxydation de l'ammoniac, a profondément été bouleversée lors de la découverte de certaines archées capables de réaliser cette réaction afin d'acquérir leur énergie en milieu aérobique. Cette découverte a stimulé la recherche sur le sujet, principalement dans les sols et les océans. Néanmoins, malgré le rôle substantiel des lacs comme transformateurs d'azote, les études portant sur l'oxydation de l'ammoniac dans les lacs depuis le développement de nouvelles méthodologies sont rares. Afin de combler les lacunes que présentent les connaissances actuelles, nous avons choisi le lac Croche comme sujet d'étude. Ce lac, situé sur la station de recherche de l'Université de Montréal dans la région des Laurentides, constitue un sujet d'étude exceptionnel, car il nous a permis d'établir des connaissances de référence à l'aide de méthodologies relativement nouvelles. En effet, le lac Croche est un lac oligotrophe naturel dont le bassin versant est resté vierge. De par sa taille et sa profondeur, il représente un lac typique de la région tempérée avec des cycles de stratification et de brassage.

L'utilisation de traceurs isotopiques stables nous a permis de mesurer des taux d'oxydation d'ammoniac aux intensités lumineuses et aux températures propres à la zone euphotique du lac Croche au cours des différentes saisons. La zone euphotique du lac Croche correspondait la plupart du temps (sauf en hiver) à la moitié de la colonne d'eau. Les taux obtenus au cours de cette étude sont donc représentatifs de l'activité d'une grande proportion de procaryotes planctoniques oxydant d'ammoniac. Nos résultats démontrent que ces organismes sont actifs durant toute l'année incluant l'hiver. Les taux mesurés durant cette étude varient d'indétectable à $333 \text{ nmol L}^{-1} \text{ j}^{-1}$ avec des taux maximaux en hiver. La concentration ambiante de NH_4^+ explique près de la moitié de la variabilité des taux mesurés. Une telle relation a été observée précédemment dans certains systèmes marins. Nos résultats démontrent donc l'importance de ce nutriment sur la grandeur des taux dans la zone euphotique des lacs oligotrophes en région tempérée. De plus, la gamme de valeurs mesurées concorde avec celles reportées précédemment dans la littérature en milieux marins. Nous

avons comme hypothèse que les taux seraient à leur maximum durant l'automne, au moment du brassage saisonnier. Nos résultats démontrent que l'effet de la remontée de NH_4^+ lors du brassage saisonnier se prolonge durant l'hiver dû à la faible abondance de phytoplancton durant cette période. Ainsi, contrairement à nos attentes, l'hiver s'avère un moment où une forte activité nitrifiante se produit. Nous pensons que l'occurrence de taux maximaux en hiver est due à une plus grande abondance de procaryotes oxydant d'ammoniac plutôt qu'à une plus grande activité, comme le suggèrent les valeurs de coefficient de température Q_{10} , facteur par lequel une réaction augmente lorsque la température augmente de dix degrés, reportées dans la littérature pour les organismes oxydant d'ammoniac ($Q_{10} \sim 3$; Qin et al, 2014). En effet, en hiver, il est probable qu'une plus faible bactériovorie combinée à une plus faible photoinhibition et compétition pour le substrat permet à une plus grande quantité d'AOA et de BOA d'exploiter cette niche écologique.

La méthodologie choisie afin de mesurer les taux d'oxydation de l'ammoniac avait pour but d'obtenir une estimation la plus juste des taux *in situ*. Néanmoins, certains détails font en sorte que ce n'est probablement pas le cas de tous les taux mesurés au cours de cette étude. En effet, l'addition de traceurs était, à certains moments, supérieure au maximum visé (c.-à-d., 10% de la concentration ambiante *in situ*). Ceci a possiblement mené à la surestimation de certains taux. Cependant, les plus hauts taux mesurés au cours de la série temporelle ont tous reçus une addition de traceurs sous le seuil visé. Il est donc très probable que les taux mesurés dans le lac Croche soient une estimation fidèle à la réalité. Un autre but de la présente étude était de mesurer des taux dans la zone euphotique du lac. Nous trouvons donc essentiel de faire les incubations aux intensités lumineuses retrouvées aux profondeurs échantillonnées. Afin d'éviter que le phytoplancton assimile le $^{15}\text{NO}_2^-$ nouvellement produit par la première étape de la nitrification durant l'incubation, nous avons ajouté une quantité standard de NO_2^- non marqué au début des incubations. Toutefois, dans certaines bouteilles, la concentration de $^{15}\text{NO}_2^-$ a tout de même diminué au cours de l'incubation résultant en des taux d'oxydation d'ammoniac négatifs. Nous avons considéré ces taux comme nuls, comme ces derniers ne représentent pas des taux d'oxydation d'ammoniac mais plutôt l'assimilation de NO_2^- . Ceci a pu contribuer à affaiblir la relation détectée entre les concentrations de NH_4^+ et

les taux d'oxydation d'ammoniac, car des taux inférieurs à $0 \text{ nmol L}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ont été mesurés à différentes concentrations de NH_4^+ (Figure 2.6A). Surprenamment, l'assimilation de $^{15}\text{NO}_2^-$ a également été mesurée dans certaines incubations réalisées durant la nuit. Ceci s'explique probablement par l'habilité de certaines espèces de phytoplancton à assimiler l'azote dans le noir (Paasche et al, 1984), toutefois à un taux inférieur à celui mesuré durant le jour (McCarthy et al, 1999).

L'utilisation d'amorces permettant de cibler le gène fonctionnel codant pour le premier enzyme impliqué dans l'oxydation de l'ammoniac chez les AOA et les BOA a permis de détecter la présence de ces deux groupes dans la colonne d'eau du lac Croche. Les AOA et les BOA s'avèrent ne pas avoir les mêmes patrons de présence. En effet, les archées sont omniprésentes au cours de l'année. Ce résultat s'ajoute aux autres indices suggérant la dominance des archées dans la communauté oxydante d'ammoniac des lacs oligotrophes, comme dans les régions marines oligotrophes. Notre hypothèse voulant que les AOA aient plus de succès que les BOA dans le lac Croche en raison de son niveau trophique semble donc vraie. Les BOA sont, quant à elles, présentes périodiquement durant l'année et coexistent avec les AOA principalement en hiver. Ceci s'explique probablement par des concentrations de NH_4^+ plus élevées en surface lorsque le lac est couvert de glace.

Le séquençage du gène *amoA* des archées du lac Croche révèle qu'une grande majorité des AOA détectées font partie du groupe phylogénétique *Nitrosotalea* (aussi nommé SAGMGC-1 ou groupe I.1a associé). Nos résultats s'ajoutent ainsi à ceux de récentes études réalisées également en milieu d'eau douce oligotrophe et permettent d'appuyer l'importance écologique de ce groupe d'AOA dans ces milieux. Il existe donc des AOA propres aux lacs et différentes de celles retrouvées en milieux marins. Les analyses phylogénétiques combinant nos séquences avec d'autres retrouvées dans divers milieux naturels vont dans ce sens. En effet, les AOA retrouvées dans le lac Croche sont étroitement apparentées phylogénétiquement aux trois écotypes les plus abondants récemment découverts dans certains lacs alpins oligotrophes d'Espagne.

Nous avons mesuré la concentration de N_2O aux mêmes profondeurs que celles échantillonnées pour l'oxydation de l'ammoniac. Nos résultats révèlent qu'en hiver, l'eau du lac Croche est au moins cinq fois plus saturée en N_2O que durant le reste de l'année. Ceci démontre qu'il y a production de ce gaz sous la glace par les procaryotes oxydant d'ammoniac. Ces derniers contribuent donc aux émissions de ce gaz principalement lors de la fonte des glaces, lorsque le gaz accumulé durant l'hiver s'échappe vers l'atmosphère. Nos résultats concordent avec ceux reportés pour un grand nombre de lacs de la région boréale. Ces lacs étaient beaucoup plus saturés en N_2O durant l'hiver, la glace piégeant le gaz dans l'eau. Les concentrations de N_2O observées dans ces lacs sont similaires à celles observées dans le lac Croche.

Une vue d'ensemble de nos résultats met en évidence l'hiver comme une saison propice pour l'oxydation de l'ammoniac dans la colonne d'eau. Ceci souligne l'importance des études saisonnières lorsqu'il est question d'étudier un processus microbien. Nous espérons que cette étude stimulera la recherche reliant la mesure de l'activité nitrifiante à la structure de la communauté nitrifiante dans les petits lacs et qu'elle servira d'état de référence pour mieux comprendre l'oxydation de l'ammoniac dans les petits lacs oligotrophes.

Bibliographie

- Andersson MGI, Brion N, Middelburg JJ (2006). Comparison of nitrifier activity versus growth in the Scheldt estuary - a turbid, tidal estuary in northern Europe. *Aquat Microb Ecol* **42**: 149-158.
- Auguet J-C, Triado-Margarit X, Nomokonova N, Camarero L, Casamayor EO (2012). Vertical segregation and phylogenetic characterization of ammonia-oxidizing archaea in a deep oligotrophic lake. *ISME J* **6**:1786–1797.
- Auguet J-C, Casamayor EO (2013). Partitioning of thaumarchaeota populations along environmental gradients in high mountain lakes. *FEMS Microbiol Ecol* **84**: 154-164.
- Auguet JC, Nomokonova N, Camarero L, Casamayor EO (2011). Seasonal changes of freshwater ammonia-oxidizing archaeal assemblages and nitrogen species in oligotrophic alpine lakes. *Appl Environ Microbiol* **77**: 1937-1945.
- Beman JM, Popp BN, Francis CA (2008). Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME J* **2**: 429-441.
- Beman JM, Chow C-E, King AL, Feng Y, Fuhrman JA, Andersson A *et al* (2011). Global declines in oceanic nitrification rates as a consequence of ocean acidification. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 208-213.
- Berman T, Chava S (1999). Algal growth on organic compounds as nitrogen sources. *J Plankton Res* **21**: 1423-1437.
- Berounsky VM, Nixon SW (1990). Temperature and the annual cycle of nitrification in waters of Narragansett Bay. *Limnol Oceanogr* **35**: 1610-1617.
- Billen G (1976). Evaluation of nitrifying activity in sediments by dark ¹⁴C-bicarbonate incorporation. *Water Res* **10**: 51-57.
- Blainey PC, Mosier AC, Potanina A, Francis CA, Quake SR (2011). Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. *PLoS ONE* **6**: e16626.
- Blomqvist P, Petterson A, Hyenstrand P (1994). Ammonium-nitrogen: a key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems. *Arch Hydrobiol* **132**: 141-164.

- Bollmann A, Bär-Gilissen M-J, Laanbroek HJ (2002). Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4751-4757.
- Bollmann A, Laanbroek HJ (2002). Influence of oxygen partial pressure and salinity on the community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the Schelde estuary. *Aquat Microb Ecol* **28**: 239-247.
- Bollmann A, Bullerjahn GS, McKay RM (2014). Abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in sediments of trophic end members of the Laurentian Great Lakes, Erie and Superior. *PLoS ONE* **9**: e97068.
- Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P (2008). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Rev Microbiol* **6**: 245-252.
- Caffrey JM, Bano N, Kalanetra K, Hollibaugh JT (2007). Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J* **1**: 660-662.
- Cao H, Auguet J-C, Gu J-D (2013). Global Ecological Pattern of ammonia-oxidizing archaea. *PLoS ONE* **8**: e52853.
- Carignan R, Planas D, Vis C (2000). Planktonic production and respiration in oligotrophic Shield Lakes. *Limnol Oceanogr* **45**: 189-199.
- Carini SA, Joye SB (2008). Nitrification in Mono Lake, California: Activity and community composition during contrasting hydrological regimes. *Limnol Oceanogr* **53**: 2546-2557.
- Carini SA, McCarthy MJ, Gardner WS (2010). An isotope dilution method to measure nitrification rates in the northern Gulf of Mexico and other eutrophic waters. *Cont Shelf Res* **30**: 1795-1801.
- Carlucci AF, Strickland JDH (1968). The isolation, purification and some kinetic studies of marine nitrifying bacteria. *J Exp Mar Biol Ecol* **2**: 156-166.
- Cavari BZ (1977). Nitrification potential and factors governing the rate of nitrification in Lake Kinneret. *Oikos* **28**: 285-290.
- Christman GD, Cottrell MT, Popp BN, Gier E, Kirchman DL (2011). Abundance, diversity, and activity of ammonia-oxidizing prokaryotes in the Coastal Arctic Ocean in summer and winter. *Appl Environ Microbiol* **77**: 2026-2034.

- Church MJ, Wai B, Karl DM, DeLong EF (2010). Abundances of crenarchaeal amoA genes and transcripts in the Pacific Ocean. *Environ Microbiol* **12**: 679-688.
- Cole JJ, Caraco NF (2001). Emissions of nitrous oxide (N₂O) from a tidal, freshwater river, the Hudson River, New York. *Environ Sci Technol* **35**: 991-996.
- Collos Y, Linley EAS, Frikha MG, Ravail B (1988). Phytoplankton death and nitrification at low temperatures. *Estuar Coast Shelf S* **27**: 341-347.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* **9**: 772-772.
- de Wilde HPJ, de Bie MJM (2000). Nitrous oxide in the Schelde estuary: production by nitrification and emission to the atmosphere. *Mar Chem* **69**: 203-216.
- De'ath G (2012). mvpart: Multivariate partitioning. R package version 1.6-0: Online at <http://CRAN.R-project.org/package=mvpart>.
- Downing JA, Prairie YT, Cole JJ, Duarte CM, Tranvik LJ, Striegl RG *et al* (2006). The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments. *Limnol Oceanogr* **51**: 2388-2397.
- Dray S (2012). [with contributions of P. Legendre & G. Blanchet]. packfor: Forward selection with permutation (Canoco p.46). R package version 0.0-8/r100. : Online at <http://R-Forge.R-project.org/projects/sedar/>.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**: 2194-2200.
- Erguder TH, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W (2009). Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 855-869.
- Fox J, Weisberg S, Bates D, Firth D, Friendly M, Gorjanc G *et al* (2012). car: Companion to Applied regression. R package version 2.0-12: Online at <http://cran.r-project.org/web/packages/car/>
- Francis CA, O'Mullan GD, Ward BB (2003). Diversity of ammonia monooxygenase (amoA) genes across environmental gradients in Chesapeake Bay sediments. *Geobiology* **1**: 129-140.
- Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 14683-14688.

- French E, Kozlowski JA, Mukherjee M, Bullerjahn G, Bollmann A (2012). Ecophysiological characterization of ammonia-oxidizing archaea and bacteria from freshwater. *Appl Environ Microbiol* **78**: 5773-5780.
- Glover HE (1985). The relationship between inorganic nitrogen oxidation and organic carbon production in batch and chemostat cultures of marine nitrifying bacteria. *Arch Microbiol* **142**: 45-50.
- Goreau TJ, Kaplan WA, Wofsy SC, McElroy MB, Valois FW, Watson SW (1980). Production of NO₂⁻ and N₂O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. *Appl Environ Microbiol* **40**: 526-532.
- Grundle DS, Juniper SK (2011). Nitrification from the lower euphotic zone to the sub-oxic waters of a highly productive British Columbia fjord. *Mar Chem* **126**: 173-181.
- Grundle DS, Juniper SK, Giesbrecht KE (2013). Euphotic zone nitrification in the NE subarctic Pacific: Implications for measurements of new production. *Mar Chem* **155**: 113-123.
- Guerrero MA, Jones RD (1996). Photoinhibition of marine nitrifying bacteria. I. Wavelength-dependent response. *Mar Ecol Prog Ser* **141**: 183-192.
- Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704.
- Hall G (1986). Nitrification in lakes. In: Prosser J (ed). *Nitrification*. IRL Press: Oxford. pp 127-156.
- Hall GH, Collins VG, Jones JG, Horsley RW (1978). The effect of sewage effluent on Grasmere (English Lake District) with particular reference to inorganic nitrogen transformations. *Freshwater Biol* **8**: 165-175.
- Hallam SJ, Mincer TJ, Schleper C, Preston CM, Roberts K, Richardson PM *et al* (2006). Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine crenarchaeota. *PLoS Biol* **4**: e95.
- Harrison J, Maranger R, Alexander R, Giblin A, Jacinthe P-A, Mayorga E *et al* (2009). The regional and global significance of nitrogen removal in lakes and reservoirs. *Biogeochemistry* **93**: 143-157.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T-a (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* **22**: 160-174.

- Heiberger R (2014). HH: Statistical analysis and data display: Heiberger and Holland. R package version 3.0-3: Online at <http://CRAN.R-project.org/package=HH>. pp 2.1-29.
- Hiorns WD, Hastings RC, Head IM, McCarthy AJ, Saunders JR, Pickup RW *et al* (1995). Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrosospiras in the environment. *Microbiology* **141**: 2793-2800.
- Horak REA, Horak W, Qin A, Schauer EV, Armbrust A, Ingalls J *et al* (2013). Ammonia oxidation kinetics and temperature sensitivity of a natural marine community dominated by archaea. *ISME J* **7**: 2023-2033.
- Horrigan SG (1981). Primary production under the ross ice shelf, Antarctica. *Limnol Oceanogr* **26**: 378-382.
- Horz H-P, Rotthauwe J-H, Lukow T, Liesack W (2000). Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amoA PCR products. *J Microbiol Meth* **39**: 197-204.
- Karner MB, DeLong EF, Karl DM (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**: 507-510.
- Kester RA, De Boer W, Laanbroek HJ (1997). Production of NO and N₂O by pure cultures of nitrifying and denitrifying bacteria during changes in aeration. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3872-3877.
- Kim O-S, Junier P, Imhoff JF, Witzel K-P (2008). Comparative analysis of ammonia monooxygenase (amoA) genes in the water column and sediment-water interface of two lakes and the Baltic Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **66**: 367-378.
- Knowles R, Lean DRS (1987). Nitrification: a significant cause of oxygen depletion under winter ice. *Can J Fish Aquat Sci* **44**: 743-749.
- Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.
- Koops H-P, Pommerening-Röser A (2001). Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol Ecol* **37**: 1-9.
- Koops H-P, Purkhold U, Pommerening-Röser A, Timmermann G, Wagner M (2006). The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*. Springer New York. pp 778-811.

- Lannbroek H, Bollmann A (2011). Nitrification in inland waters. In: Ward BB, Arp DJ, Klotz MG (eds). *Nitrification*. ASM Press: Washington DC. pp 385-403.
- Lavrentyev P, Gardner W, Johnson J (1997). Cascading trophic effects on aquatic nitrification: experimental evidence and potential implications. *Aquat microb ecol* **13**: 161-175.
- Legendre P (2013). lmodel2: Model II Regression. R package version 1.7-1: Online at <http://CRAN.R-project.org/package=lmodel2>.
- Lehner B, Döll P (2004). Development and validation of a global database of lakes, reservoirs and wetlands. *J Hydrol* **296**: 1-22.
- Lehtovirta-Morley LE, Stoecker K, Vilcinskas A, Prosser JI, Nicol GW (2011). Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 15892-15897.
- Lipschultz F, Zafiriou OC, Wofsy SC, McElroy MB, Valois FW, Watson SW (1981). Production of NO and N₂O by soil nitrifying bacteria. *Nature* **294**: 641-643.
- Lipschultz F, Wofsy SC, Ward BB, Codispoti LA, Friedrich G, Elkins JW (1990). Bacterial transformations of inorganic nitrogen in the oxygen-deficient waters of the Eastern Tropical South Pacific Ocean. *Deep Sea Res* **37**: 1513-1541.
- Martens-Habbena W, Berube PM, Urakawa H, de la Torre JR, Stahl DA (2009). Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea and bacteria.(LETTERS)(Report). *Nature* **461**: 976(976).
- Martens-Habbena W, Stahl DA (2011). Nitrogen metabolism and kinetics of ammonia-oxidizing archaea. In: Martin GK, Lisa YS (eds). *Method Enzymol*. Academic Press. pp 465-487.
- McCarthy JJ, Garside C, Nevins JL (1999). Nitrogen dynamics during the Arabian Sea Northeast Monsoon. *Deep Sea Res Pt II* **46**: 1623-1664.
- McIlvin MR, Altabet MA (2005). Chemical conversion of nitrate and nitrite to nitrous oxide for nitrogen and oxygen isotopic analysis in freshwater and seawater. *Anal Chem* **77**: 5589-5595.
- Merbt SN, Stahl DA, Casamayor EO, Martí E, Nicol GW, Prosser JI (2012). Differential photoinhibition of bacterial and archaeal ammonia oxidation. *FEMS Microbiol Lett* **327**: 41-46.

- Mincer TJ, Church MJ, Taylor LT, Preston C, Karl DM, DeLong EF (2007). Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ Microbiol* **9**: 1162-1175.
- Monteiro M, Séneca J, Magalhães C (2014). The history of aerobic ammonia oxidizers: from the first discoveries to today. *J Microbiol* **52**: 537-547.
- Mosier AC, Allen EE, Kim M, Ferriera S, Francis CA (2012). Genome sequence of “Candidatus Nitrosoarchaeum limnia” BG20, a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon from the San Francisco Bay estuary. *J Bacteriol* **194**: 2119-2120.
- Müller-Neuglück M, Engel H (1961). Photoinaktivierung von Nitrobacter winogradskyi Buch. *Archiv Mikrobiol* **39**: 130-138.
- Mußmann M, Brito I, Pitcher A, Sinninghe Damsté JS, Hatzenpichler R, Richter A *et al* (2011). Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proc Natl Acad of Sci USA* **108**: 16771-16776.
- Neubacher E, Prast M, Cleven E-J, Berninger U-G (2008). Ciliate grazing on Nitrosomonas europaea and Nitrospira moscoviensis: Is selectivity a factor for the nitrogen cycle in natural aquatic systems? *Hydrobiologia* **596**: 241-250.
- Newell SE, Babbín AR, Jayakumar A, Ward BB (2011). Ammonia oxidation rates and nitrification in the Arabian Sea. *Global biogeochem cy* **25**.
- Nicol GW, Leininger S, Schleper C, Prosser JI (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol* **10**: 2966-2978.
- Oksanen J, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R *et al* (2013). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-7: Online at <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Olson RJ (1981). N-15 tracer studies of the primary nitrite maximum. *J Mar Res* **39**: 203-226.
- Oremland R, Capone D (1988). Use of “specific” inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. In: Marshall KC (ed). *Adv Microb Ecol*. Springer US. pp 285-383.
- Ouellet Jobin V, Beisner BE (2014). Deep chlorophyll maxima, spatial overlap and diversity in phytoplankton exposed to experimentally altered thermal stratification. *J Plankton Res* **0**: 1-10.

- Paasche E, Bryceson I, Tangen K (1984). Interspecific variation in dark nitrogen uptake by dinoflagellates¹. *J Phycol* **20**: 394-401.
- Paradis E, Bolker B, Claude J, Cuong H, Desper R, Durant B *et al* (2012). ape: Analyses of phylogenetics and evolution. R package version 3.0-1: Online at <http://cran.r-project.org/web/packages/ape/>.
- Pedneault E, Galand PE, Potvin M, Tremblay J-É, Lovejoy C (2014). Archaeal amoA and ureC genes and their transcriptional activity in the Arctic Ocean. *Sci Rep* **4**.
- Pester M, Schleper C, Wagner M (2011). The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Curr Opin in Microbiol* **14**: 300-306.
- Pester M, Rattei T, Flechl S, Gröngröft A, Richter A, Overmann J *et al* (2012). amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions. *Environ Microbiol* **14**: 525-539.
- Présing M, Preston T, Takátsy A, Spröber P, Kovács A, Vörös L *et al* (2008). Phytoplankton nitrogen demand and the significance of internal and external nitrogen sources in a large shallow lake (Lake Balaton, Hungary). *Hydrobiologia* **599**: 87-95.
- Prosser JI, Nicol GW (2008). Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environ Microbiol* **10**: 2931-2941.
- Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops H-P, Wagner M (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5368-5382.
- Purkhold U, Wagner M, Timmermann G, Pommerening-Röser A, Koops H-P (2003). 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int J Syst Evol Micr* **53**: 1485-1494.
- Qin W, Amin SA, Martens-Habbena W, Walker CB, Urakawa H, Devol AH *et al* (2014). Marine ammonia-oxidizing archaeal isolates display obligate mixotrophy and wide ecotypic variation. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 12504-12509.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria.

- Restrepo-Ortiz CX, Auguet J-C, Casamayor EO (2014). Targeting spatiotemporal dynamics of planktonic SAGMGC-1 and segregation of ammonia-oxidizing thaumarchaeota ecotypes by newly designed primers and quantitative polymerase chain reaction. *Environ Microbiol* **16**: 689-700.
- Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4704-4712.
- Santoro AE, Casciotti KL, Francis CA (2010). Activity, abundance and diversity of nitrifying archaea and bacteria in the central California Current. *Environ Microbiol* **12**: 1989-2006.
- Santoro AE, Buchwald C, McIlvin MR, Casciotti KL (2011). Isotopic signature of N₂O produced by marine ammonia-oxidizing Archaea. *Science* **333**: 1282-1285.
- Schön G, Engel H (1962). Der Einfluß des Lichtes auf Nitrosomonas europaea Win. *Archiv Mikrobiol* **42**: 415-428.
- Schramm A, de Beer D, van den Heuvel JC, Ottengraf S, Amann R (1999). Microscale distribution of populations and activities of Nitrosospira and Nitrospira spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by *in situ* hybridization and the use of microsensors. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3690-3696.
- Seitzinger SP, Kroeze C, Styles RV (2000). Global distribution of N₂O emissions from aquatic systems: natural emissions and anthropogenic effects. *Chemosphere Global Change Sci* **2**: 267-279.
- Small G, Bullerjahn R, Sterner BFN, Beall S, Brovold J, Finlay RML *et al* (2013). Rates and controls of nitrification in a large oligotrophic lake. *Limnol Oceanogr* **58**: 276-286.
- Smith JM, Casciotti KL, Chavez FP, Francis CA (2014). Differential contributions of archaeal ammonia oxidizer ecotypes to nitrification in coastal surface waters. *ISME J* **8**: 1704-1714.
- Soued C, del Giorgio PA, Maranger R (2014 submitted). Variability in N₂O fluxes across boreal aquatic networks.
- Souza AC, Gardner WS, Dunton KH (2014). Rates of nitrification and ammonium dynamics in northeastern Chukchi Sea shelf waters. *Deep Sea Res Pt II* **102**: 68-76.
- Spang A, Hatzenpichler R, Brochier-Armanet C, Rattei T, Tischler P, Spieck E *et al* (2010). Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum thaumarchaeota. *Trends Microbiol* **18**: 331-340.

- Stahl DA, de la Torre JR (2012). Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annu Rev Microbiol* **66**: 83-101.
- Stein LY (2011). Surveying N₂O-producing pathways in bacteria. In: Martin GK (ed). *Methods in Enzymology*. Academic Press. pp 131-152.
- Stephen JR, Chang Y-J, Macnaughton SJ, Kowalchuk GA, Leung KT, Flemming CA *et al* (1999). Effect of toxic metals on indigenous soil β -subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl Environ Microbiol* **65**: 95-101.
- Stewart WDP, Preston T, Peterson HG, Christofi N, Wilkinson WB, Cole JA (1982). Nitrogen cycling in eutrophic freshwaters [and discussion]. *Philos T Roy Soc B* **296**: 491-509.
- Stieglmeier M, Mooshammer M, Kitzler B, Wanek W, Zechmeister-Boltenstern S, Richter A *et al* (2014). Aerobic nitrous oxide production through N-nitrosating hybrid formation in ammonia-oxidizing archaea. *ISME J* **8**: 1135–1146.
- Suzuki I, Dular U, Kwok SC (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J Bacteriol* **120**: 556-558.
- Tamura K, Nei M (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **10**: 512-526.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.
- Teske A, Alm E, Regan JM, Toze S, Rittmann BE, Stahl DA (1994). Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J Bacteriol* **176**: 6623-6630.
- Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk H-P, Schleper C (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* **7**: 1985-1995.
- Trogler WC (1999). Physical properties and mechanisms of formation of nitrous oxide. *Coordin Chem Rev* **187**: 303-327.
- Vajjala N, Martens-Habbena W, Sayavedra-Soto LA, Schauer A, Bottomley PJ, Stahl DA *et al* (2013). Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 1006-1011.

- van der Wielen PWJJ, Voost S, van der Kooij D (2009). Ammonia-oxidizing bacteria and archaea in groundwater treatment and drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4687-4695.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA *et al* (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.
- Vissers EW, Anselmetti FS, Bodelier PLE, Muyzer G, Schleper C, Tourna M *et al* (2013a). Temporal and spatial coexistence of archaeal and bacterial amoA genes and gene transcripts in Lake Lucerne. *Archaea* **2013**: 1-11.
- Vissers EW, Blaga CI, Bodelier PLE, Muyzer G, Schleper C, Sinninghe Damsté JS *et al* (2013b). Seasonal and vertical distribution of putative ammonia-oxidizing thaumarchaeotal communities in an oligotrophic lake. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 515-526.
- Ward BB, Talbot MC, Perry MJ (1984). Contributions of phytoplankton and nitrifying bacteria to ammonium and nitrite dynamics in coastal waters. *Cont Shelf Res* **3**: 383-398.
- Ward BB (1987a). Nitrogen transformations in the Southern California Bight. *Deep Sea Res* **34**: 785-805.
- Ward BB (1987b). Kinetic studies on ammonia and methane oxidation by *Nitrosococcus oceanus*. *Arch Microbiol* **147**: 126-133.
- Ward BB, Zafiriou OC (1988). Nitrification and nitric oxide in the oxygen minimum of the eastern tropical North Pacific. *Deep Sea Res* **35**: 1127-1142.
- Ward BB, Kilpatrick KA, Renger EH, Eppley RW (1989). Biological nitrogen cycling in the nitracline. *Limnol Oceanogr* **34**: 493-513.
- Ward BB, Kilpatrick KA (1990). Relationship between substrate concentration and oxidation of ammonium and methane in a stratified water column. *Cont Shelf Res* **10**: 1193-1208.
- Ward BB (1996). Nitrification and denitrification: Probing the nitrogen cycle in aquatic environments. *Microb Ecol* **32**: 247-261.
- Ward BB (2005). Temporal variability in nitrification rates and related biogeochemical factors in Monterey Bay, California, USA. *Mar Ecol Prog Ser* **292**: 97-109.
- Ward BB (2008). Chapter 5 - Nitrification in Marine Systems. In: Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR, Carpenter EJ (eds). *Nitrogen in the Marine Environment (2nd Edition)*. Academic Press: San Diego. pp 199-261.

- Ward BB (2011a). Measurement and distribution of nitrification rates in the oceans. In: Martin GK (ed). *Methods in Enzymology*. Academic Press. pp 307-323.
- Ward BB (2011b). Nitrification in the ocean. In: Ward BB., Arp DJ, Klotz MG (eds). *Nitrification*. ASM Press: Washington DC. pp 325-345.
- Watson S, McCauley E (2005). Ammonia and nitrate: growth or inhibition? Large-and small-scale patterns in chrysophytes and the potential role of inorganic nitrogen. *Nova Hedwigia*: 231-247.
- Winogradsky S (1890). Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann Inst Pasteur* **4**: 11-12.
- Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, Herfort L, Bleijswijk Jv, Timmers P *et al* (2006). Archaeal nitrification in the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12317-12322.
- Yao H, Gao Y, Nicol GW, Campbell CD, Prosser JI, Zhang L *et al* (2011). Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4618-4625.
- Yool A (2007). The significance of nitrification for oceanic new production. *Nature* **447**: 999.
- Yoshioka T, Saijo Y (1985). Active nitrification in the hypolimnion of Lake Kizaki in early summer. II: Effects of light on nitrification in water. *Arch Hydrobiol* **105**: 1-9.
- Zaikova E, Walsh DA, Stilwell CP, Mohn WW, Tortell PD, Hallam SJ (2010). Microbial community dynamics in a seasonally anoxic fjord: Saanich Inlet, British Columbia. *Environ Microbiol* **12**: 172-191.
- Zeebe RE, Wolf-Gladrow DA (2001). CO₂ in seawater equilibrium, kinetics, isotopes. Elsevier: Amsterdam; New York. From <http://site.ebrary.com/id/10190754> (consulté le 20 mars 2012).

Annexe A : Supplément pour le chapitre 2

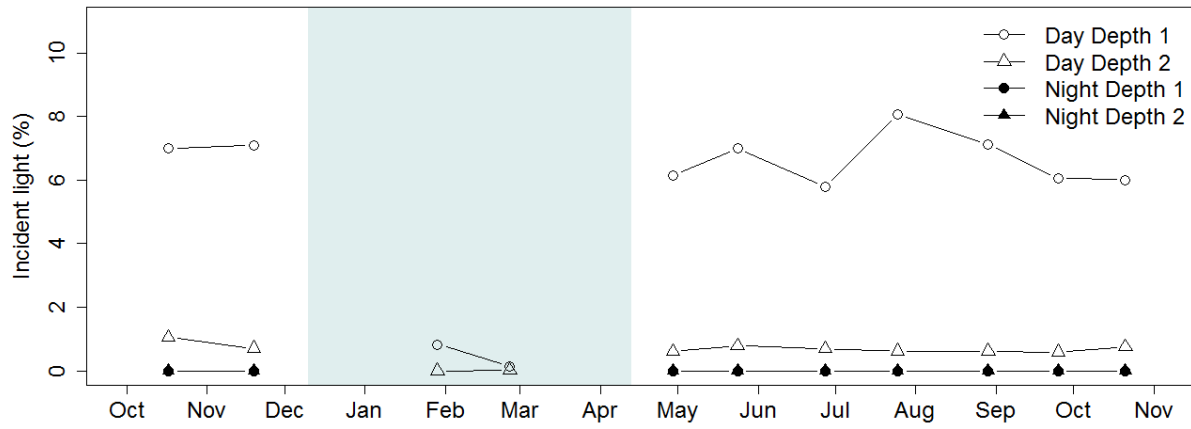


Figure A.1. Temporal variation of light at both depths sampled during day and night. The period where the lake was covered by ice is depicted by a grey rectangle.

Table A.1. Summary of ratio of irradiance at depth z to irradiance at the surface of the lake, irradiance at depth z , temperature of water, dissolved oxygen saturation, dissolved oxygen concentration, pH, ammonium, nitrite and nitrate concentration, ammonia oxidation rate, and delta nitrous oxide concentration in water for the sampled period of October 2011 to October 2012 in Lake Croche. Irradiance measurements referred to as Photosynthetically Active Radiation (PAR). Dissolved oxygen saturations were corrected for local pressure. The value of ammonia oxidation rate in italic was excluded from the statistical model because of likely overestimation. NA = no data.

Site	Date	Time	Depth	$I_z:I_0$	I_z	Temp	DO saturation	DO	pH	NH_4^+	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$	Ammonia oxidation rate	$\Delta \text{N}_2\text{O}$
	(yy-mm-dd)	(00:00)	(m)		($\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$)	($^{\circ}\text{C}$)	(%)	(mg L^{-1})		($\mu\text{mol L}^{-1}$)	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	($\text{nmol L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	(nmol L^{-1})
D_D1_oct11	2011-10-17	15:37	3.5	7.00	24.27	12.71	89.06	8.90	6.56	0.45	0.08	0.00	NA
D_D2_oct11	2011-10-17	15:37	6.25	1.06	2.12	12.30	78.55	7.92	6.34	0.37	0.01	2.73	NA
N_D1_oct11	2011-10-17	22:40	3.5	0.00	0.00	12.44	92.25	9.26	6.94	0.46	0.03	184.92	NA
N_D2_oct11	2011-10-17	22:40	6.25	0.00	0.00	12.42	92.41	9.31	6.84	0.40	0.05	0.00	NA
D_D1_nov11	2011-11-19	13:40	3	7.10	22.80	5.54	86.60	10.48	6.22	2.82	0.49	NA	NA
D_D2_nov11	2011-11-19	13:40	6.25	0.70	2.45	5.52	85.76	10.36	6.32	2.47	0.46	19.80	NA
N_D1_nov11	2011-11-19	00:40	3	0.00	0.00	5.50	87.33	10.59	6.73	2.53	0.47	98.91	NA
N_D2_nov11	2011-11-19	00:40	6.25	0.00	0.00	5.51	86.44	10.50	6.65	2.84	0.55	171.08	NA
D_D1_jan12	2012-01-29	13:40	3	0.83	1.91	3.69	90.82	11.43	6.31	2.72	1.33	332.82	NA
D_D2_jan12	2012-01-29	14:00	6	0.00	0.00	4.04	84.31	10.50	6.21	3.36	1.66	91.00	NA
D_D1_fev12	2012-02-26	13:20	3	0.13	1.62	3.60	70.83	9.06	7.60	2.69	1.97	189.60	4.55
D_D2_fev12	2012-02-26	13:15	6	0.01	0.14	4.04	65.86	8.32	6.90	2.62	2.22	311.32	5.57
D_D1_apr12	2012-04-29	11:30	3.5	6.15	93.97	6.35	81.19	9.63	7.70	1.61	3.27	62.97	0.80
D_D2_apr12	2012-04-29	11:40	6.5	0.61	9.47	6.17	79.53	9.49	7.51	1.48	3.33	42.23	0.95
N_D1_apr12	2012-04-29	22:20	3.5	0.00	0.00	6.72	83.28	9.75	7.55	1.30	3.27	71.01	NA
N_D2_apr12	2012-04-29	22:35	6.5	0.00	0.00	6.50	82.13	9.68	7.38	1.35	3.34	71.85	1.09

Dynamique saisonnière des communautés nitrifiantes

D_D1_may12	2012-05-24	11:00	3.5	7.00	114.20	10.75	110.31	11.83	7.22	0.47	2.04	36.17	0.63
D_D2_may12	2012-05-24	11:15	7	0.79	13.17	6.70	90.28	10.63	6.84	1.89	3.12	178.97	-1.35
N_D1_may12	2012-05-24	23:00	3.5	0.00	0.00	10.45	113.39	12.17	7.49	0.00	2.57	0.00	-0.27
N_D2_may12	2012-05-24	23:20	7	0.00	0.00	6.67	91.25	10.75	6.96	2.39	3.15	167.26	-2.72
D_D1_jun12	2012-06-27	11:35	3.5	5.79	35.71	14.95	117.42	11.32	7.47	0.13	0.02	34.89	0.11
D_D2_jun12	2012-06-27	11:45	7	0.69	3.78	7.32	73.85	8.35	6.68	1.91	2.33	579.51	-0.45
N_D1_jun12	2012-06-27	22:40	3.5	0.00	0.00	14.81	110.88	10.69	7.70	0.08	0.01	22.40	0.44
N_D2_jun12	2012-06-27	23:00	7	0.00	0.00	7.24	63.27	7.24	6.72	2.89	2.49	199.49	-0.18
D_D1_jul12	2012-07-25	11:20	3.5	8.07	122.60	21.05	105.31	9.02	7.28	0.66	0.01	9.04	0.29
D_D2_jul12	2012-07-25	11:37	7	0.62	9.77	8.22	60.33	6.77	6.52	0.70	1.66	21.24	-1.46
N_D1_jul12	2012-07-25	22:32	3.5	0.00	0.00	21.01	110.78	9.43	7.17	0.47	0.01	133.27	0.68
N_D2_jul12	2012-07-25	22:53	7	0.00	0.00	8.15	61.00	6.86	6.45	0.20	1.94	22.99	-0.61
D_D1_aug12	2012-08-29	12:56	3.5	7.12	91.66	20.87	98.91	8.49	6.99	0.05	0.06	3.11	0.20
D_D2_aug12	2012-08-29	12:40	6.5	0.62	8.30	9.43	33.14	3.42	5.82	0.04	0.06	9.70	-1.55
N_D1_aug12	2012-08-29	00:35	3.5	0.00	0.00	21.21	100.16	8.52	6.99	0.49	0.06	83.64	-0.15
N_D2_aug12	2012-08-29	00:50	6.5	0.00	0.00	9.48	29.21	3.19	5.82	0.75	0.14	51.89	-2.13
D_D1_sep12	2012-09-25	11:42	3	6.06	59.53	15.44	92.38	8.83	7.43	0.35	0.11	65.31	0.38
D_D2_sep12	2012-09-25	11:51	6.5	0.59	6.25	11.85	27.35	2.82	6.30	0.30	0.05	0.00	-0.93
N_D1_sep12	2012-09-25	22:33	3	0.00	0.00	15.50	86.23	8.25	7.26	0.22	0.07	0.00	-0.37
N_D2_sep12	2012-09-25	22:08	6.5	0.00	0.00	12.64	35.10	3.57	6.23	0.62	0.13	73.46	-1.10
D_D1_oct12	2012-10-21	12:08	3	6.00	3.21	10.15	94.44	10.10	7.27	1.33	0.23	59.50	-1.50
D_D2_oct12	2012-10-21	11:47	6	0.76	0.78	9.84	88.03	9.48	6.90	1.39	0.16	18.33	-1.44
N_D1_oct12	2012-10-21	22:20	3	0.00	0.00	10.01	85.98	9.25	7.09	1.19	0.18	0.00	-1.06
N_D2_oct12	2012-10-21	21:48	6	0.00	0.00	10.01	83.68	9.05	6.78	1.42	0.21	0.00	-1.18

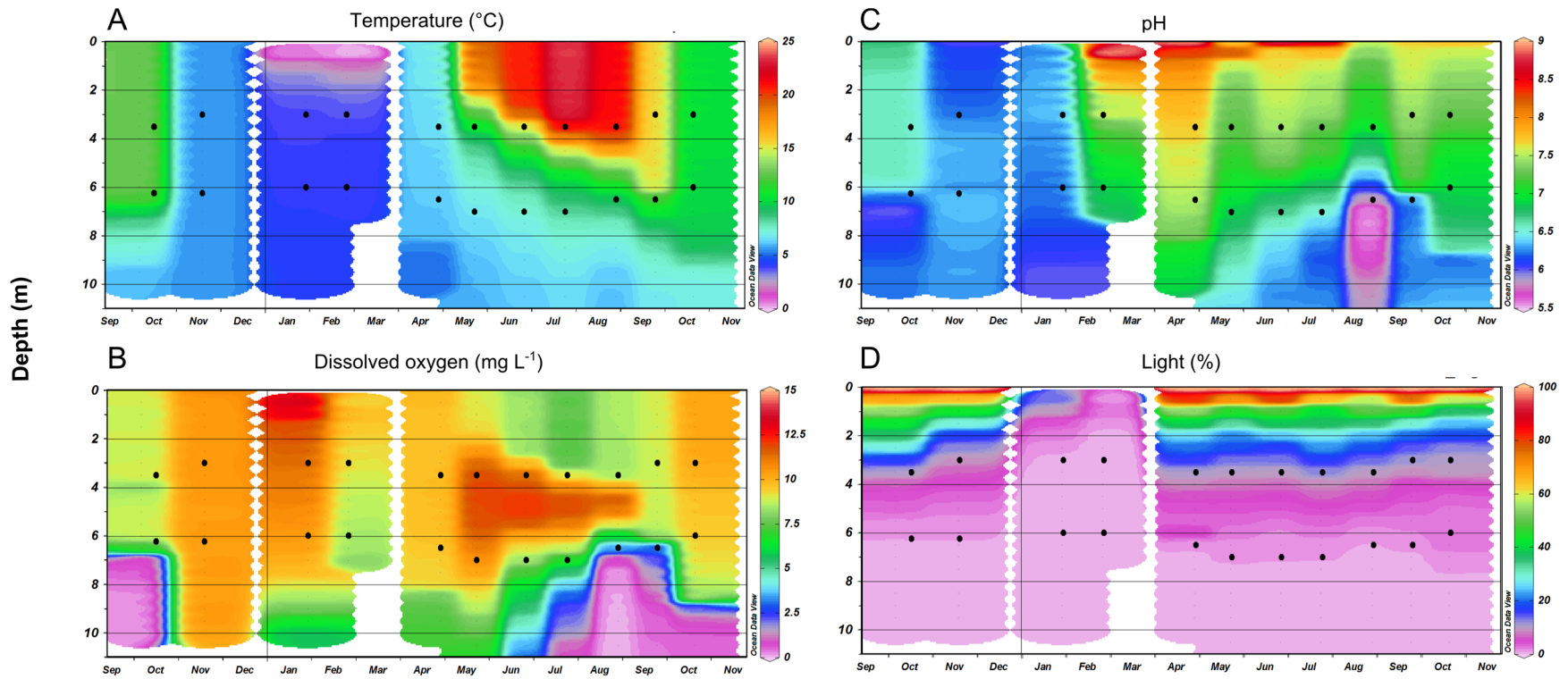


Figure A.2. Annual variation in (A) water temperature, (B) dissolved oxygen, (C) pH and (D) light through the day. Sampled depths are represented by black dots. The lake was covered by ice and snow from December to April.

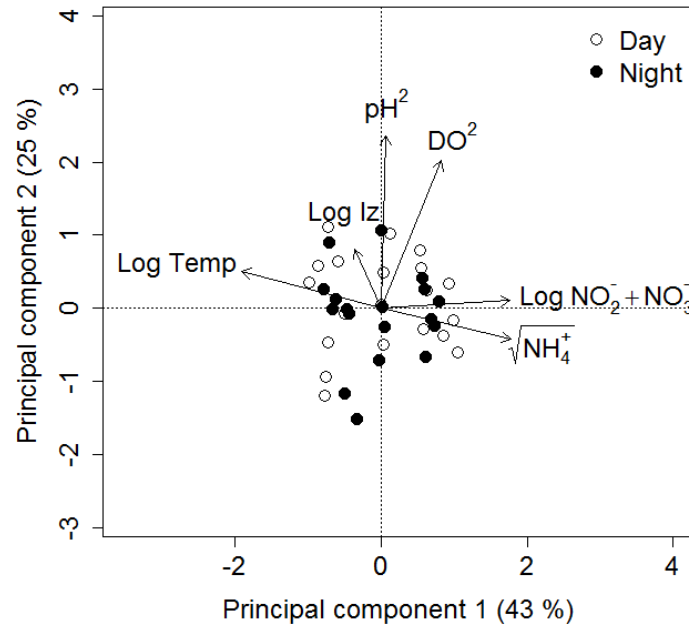


Figure A.3. Principal component analysis (PCA) of environmental factors at both depths sampled during day and night, scaling type 1 (=distance biplot). The choice of symbols was aimed to display any diel pattern of the environmental factors for all the dataset (=38 samples)