

ETUDE RELATIVE AUX PICOCYANOBACTÉRIES

ABOUT PICOCYANOBACTERIA

CAMPAGNE 2020

Stéphan JACQUET

INRAE CARRETEL, 75 BIS AVECNUÉ DE CORZENT, 74200 THONON-LES-BAINS, FRANCE

RÉSUMÉ

Les picocyanobactéries sont une composante ubiquiste du phytoplancton, pris en considération depuis 2014 dans le cadre de ce suivi. Longtemps négligée en raison de leur petite taille (<2-3 μm), 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 7 dernières années, de 2014 à 2020, révèle des abondances pouvant dépasser 10^5 cellules mL^{-1} en période estivale. La biomasse relative de cette communauté, représentative majoritaire du picophytoplancton, reste encore modeste comparativement à celle du nano- et du microphytoplancton, ne dépassant pas 10% en moyenne à l'échelle de l'année. Toutefois, à certaines périodes de l'année (été et automne typiquement) et à certaines profondeurs, la biomasse des picocyanobactéries peut égaler voire dépasser celle des formes planctoniques plus grosses. Il est attendu que la proportion de ces petites formes phytoplanctoniques, dont le rôle fonctionnel est important, croisse régulièrement avec la réoligotrophisation de l'écosystème et le réchauffement de ses eaux. L'année 2020, en raison de la crise sanitaire et de l'arrêt du suivi écologique, n'a pas permis d'obtenir une chronique complète détaillée, certains mois clefs manquant dans le jeu de données (mars-avril).

ABSTRACT

Picocyanobacteria are a ubiquitous component of the phytoplankton having been neglected until recently because of their small size (< 2-3 μm). Distribution and dynamics of this community is proposed based on the analysis of their abundance using flow cytometry. The study on the last 6 years, from 2014 to 2019, reveals abundances of this community exceeding regularly 10^5 cells mL^{-1} , especially during the summer and fall. 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 (e.g. summer and fall) and to certain depths the picocyanobacterial biomass can match or even exceed that of the larger planktonic forms. It is expected, along with the reoligotrophication of Lake Geneva and warming of surface waters, which the proportion of these representative small cells will increase in the future. It is noteworthy that 2020 was an exceptional year because of the health crisis associated to the COVID-19 pandemic that resulted in the absence of field work for two months (e.g. March and April).

1. INTRODUCTION

Prendre en compte la structure en taille des communautés phytoplanctoniques (pico-, nano-, micro-phytoplancton) dans la compréhension du fonctionnement écologique des milieux aquatiques est particulièrement pertinent (Pomati *et al.* 2019). 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 dans les grands lacs péri-alpins les picocyanobactéries.

Ces dernières sont des espèces unicellulaires (surtout) de cyanobactéries de taille <2-3 μm , 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). En effet, une petite taille et un rapport surface/volume supérieur aux autres formes planctoniques (plus grandes, plus larges) confèrent aux cellules picophytoplanctoniques une acquisition plus efficace des éléments nutritifs et une meilleure absorption de la lumière incidente. Cela permet l'entretien minimal du métabolisme cellulaire et *in fine* de dominer dans des environnements (ultra-)oligotrophes.

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) ou d'autres écosystèmes (Stockner *et al.* 2000, Takasu *et al.* 2015) avec des proportions en termes de biomasse relative pouvant varier entre 10 et 70%. 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 (oligo- à faiblement eutrophe), les picocyanobactéries sont toujours observées et susceptibles de participer significativement, au moins à certains moments de l'année et en zone épilimnique, à la biomasse et production primaire totales, et donc au soutien de la production secondaire zooplanctonique (Ammi *et al.* 2014, Jacquet *et al.* 2016). Pour donner un ordre d'idées, les données acquises par S. Jacquet (INRAE CARTELE) sur la période s'étalant de 2003 à 2020, montrent que la proportion des picocyanobactéries (en termes de biomasse) fluctue entre 3 et 45% de la biomasse phytoplanctonique totale dans le lac d'Annecy (oligotrophe depuis longtemps) mais n'excède pas 18% au lac du Bourget (oligo-mésotrophe depuis une dizaine d'année). 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, tout comme à certains xénobiotiques comme le glyphosate (Castro Berman *et al.* 2020).

Le groupe des picocyanobactéries (représentantes majeures du picophytoplancton) étant susceptibles 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 dans le Léman (i) des abondances de la communauté picocyanobactérienne, 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 2020 ; (ii) des abondances moyennes des picocyanobactéries permettant de révéler leur importance quantitative et leur dynamique depuis 2014 comparativement au phytoplancton total ; et (iii) la proportion en terme de biomasse du pico-, nano- et microphytoplancton pour révéler et comparer l'importance des picocyanobactéries au sein des différents lacs péri-alpins.

2. METHODES

2.1 CYTOMETRIE 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 2020).

L'analyse de ce compartiment biologique est rendue possible grâce à la cytométrie en flux, une technique qui permet de compter et d'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 milieu 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, ici de l'eau milliQ, à travers 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, etc. Différents paramètres vont donc être observés : 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, 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 (PC) ou encore la phycoérythrine (PE) sont des pigments qui permettent de discriminer différentes populations et c'est la fluorescence de ce dernier type de pigment (PE), associé à des valeurs relativement faibles pour le FSC ou SSC, qui permettent de reconnaître sans ambiguïté les picocyanobactéries (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.

2.2 ANALYSE STATISTIQUE

Une analyse en composantes principales (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 la dynamique observées de la communauté des picocyanobactéries. Le seuil de significativité des corrélations a été fixé à 99%.

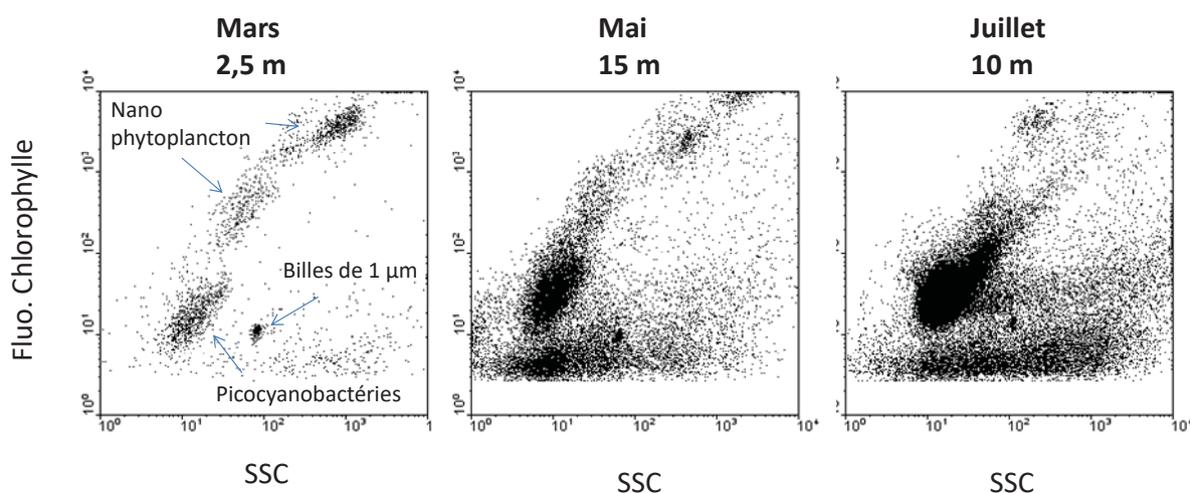


Figure 1 : Exemples de cytogrammes (représentations biparamétriques) révélant notamment la communauté des picocyanobactéries à différentes profondeurs et dates dans le Léman. SSC signifie side scatter et correspond à un paramètre relatif à la taille, à la forme et à l'indice de réfraction des cellules.

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.

3. RÉSULTATS POUR L'ANNÉE 2020

La dynamique de la communauté picocyanobactérienne révèle une saisonnalité marquée avec des concentrations cellulaires augmentant pendant le printemps et l'été, mais aussi au début de l'automne, avant de diminuer à la fin de l'automne et en hiver. Comme pour les années précédentes, les valeurs maximales ont été observées de mi-juillet à fin août, avec plus de 10^5 cellules/mL (Fig. 2). En 2020, les concentrations cellulaires les plus élevées (i.e. $>10^5$ cellules/mL) ont été enregistrées une fois à 15 m le 30 juin, puis à 2,5, 10 et 15 m le 20 juillet. En août, les concentrations restent élevées dans la zone euphotique mais ne dépassent jamais ce seuil des 100 000 cellules/mL. En 2020, les concentrations avec plus de 10^5 cellules/mL ont donc été enregistrées sur une fenêtre temporelle assez serrée alors qu'elle était plus étalée en 2019 (entre juin et octobre). La concentration cellulaire des picocyanobactéries reste bien visible et marquée toute l'année sur la tranche d'eau 0-50 m.

En considérant la valeur intégrée 0-18 m afin de pouvoir la comparer à l'ensemble du phytoplancton, la proportion des picocyanobactéries en termes de biomasse phytoplanctonique totale était de 5,7 % en 2020 (une valeur comparable à celles de 2018 et 2019) contre 18,8 % pour le nano- (en légère hausse par rapport à 2019) et 75,5 % pour le microphytoplancton (en légère baisse par rapport à 2019). Comparativement, les proportions picocyanobactériennes en 2020 ont été de 17,3 % et 14,1 % aux lacs du Bourget et d'Annecy, respectivement, des valeurs qui restent très modestes notamment pour le lac d'Annecy.

Dans le détail, les picocyanobactéries ont représenté jusqu'à 20 à 25 % de la biomasse phytoplanctonique totale de fin juin à fin juillet (cette valeur maximale observée étant comparable à celle du mois d'août 2018 (22%) mais très inférieure à celle de 2016, soit 40% enregistré le 24 août).

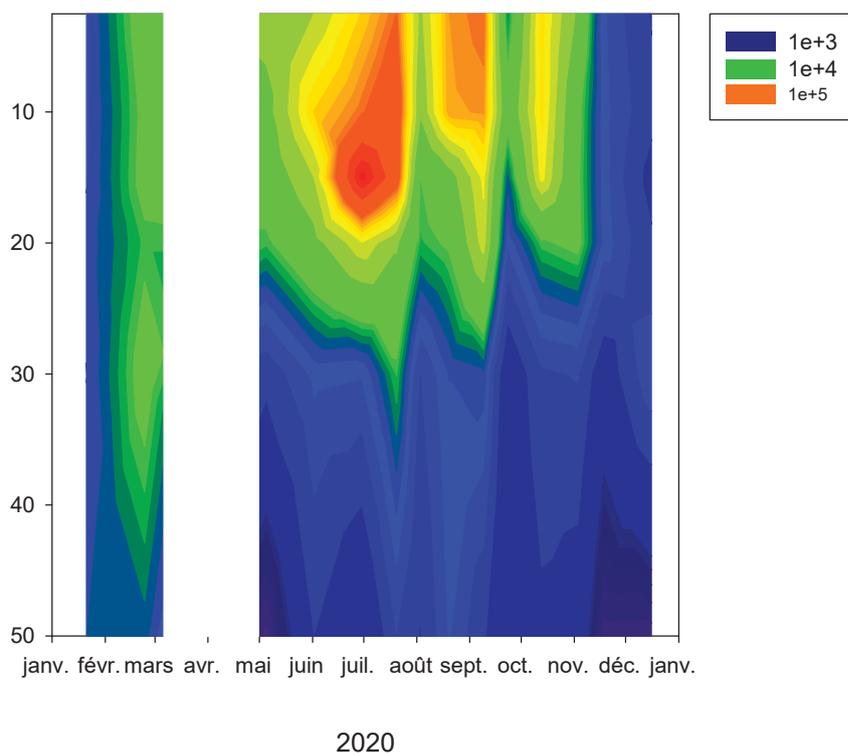


Figure 2 : Distribution et dynamique des picocyanobactéries (en cellules / mL) en 2020 entre la surface et 50 m de profondeur dans le Léman à la station SHL2. L'échelle proposée est la suivante: 1e+2= 100 ; 1e+3= 1000 ; etc.

Figure 2 : Distribution and dynamics of picocyanobacteria (in cells / mL) in 2020 between surface and 50 m deep in Lake Geneva at SHL2. The scale for the numbers is as follows: 1e+2= 100 ; 1e+3= 1000 ; etc.

Une analyse en composantes principales pour déterminer les liens existants entre certains facteurs environnementaux et la dynamique, ainsi que la distribution de cette communauté (notée « picocyanos » ci-dessous) a été proposée pour l'année 2020 (n=84 ; Fig. 3). La variance totale expliquée à partir des deux principaux axes est relativement élevée, soit 67,2 %, comparable à 2019. On constate que la température (notée Temp) reste un facteur clef ($r=0,68$; $p<0,01$; comme en 2019), 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, 2015). La variable « profondeur », notée « prof », peut être considérée comme un indicateur de la lumière et une relation négative existe entre les picocyanobactéries et la profondeur ($r=-0,66$; $p<0,01$). Comme les années précédentes, il n'existe pas de relations marquées entre les nutriments phosphorés et les picocyanobactéries. On note toutefois une relation positive faible avec l'ammonium ($r=0,36$; $p<0,01$) mais plus élevée et négative avec les nitrates ($r=-0,58$; $p<0,01$), des relations qui étaient exactement les mêmes mais inversées en 2019, sans qu'il soit aisé de les expliquer facilement. Ce dernier résultat ne pouvant pas être interprété sans expériences au laboratoire, une étude a été menée en 2019 (et sera reconduite en 2021) consistant à enrichir des échantillons naturels prélevés dans différents lacs, dont le Léman, avec différentes concentrations en nitrates. Il s'est avéré que la croissance des picocyanobactéries était fortement stimulée par l'ajout de NO_3 (Guilmot & Jacquet, 2020) suggérant le caractère limitant de cette ressource. La communauté des picocyanobactéries est donc susceptible d'être un bon indicateur de perturbation trophique et/ou écologique.

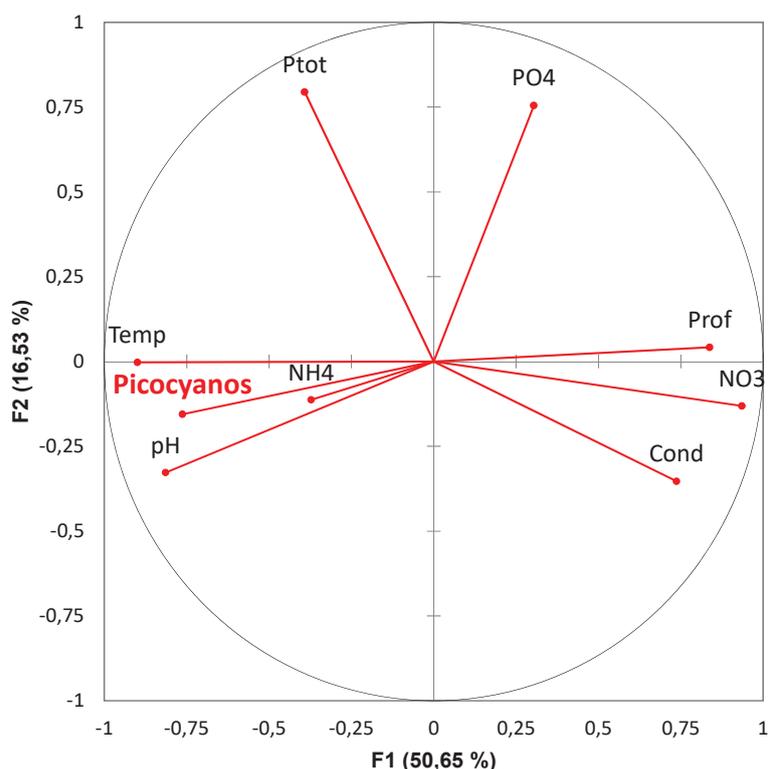


Figure 3 : Analyse en composantes principales (ACP) effectuée avec quelques paramètres sur l'ensemble de l'année 2020, dans le Léman, à la station SHL2. La variance totale expliquée est de 67,2%.

Figure 3 : Principal Component Analysis with a selection of a few parameters in 2020 at SHL2. The total variance is about 67.2%.

4. EVOLUTION DEPUIS 2014

Les concentrations annuelles moyennes des picocyanobactéries sur la zone 2,5-20 m ou 0-18 m dépassent régulièrement les 10^5 cellules/mL. Ces fortes valeurs comparativement aux autres groupes phytoplanctoniques en général, sont surtout observées autour de la période estivale, les concentrations maximales étant observées de juillet à octobre (Fig. 4). En 2019, on notait toutefois une baisse assez marquée des abondances des picocyanobactéries sur la zone 0-18 m, à relier peut-être à un échantillonnage trop espacé et n'ayant pas permis d'obtenir le pic de concentration estivale. 2020 ressemblant à 2019, les mêmes raisons peuvent être évoquées pour expliquer cette dynamique en plus du manque de données sur la période mars-avril.

En 2017, une période de développement étroite et concentrée sur la période estivale avait été observée (surtout en août). En 2018 et 2019, de fortes abondances cellulaires ont aussi été observées plus tard dans l'année, en octobre, peut-être à rapprocher avec les températures de plus en plus clémentes de fin d'année. Ce ne fut toutefois pas le cas en 2020.

La distribution des picocyanobactéries révèle sur les 7 dernières années que la zone où leur abondance (exprimée en nombre de cellules par mL) est la plus forte reste la zone épilimnique (0-15 m), probablement à relier majoritairement à la quantité de lumière et aux températures élevées en proche surface, des paramètres pour lesquels cette communauté montre une sensibilité marquée (Fig. 5).

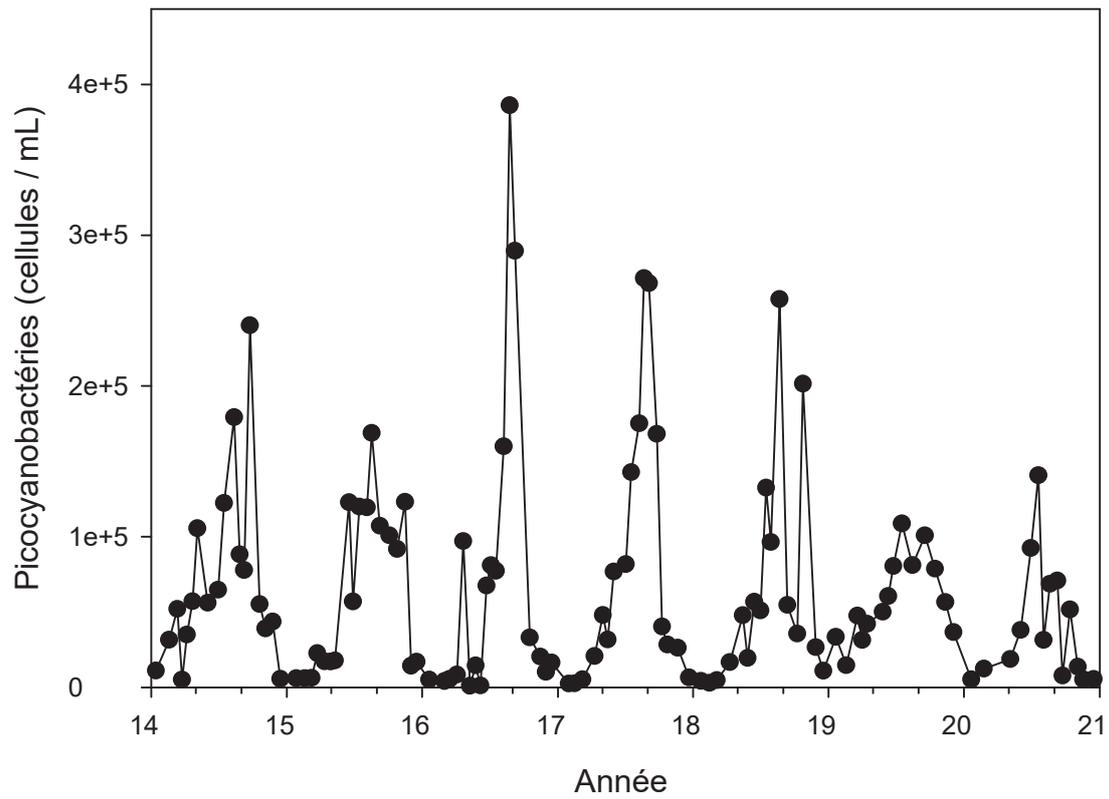


Figure 4 : Evolution des concentrations moyennes de picocyanobactéries (en cellules/mL) entre 2,5 et 20 m de 2014 à 2020 inclus, dans le Léman à la station SHL2

Figure 4 : Mean values of picocyanobacterial concentrations (in cells/mL) between 2.5 and 20 m depth from 2014 to 2020, at SHL2.

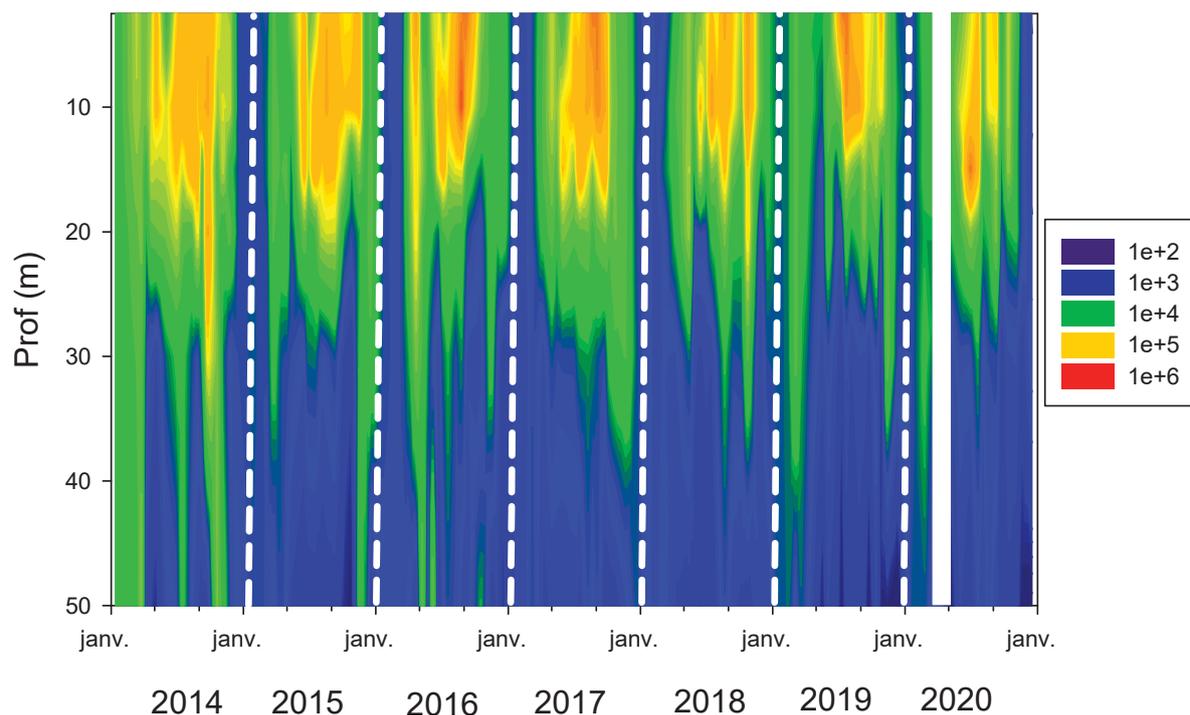


Figure 5 : Evolution des concentrations de picocyanobactéries entre 2.5 et 50 m, de 2014 à 2020 inclus, dans le Léman à la station SHL2.

Figure 5 : Picocyanobacterial concentrations between 2.5 and 50 m depth from 2014 to 2020, at SHL2.

Sur la période de 2014 à 2020, la proportion annuelle (en termes de biomasse) des picocyanobactéries fluctue entre 5,6 (en 2014) et 10,1% (en 2016) révélant des disparités entre les années (Fig. 6). L'année 2020 ressemble aux années précédentes (2017 à 2019) avec une proportion significativement plus basse que 2016 et comparable à 2014, autour des 6-7%. Il est à rappeler ici que deux mois de données ont manqué (mars-avril). Le suivi à long terme de cette communauté doit se poursuivre pour permettre de confirmer (i) que la proportion picoplanctonique augmentera majoritairement avec la réoligotrophisation du lac mais aussi possiblement avec le réchauffement de ses eaux (une hypothèse qui mériterait d'être testée en parallèle en conditions contrôlées de laboratoire) et (ii) que ce groupe indiquera une évolution du niveau trophique et de qualité des eaux du lac associées à un changement de son fonctionnement écologique.

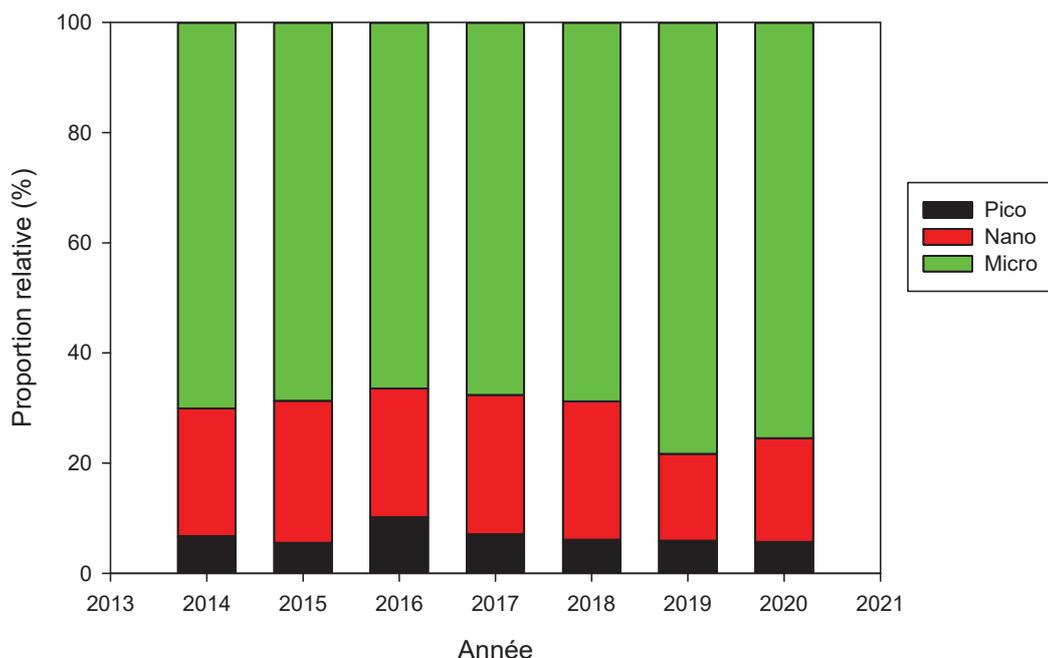


Figure 6 : Evolution de la proportion (en %) de biomasse des compartiments pico-, nano- et microphytoplanctoniques dans le Léman à la station SHL2 pour la période 2014-2020 entre 0 et 18 m.

Figure 6 : Evolution of the average proportion (in %) of the pico-, nano- and microphytoplankton biomass in Lake Geneva at SHL2 for the period 2014-2020.

La comparaison avec les deux autres lacs permet de constater, sur la période 2014-2020, une plus forte concordance pour le picoplancton entre les lacs Léman (mésotrophe) et du Bourget (oligo-mésotrophe), comparativement à celui d'Annecy qui est oligotrophe depuis longtemps (Fig. 7).

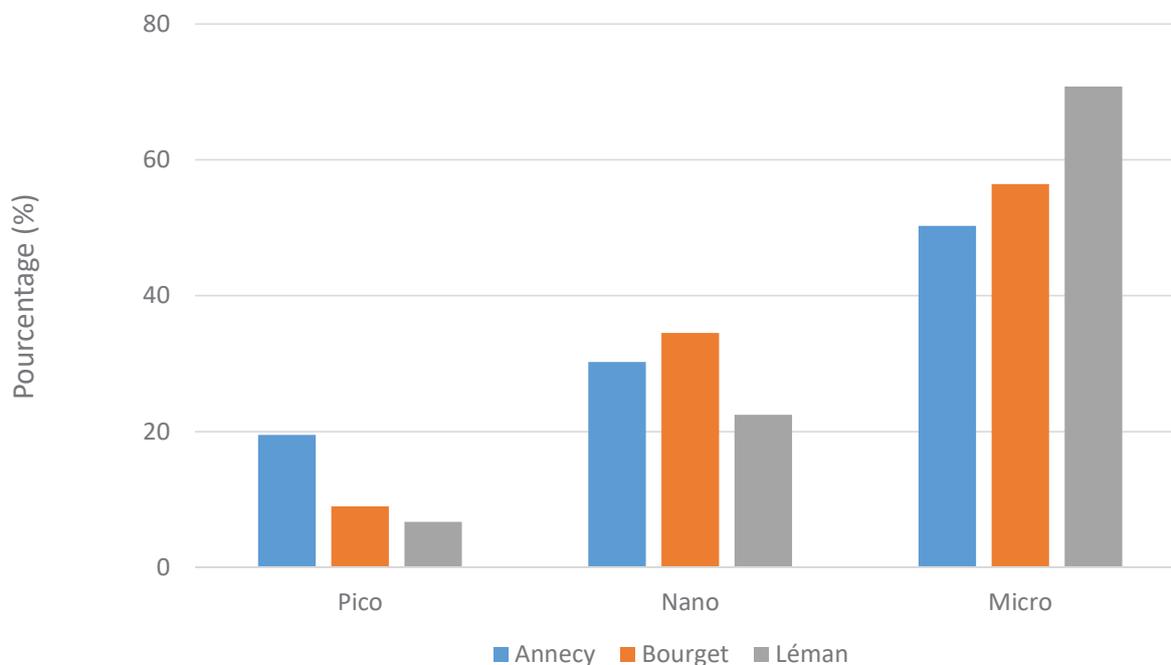


Figure 7 : Evolution de la proportion (en %) de biomasse des compartiments pico-, nano- et microphytoplanctoniques dans les lacs Léman, d'Annecy et du Bourget pour la période 2014-2020.

Figure 7 : Evolution of the average proportion (in %) of the pico-, nano- and microphytoplankton biomass in Lakes Annecy, Bourget and Geneva for the period 2014-2020.

5. CONCLUSIONS

Le picophytoplancton, majoritairement représenté par les picocyanobactéries, est une composante majeure du phytoplancton présente dans le Léman toute l'année et à toutes les profondeurs. En plus de son rôle fonctionnel dans la production primaire globale ou en tant que communauté proie potentielle pour le zooplancton uni- et pluricellulaire, ce compartiment biologique est susceptible d'être un marqueur important de l'état de santé de l'écosystème. Ainsi, le suivi détaillé de ce compartiment sur le long terme devrait permettre de confirmer que ce groupe est un indicateur clef 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.

6. 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
- Castro Berman M, Llamas ME, Minotti P, Fermani P, Quiroga MV, Ferraro MA, Metz S, Zagarese HE. 2020. Field evidence supports former experimental claims on the stimulatory effect of glyphosate on picocyanobacteria communities. *Science of the Total Environment* 701, 134601
- 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, Debros 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
- Guilmot S, Jacquet S. 2020. Le picoplancton: Vers un nouveau bio-indicateur global lacustre (PICOMIL). Rapport du pôle ECLA.
- 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
- 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
- Pomati F, Shurin JB, Andersen KH, Tellenbach C, Barton AD. 2019. Interacting temperature, nutrients and zooplankton grazing control phytoplankton size-abundance relationships in eight Swiss Lakes. *Frontiers in Microbiology* 10, 3155
- 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. 2018. Le phytoplancton du Léman. Rapport CIPEL pour l'année 2017
- Stockner J, Callieri V, Cronberg G. 2000. Picoplankton and other non-bloom-forming cyanobacteria in lakes. Dans *The Ecology of Cyanobacteria* pp 195-231
- Takasu H, Ushio M, LeClair JE, Nakano S. 2015. High contribution of *Synechococcus* to phytoplankton biomass in the aphotic hypolimnion in a deep freshwater lake (Lake Biwa, Japan). *Aquatic Microbial Ecology* 75, 69-79
- 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