

## ETUDE RELATIVE AUX PICOCYANOBACTÉRIES

### ABOUT PICOCYANOBACTERIA

CAMPAGNE 2016

PAR

**Stéphan JACQUET**

INRA CARRTEL, 75 avenue de Corzent, 74200 Thonon-les-Bains, France

#### **RÉSUMÉ**

*Les picocyanobactéries sont une composante du phytoplancton ayant été négligée jusqu'alors en raison de leur petite taille (<2-3  $\mu\text{m}$ ). La distribution et la dynamique de cette communauté est proposée à partir de l'analyse de leur abondance par cytométrie en flux. L'étude portant sur les 3 dernières années, de 2014 à 2016 inclus, révèle de fortes abondances dépassant en période estivale  $10^5$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ . La biomasse relative de cette communauté, représentative majoritaire du picophytoplancton, reste modeste comparativement au nano- et microphytoplancton, ne dépassant pas 10% en moyenne à l'échelle de l'année. Toutefois, à certaines périodes de l'année et à certaines profondeurs la biomasse des picocyanobactéries peut égaler voire dépasser celle des formes planctoniques plus grosses. L'importance fonctionnelle de ce compartiment biologique est aussi révélée au travers de la mesure de production primaire révélant que la fraction picoplanctonique peut être très importante.*

#### **ABSTRACT**

*Picocyanobacteria are a component of the phytoplankton having been neglected until then because of their small size (< 2-3  $\mu\text{m}$ ). Distribution and dynamics of this community is proposed based on the analysis of their abundance by flow cytometry. The study on the last 3 years, from 2014 to 2016, reveals high abundances of this community exceeding  $10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  during the summer. The relative biomass of this major representative community of the picoplankton remains modest compared to the nano - and microphytoplankton, not more than 10% on average across the year. However, at certain times of the year and to certain depths the picoplanktonic biomass can match or even exceed that of the larger planktonic forms. The functional importance of this biological compartment is also revealed through primary production measurements revealing that the picoplanktonic fraction can be very important.*

## 1. INTRODUCTION

Les dénombrements phytoplanctoniques effectués en microscopie dans le cadre du suivi écologique des lacs ne permettent pas d'identifier et quantifier précisément la part des espèces de très petite taille (appartenant au picoplancton) qui incluent notamment et majoritairement les picocyanobactéries. Ces dernières sont des espèces unicellulaires de cyanobactéries de taille  $<3 \mu\text{m}$ , à priori non toxiques, qui possèdent des avantages compétitifs sur les plus grosses cellules (vis-à-vis de l'utilisation des ressources nutritives et de la lumière, typiquement).

Les picocyanobactéries sont prédominantes au sein du picophytoplancton et particulièrement bien représentées dans les grands lacs péri-alpins (Personnic *et al.* 2009, Domaizon *et al.* 2013, Zhong *et al.* 2013, Jacquet *et al.* 2016, Perga *et al.* 2016). D'autres formes picoplanctoniques, appartenant aux eucaryotes (e.g. *Chlorella* spp), sont également présentes et souvent dénombrées comme un tout et inclus dans le nanophytoplancton. Dans la suite de ce rapport, seules les picocyanobactéries sont prises en compte.

Dans les écosystèmes pauvres à moyennement riches en nutriments, les picocyanobactéries sont toujours observées et susceptibles de participer significativement, au moins à certains moments de l'année et en zone épilimnique, à la production primaire totale, et donc au soutien de la production secondaire zooplanctonique (Ammini *et al.* 2014).

Pour donner un ordre d'idées, les données acquises par S. Jacquet (INRA CARRTEL) sur la période s'étalant de 2003 à 2016, montrent que la proportion des picocyanobactéries (en termes de biomasse) fluctue entre 2,5 et 43,2% de la biomasse phytoplanctonique totale dans le lac d'Annecy mais n'excède pas 14% au lac du Bourget. La proportion de ce groupe peut occasionnellement être équivalente, voire dépasser celle des formes nano- et microphytoplanctoniques, en particulier au début du printemps et au milieu de l'été. Les picocyanobactéries sont par ailleurs susceptibles de réagir positivement au réchauffement de la masse d'eau, y compris en système oligo-mésotrophe.

Prendre en compte la structure en taille des communautés phytoplanctonique (pico-, nano-, microphytoplancton) dans la compréhension du fonctionnement écologique des milieux aquatiques est donc particulièrement pertinent, le picoplancton étant susceptible d'être un indicateur trophique, fonctionnel et/ou en réponse aux changements globaux (e.g. la température).

Il est proposé au sein de ce chapitre de décrire l'évolution (i) des abondances de la communauté picocyanobactérienne dans le Léman, considérées à 6 profondeurs différentes (de la surface à 50 m de profondeur) et mises en relation avec les principaux facteurs environnementaux pour l'année 2016, (ii) des abondances moyennes des picocyanobactéries au sein du lac (intégrées entre la surface et 18 m de profondeur) permettant de révéler leur importance quantitative et leur dynamique depuis 2014 inclus comparativement au phytoplancton total et (iii) la proportion en terme de biomasse du pico-, nano- et microphytoplancton, et ce, aussi, comparativement aux lacs du Bourget et d'Annecy pour révéler et comparer l'importance du compartiment picophytoplanctonique au sein de ces lacs. De plus, quelques données sont présentées sur la part relative de la fraction picoplanctonique à la production phytoplanctonique totale.

## 2. METHODES

### *Cytométrie en flux*

Les abondances picocyanobactériennes dans le Léman sont mesurées aux profondeurs suivantes : 2.5, 10, 15, 20, 30 et 50 m ainsi que sur un échantillon d'eau intégré 0-18 m (en lien avec le suivi phytoplanctonique classique –Rimet 2017).

L'analyse de ce compartiment biologique est rendu possible grâce à la cytométrie en flux, une technique qui permet de compter et étudier rapidement de nombreuses caractéristiques d'un grand nombre de cellules ou particules (plusieurs dizaines de milliers) placées en suspension dans un liquide et qui vont être considérées une par une. Empruntée au domaine médical et appliquée à l'Océanographie (dès les années 1985), la cytométrie en flux a notamment permis de découvrir l'organisme (procaryote) photosynthétique le plus petit et le plus abondant de l'océan mondial (e.g. *Prochlorococcus*, Chisholm *et al.* 1988) et aussi le plus petit eucaryote photosynthétique, *Ostreococcus tauri* (Courties *et al.* 1994). Depuis cette époque, cette technique est devenue incontournable et constitue un outil d'analyse rapide et fiable particulièrement bien adapté au comptage et à l'étude des petits organismes phytoplanctoniques, bactériens et viraux en milieux marin et d'eau douce. Le principe de fonctionnement est basé sur la mise en suspension des cellules ou particules que l'on veut étudier dans un milieu liquide. Les cellules sont poussées par un fluide liquide qui est de l'eau milliQ

par un système de pompe et envoyées une à une (après leur alignement) devant un (ou plusieurs) faisceau(x) laser qui permet(tent), en plus de les compter, de mesurer ou d'évaluer certains paramètres cellulaires : taille, volume, granulométrie, fluorescence... Différents paramètres vont donc être obtenus : la lumière diffractée mesurée en face du rayon laser permet d'évaluer la taille des cellules (FSC) ; la lumière diffractée, mesurée sur le côté à 90° (SSC) donne une mesure de la granularité de la cellule qui correspond à la complexité de la cellule (densité des organites, des irrégularités internes ou de surface). Ces deux paramètres (FSC et SSC) sont donc globalement proportionnels à la taille et à la complexité des cellules. Cela permet un premier tri des catégories cellulaires, mais ne suffit pas pour une reconnaissance précise. Pour le phytoplancton, la chlorophylle, la phycocyanine ou encore la phycoérythrine sont des pigments qui permettent de discriminer différentes populations (Fig. 1). Les intensités lumineuses mesurées sont très faibles, les détecteurs utilisés sont des photomultiplicateurs. L'appareil est relié à un ordinateur qui enregistre les données et affiche les résultats des mesures. L'analyse finale peut être opérée sur son propre PC à partir de logiciels dédiés.

#### Analyse statistique

Une analyse en composantes principales ou ACP est proposée à partir d'un nombre limité de variables prises aux profondeurs suivantes (2.5, 10, 15, 20, 30 et 50 m) afin de déterminer les facteurs principaux intervenant dans la distribution et dynamique observées de la communauté des picocyanobactéries. Le seuil de significativité des corrélations a été fixé à 99%.

#### Production primaire

La production primaire (qui correspond à la synthèse de matière organique par unité de volume et de temps) réalisée par le phytoplancton est estimée à partir de la méthode au carbone 13 (isotope stable). Brièvement, des échantillons ont été prélevés à 2.5, 10 et 15 m, divisés en deux et une partie a été filtrée à travers un filtre GF/D pour ne conserver que la fraction picoplanctonique <3 µm (Fig. 2). Les échantillons ont été incubés avec un volume précis d'une solution de traceur isotopique (le carbone 13) pendant 4 à 5 heures en moyenne à leur profondeur respective de prélèvement pour évaluer la vitesse de production du carbone par les micro-algues dans le lac. L'analyse a été effectuée par un laboratoire Canadien (GEOTOP, Université du Québec à Montréal, <http://www.geotop.ca>) et les résultats analysés par le laboratoire INRA de Thonon-les-Bains.

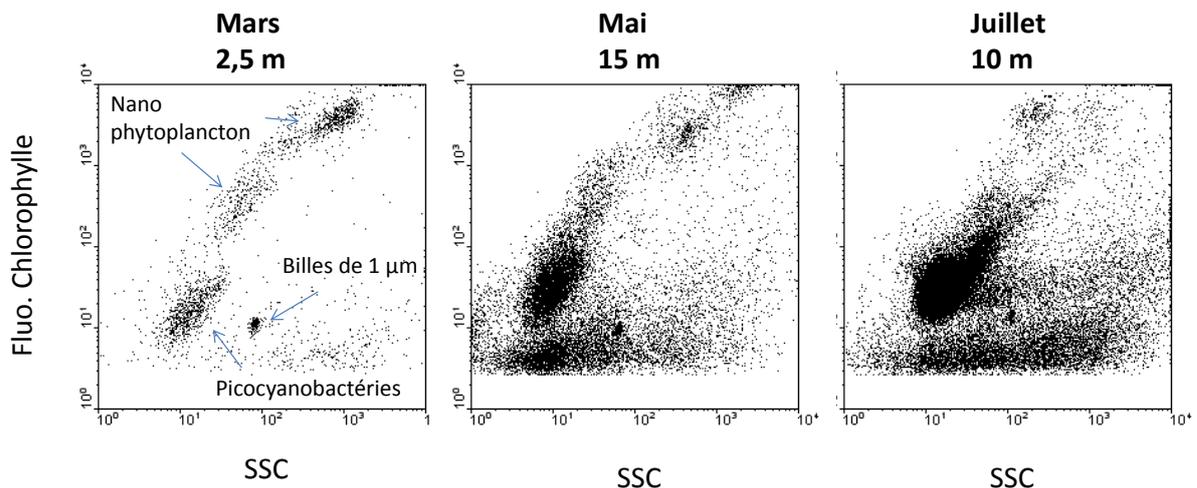


Figure 1 : Exemples de cytogrammes (représentations biparamétriques) révélant notamment la communauté des picocyanobactéries à différentes profondeurs et dates dans le Léman. SSC signifie side scatter et correspond à un paramètre relatif à la taille, à la forme et à l'indice de réfraction des cellules.

Figure 1 : Examples of cytograms (biparametric representations) showing the picocyanobacterial community for different depths at different periods of the year in Lake Geneva. SSC corresponds to Side SCatter and is a proxy of cell size, shape and refractive index.

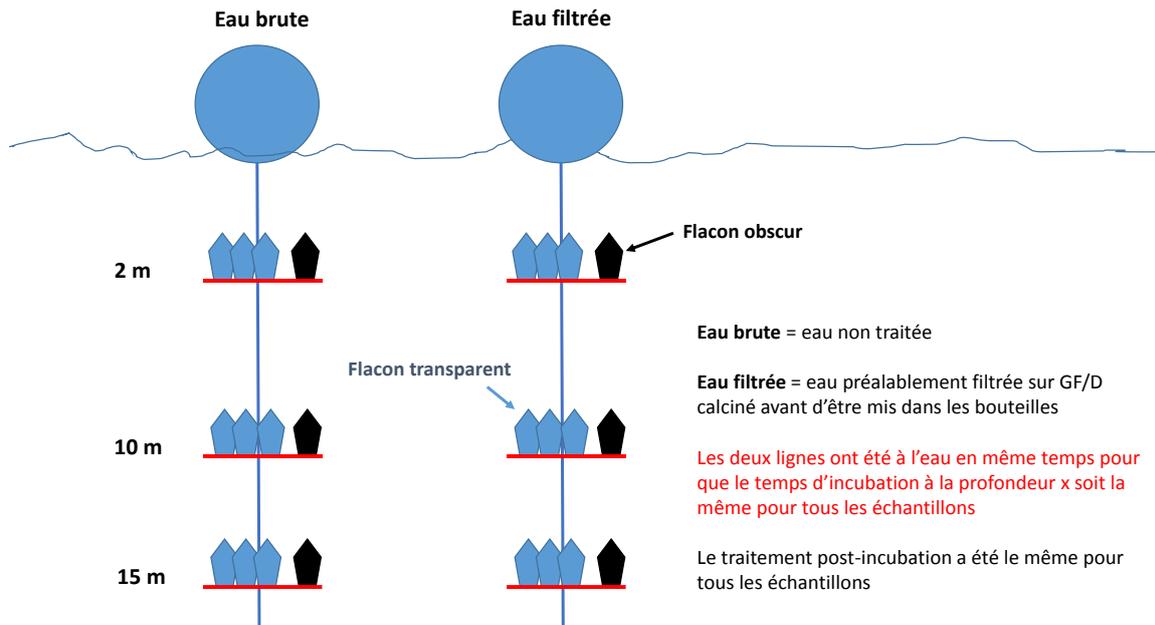


Figure 2 : Schéma représentant les lignes de mouillage avec les supports et bouteilles remplies d'eau marquée avec le carbone 13 pour la mesure de production primaire totale et fractionnée, à différentes profondeurs.

Figure 2 : Schematic view of the system deployed to measure simultaneously total or fractionated primary production at different depths using the <sup>13</sup>C method.

### 3. RÉSULTATS POUR L'ANNÉE 2016

La dynamique de la communauté picocyanobactérienne révèle une saisonnalité marquée avec des concentrations cellulaires augmentant pendant le printemps et l'été, avant de diminuer à l'automne et en hiver. Les valeurs maximales ont été observées fin août, début septembre avec plus de  $6 \times 10^5$  cellules/mL (Fig. 3). En 2016, les concentrations cellulaires les plus élevées (i.e.  $>10^5$  cellules/mL) ont d'abord été enregistrées à 10 et 15 m fin juin début juillet puis à 2,5 et 10 m pendant l'été (juillet, août et septembre).

Pour l'année 2016, la proportion des picocyanobactéries en termes de biomasse a été de 10.1 %, contre 23.4 % pour le nano- et 66,5 % pour le microphytoplancton. Comparativement, les proportions picocyanobactériennes ont été de 7.0 % et 12.5 % aux lacs du Bourget et d'Annecy, respectivement.

Dans le détail, les picocyanobactéries ont représenté jusque 40% de la biomasse à la fin du mois d'août et au début de mois de décembre sur la tranche d'eau intégrée 0-18 m. D'autres périodes de l'année où il a été représenté de manière significative ont été mi-avril (20,4%) et juillet (entre 14 et 24%).

Les fortes abondances et l'importance relative de la fraction des picocyanobactéries au sein du phytoplancton suggèrent que ces dernières puissent jouer un rôle important dans le fonctionnement microbologique et trophique du Léman. Ceci a été confirmé au travers de la mesure d'activité de ce compartiment via la production primaire en fractionnant la communauté phytoplanctonique. Le Tableau 1 résume pour différentes profondeurs (2, 10, 15 et 20 m) et pour 8 moments de l'année (entre avril et décembre) le pourcentage de production attribuable à la fraction picoplanctonique (incluant potentiellement d'autres formes picoplanctoniques que les cyanobactéries) et ce pour les 3 grands lacs.

Tableau 1 : Valeurs moyennées en % de la contribution du picophytoplancton à la production primaire totale mesurée à 3 profondeurs et à 8 périodes de l'année pour les 3 lacs, Annecy, Bourget, Léman.

Table 1 : Mean values in % of picophytoplankton contribution to total primary production measured at 3 different depths and 8 dates in Lakes Annecy, Bourget and Geneva.

	Moy à 2,5 m	Moy à 10 m	Moy à 15 m
<b>ANNECY</b>	67,1	61,3	58,7
<b>BOURGET</b>	32,1	40,7	74,6
<b>LEMAN</b>	27,3	87,7	88,1

Ce résultat corrobore des résultats obtenus par le passé qui avait déjà montré une forte contribution potentielle du picophytoplancton (incluant majoritairement les picocyanobactéries et potentiellement d'autres formes de type *chlorella*-like) à la production primaire globale du Léman (Ammini *et al.* 2014).

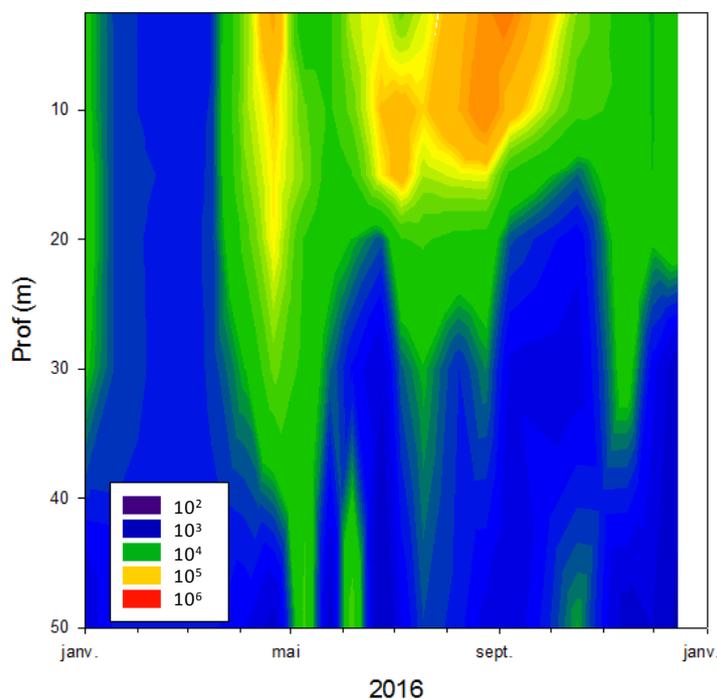


Figure 3 : Distribution et dynamique des picocyanobactéries (en cellules / mL) en 2016 entre la surface et 50 m de profondeur dans le Léman.

Figure 3 : Distribution and dynamics of picocyanobacteria (in cells / mL) in 2016 between surface and 50 m deep in Lake Geneva.

Une analyse en composantes principales pour déterminer les liens existant entre certains facteurs environnementaux et la dynamique et distribution de cette communauté (notée « picocyanos » ci-dessous) a été conduite pour l'année 2016 (Fig. 4). La variance totale expliquée à partir des deux principaux axes est très élevée, soit 71.6 %. On constate que la température (notée T°C) est un facteur clef ( $r=0,75$  ;  $p<0,01$ ), ce que des expériences au laboratoire avec des cultures de picocyanobactéries isolées des grands lacs péri-alpins ont confirmé avec un optimum de croissance entre 20 et 25°C (Reymann & Jacquet non publié). Un autre facteur déterminant est l'éclairement tel que révélé par la valeur du PAR (Photosynthetic Active Radiation) ici (0,63 ;  $p<0,01$ ). Comme pour l'ensemble de la communauté phytoplanctonique, plus la lumière tend à manquer et plus l'abondance des picocyanobactéries diminue. Là encore, des expériences au laboratoire ont toutefois révélé que la qualité de la lumière est primordiale et que les picocyanobactéries se développent très bien en profondeur grâce à leur capacité à utiliser la lumière verte, de par leur richesse en phycoérythrine, un pigment accessoire collecteur de photons dans cette gamme de longueur d'onde (Jacquet non publié).

Certains nutriments semblent être aussi importants au regard (i) de la forte relation positive des picocyanobactéries avec l'ammonium (notées NH<sub>4</sub>) pouvant traduire la consommation de cette ressource par cette communauté ( $r=-0,68$  ;  $p<0,01$ ), (ii) de la forte relation négative avec les phosphates (notés PO<sub>4</sub>) dont l'interprétation est plus compliquée, car ce type de relation est aussi trouvé avec les silicates dont les picocyanobactéries n'ont à priori pas besoin. L'ensemble de ces résultats souligne fortement le besoin de la mise en place d'études expérimentales au laboratoire à partir de cultures afin d'apprécier l'effet des différents nutriments sur la croissance des picocyanobactéries.

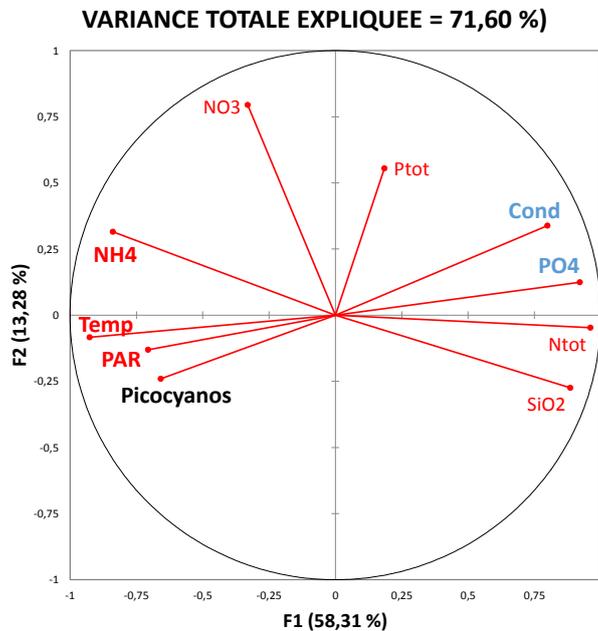


Figure 4 : Analyse en composantes principales (ACP) effectuée avec quelques paramètres sur l'ensemble de l'année 2016.

Figure 4 : Principal Component Analysis with a selection of a few parameters in 2016.

Une seconde ACP a été réalisée (non montré) en retirant les paramètres SiO<sub>2</sub> et azote totale mais considérant en plus une classe de prédateurs unicellulaires connue et potentielle des picocyanobactéries : les ciliés. Les abondances de ces derniers ayant été obtenues sur la strate d'eau intégrée 0-18 m, l'ensemble des autres valeurs a été moyenné sur cette tranche d'eau, pour permettre l'analyse. De manière un peu surprenante, toutefois, cette analyse n'a pas révélé de relations privilégiées entre les deux communautés.

#### 4. EVOLUTION DEPUIS 2014

Les concentrations annuelles moyennées des picocyanobactéries sur la zone 2.5-20 m ou 0-18 m dépassent régulièrement les 10<sup>5</sup> cellules/mL. Ces fortes valeurs sont toujours enregistrées sur la période printemps-été, les concentrations maximales étant généralement observées en juillet-août. (Fig. 5).

En 2016, on observe une période de développement plus étroite et concentrée sur la période estivale et l'abondance estivale a aussi été plus élevée que les deux années précédentes. Les raisons à cette dynamique restent à être expliquées.

De plus, la distribution des picocyanobactéries semble avoir été plus concentrée dans la zone épilimnique comparativement aux deux années précédentes (Fig. 6). Les raisons à cette distribution restent également à être expliquées.

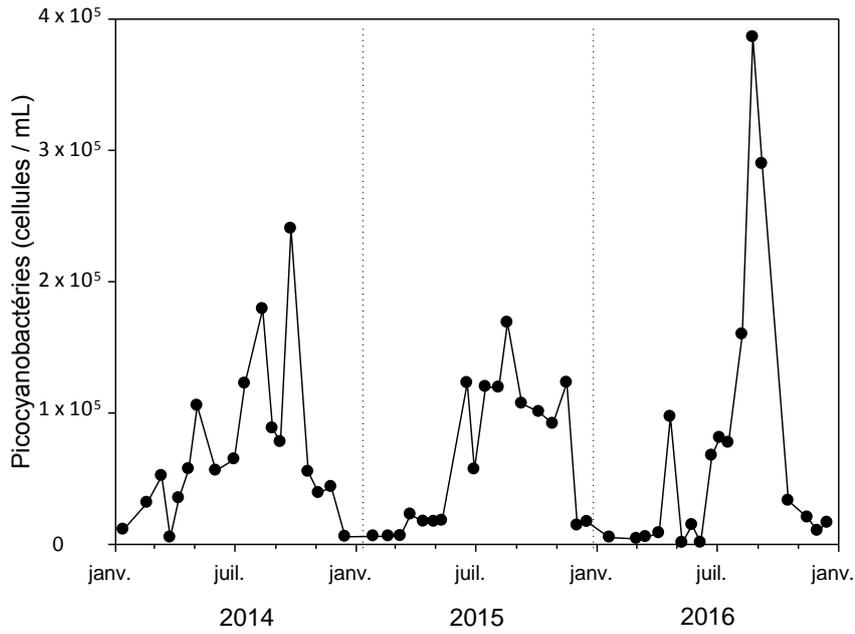


Figure 5 : Evolution des concentrations de picocyanobactéries (en cellules / mL) moyennées entre 2.5 et 20 m entre 2014 et 2016 inclus.  
Figure 5 : Mean values of picocyanobacterial concentrations (in cells / mL) between 2.5 and 20 m depth from 2014 to 2016.

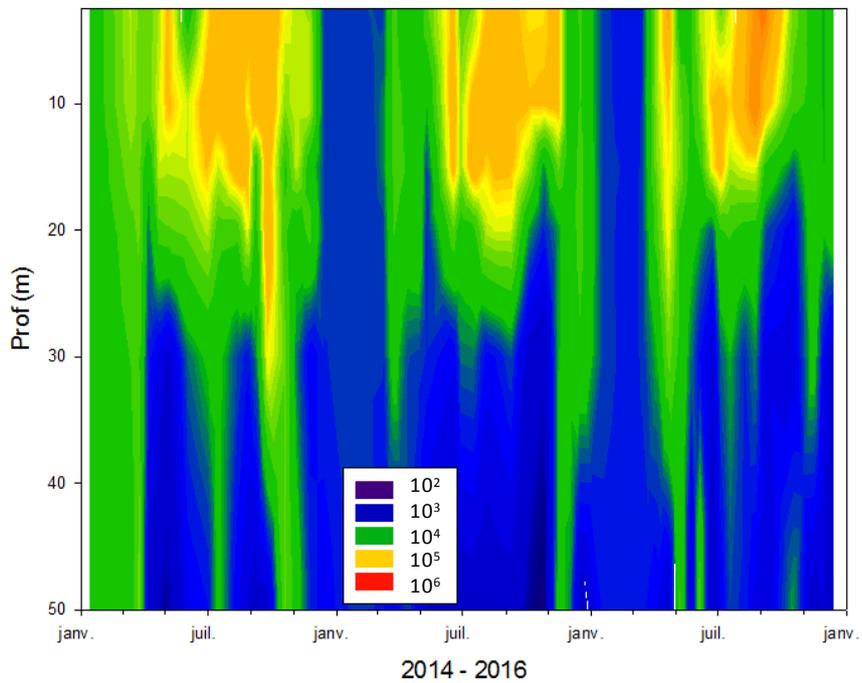


Figure 6 : Evolution des concentrations de picocyanobactéries entre 2.5 et 50 m entre 2014 et 2016 inclus.  
Figure 6 : Picocyanobacterial concentrations between 2.5 and 50 m depth from 2014 to 2016.

Sur la période de 2014 à 2016, la proportion (en termes de biomasse) des picocyanobactéries fluctue entre 5,6 (en 2014) et 10,1% (en 2016) révélant de fortes disparités entre année (Fig. 7). L'année 2016 semble caractérisée par une proportion significativement plus élevée que les deux années précédentes. Le suivi à long terme de cette communauté permettra de confirmer ou pas cette tendance.

La comparaison avec les deux autres lacs permet de constater, sur la période 2014-2016, une plus forte concordance entre les lacs Léman et du Bourget, comparativement à Annecy plus oligotrophe et restauré depuis plus longtemps (Fig. 8).

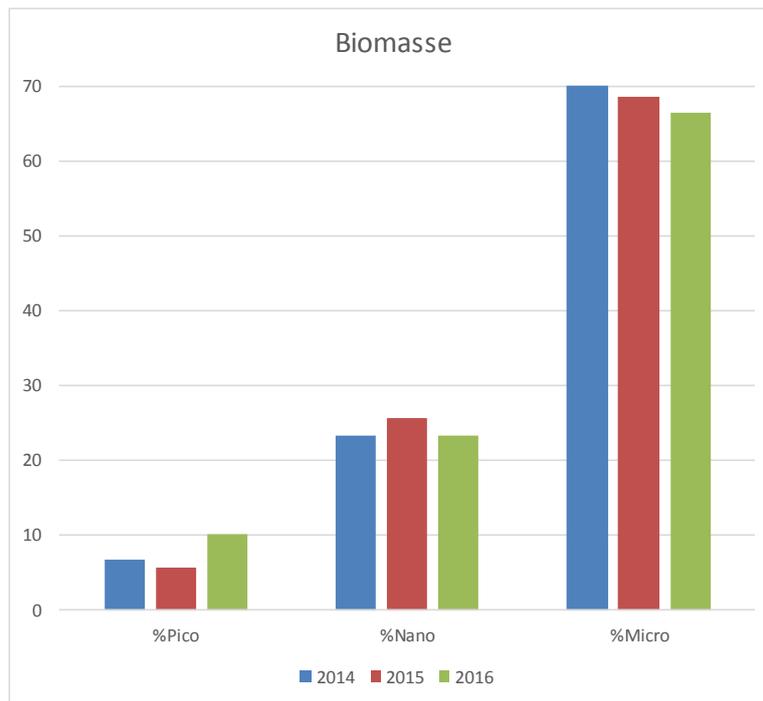


Figure 7 : Evolution de la proportion (en %) de biomasse des compartiments pico-, nano- et microphytoplanctoniques dans le Léman pour la période 2014-2016.

Figure 7 : Evolution of the average proportion (in %) of the pico-, nano- and microphytoplankton biomass in Lake Geneva for the period 2014-2016.

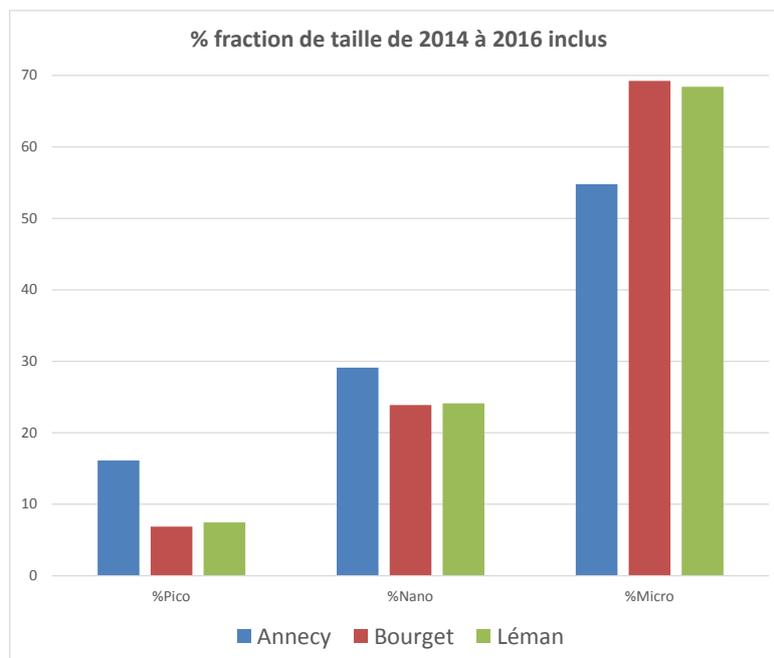


Figure 8 : Evolution de la proportion (en %) de biomasse des compartiments pico-, nano- et microphytoplanctoniques dans les lacs Léman, d'Annecy et du Bourget pour la période 2014-2016.

Figure 8 : Evolution of the average proportion (in %) of the pico-, nano- and microphytoplankton biomass in Lakes Annecy, Bourget and Geneva for the period 2014-2016.

## 5. CONCLUSIONS

Le picophytoplancton, majoritairement représenté par les picocyanobactéries, est une composante importante du phytoplancton présent dans le Léman. En plus de son rôle fonctionnel dans la production primaire globale de l'écosystème ou en tant que communauté proie potentielle pour le zooplancton uni- et pluricellulaire, le suivi détaillé de ce compartiment sur le long terme pourrait constituer un indicateur de l'évolution du statut trophique de l'écosystème mais aussi de sa réponse au réchauffement climatique, c'est-à-dire à l'augmentation des températures des eaux de surface du Léman.

## BIBLIOGRAPHIE

- Ammini P, Zhong X, Angia Sriram PR, Jacquet S. 2014. Dynamics of auto- and heterotrophic picoplankton and associated viruses in Lake Geneva. *Hydrology and Earth System Sciences Discussion* 18, 1073-1084
- Chisholm SW, Olson RJ, Zettler ER, Goericke R, Waterbury JB, Welschmeyer NA. 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* 334, 340-343
- Courties C, Vaquer A, Trousselier M, Lautier J, Chrétiennot-Dinet MJ, Neveux J, Machado C, Claustre H. 1994. Smallest eukaryotic organism. *Nature* 370, 255
- Domaizon I, Savichtcheva O, Debroas D, Arnaud F, Villar C, Pignol C, Alric B, Perga ME. 2013. DNA from lake sediments reveals the long-term dynamics and diversity of *Synechococcus* assemblages. *Biogeosciences* 10, 3817-3838
- Jacquet S, Barbet D, Barbier C, Cachera S, Colon M, Espinat L, Girel C, Guillard J, Hamelet V, Hustache JC, Lacroix D, Laine L, Leberre B, Neasat J, Paolini G, Perga ME, Perney P, Rimet F. 2016. Suivi environnemental des eaux du lac du Bourget pour l'année 2015. Rapport INRA-CISALB-CALB, 205 pages.
- Perga ME, Barbier C, COLON M, Frossard V, Guillard J, Hamelet V, Jacquet S, Lainé L, Lasne E, Rimet F. 2016. Suivi de la qualité des eaux du lac d'Annecy. Rapport 2015. SILA (éd.) et INRA-Thonon. 123 pages et dossiers.
- Personnic S, Domaizon I, Dorigo U, Berdjeb L, Jacquet S. 2009. Seasonal and spatial variability of virio, bacterio- and picophytoplanktonic abundances in three peri-alpine lakes. *Hydrobiologia* 627, 99-111
- Reymann Q, Jacquet S. 2015. Importance des facteurs environnementaux sur la croissance, la dynamique et la distribution des picocyanobactéries lacustres. Master 2 Biologie des micro-organismes spécialité micro-organismes, Université de Strasbourg
- Rimet F. 2017. Le phytoplancton du Léman. Rapport CIPEL pour l'année 2016
- Zhong X, Berdjeb L, Jacquet S. 2013. Temporal dynamics and structure of picocyanobacteria and cyanomyoviruses in two large and deep peri-alpine lakes. *FEMS Microbiology Ecology* 86, 312-326