

2013 - **Domaine** Evolution, fonctionnement et évaluation des écosystèmes littoraux

**Action 3** Indice Composition

**Acquisition de données complémentaires aux dénombrements, avec les techniques d'analyses pigmentaires et de diversité génétique. Etat d'avancement et premiers résultats.**

**Action 3. Indice Composition. Livrable n° A IV**

**Rapport final, 16 juillet 2014**

**Daniel DELMAS (Ifremer)**

**Raffaele SIANO (Ifremer)**

Juillet 2014

## AUTEURS

### **Daniel DELMAS**

chercheur en écologie microbienne

Ifremer – Centre de Bretagne DYNECO/Pelagos

Daniel.Delmas@ifremer.fr

### **Raffaele SIANO**

chercheur en écologie et biodiversité du phytoplancton

Ifremer – Centre de Bretagne DYNECO/Pelagos

Raffaele.Siano@ifremer.fr

## CORRESPONDANTS

**Onema** : Marie Claude XIMENES (Onema), marie-claude.ximenes@onema.fr

**Ifremer** : Catherine BELIN (Ifremer), catherine.belin@ifremer.fr

## AUTRES CONTRIBUTEURS

### **Elisabeth Nézan**

chercheuse taxinomie du phytoplancton

Ifremer – Station de Biologie Marine/ LER/FBN

Elisabeth.Nezan@ifremer.fr

### **Julien Quéré**

technicien phytoplancton

Ifremer – Centre de Bretagne DYNECO/Pelagos

Julien.Quere@ifremer.fr

### **Agnès Youenou**

technicienne chimistes

Ifremer – Centre de Bretagne DYNECO/Pelagos

Agnes.Youenou@ifremer.fr

### **Pascale Malestroit**

technicienne phytoplancton

Ifremer – Centre de Bretagne DYNECO/Pelagos

Pascale.Malestroit@ifremer.fr

**Anne Doner, Jérémie Gouriou, Aouregan Terre Terrillon**

techniciens phytoplancton et prélèvements

Ifremer – Station de Biologie Marine/ LER/FBN

**Droits d'usage** : libre accès

**Niveau géographique** : national

**Couverture géographique** : nationale

**Niveau de lecture** : experts

## RESUME

Afin d'appréhender la diversité du phytoplancton dans toutes ses composantes, on ne peut plus se limiter au seul micro-phytoplancton, il est indispensable de considérer le nano et le pico-phytoplancton. Pour l'étude de la biodiversité des communautés phytoplanctoniques, deux types d'approches alternatives et complémentaires à l'approche morphologique classique obtenue par microscope optique ont été utilisés : diversité pigmentaire et diversité génétique par approche de metabarcoding. Le point REPHY (047-P-016 Concarneau Large) situé en baie de Concarneau a été échantillonné pendant la période la plus importante de développement du phytoplancton (mars- juillet 2012) avec une fréquence bihebdomadaire. Les résultats obtenus par les méthodes d'analyses pigmentaires et de metabarcoding montrent une bonne résolution de la biodiversité phytoplanctonique, pouvant représenter au niveau des groupes ou familles (diversité pigmentaires) ou au niveau des espèces ou des clades génétiques (metabarcoding) toutes les classes de taille du phytoplancton y compris celles du pico ( $<3\mu\text{m}$ ) ou du nano ( $3\text{-}20\mu\text{m}$ ), qui normalement ne sont pas prises en compte dans les analyses morphologiques de microscopie optique. La structure de taille du phytoplancton est clairement contrôlée par la richesse en nutriments des eaux, les formes pico et nanophytoplanctoniques dominent dès que les sels nutritifs deviennent limitants. L'approche metabarcoding a permis d'identifier des groupes de protistes typiques du micro, nano et picoplancton, et la diversité des OTUs évolue dans le temps de façon différente pour les trois classes de taille. Les séquences du pico et nanophytoplancton ensemble représentent dans la plupart des cas plus du 50% du nombre total d'OTUs identifiées, pouvant être ainsi dominantes dans la communauté phytoplanctonique de la Baie de Concarneau

## MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

Phytoplancton, Structure de taille, Picophytoplancton, Nanophytoplancton, Microphytoplancton, Diversité génétique, Metabarcoding, Taxonomie pigmentaire, Façade atlantique, Baie de Concarneau

## TITLE

Pigment and genetic (metabarcoding) analysis of phytoplankton diversity using alternative methods to the light microscopy morphological studies.

## ABSTRACT

Studies on phytoplankton community diversity cannot be limited microphytoplankton (cells > 20  $\mu\text{m}$ ), it is indeed necessary to take into account also the nano (3-20  $\mu\text{m}$ ) picophytoplankton (< 3  $\mu\text{m}$ ) components. In the frame of this work aimed at studying temporal phytoplankton community diversity two complementary methodologies of phytoplankton sample analysis, pigment and genetic (metabarcoding) diversity, have been used as alternative to routine morphological analysis carried out at light microscopy. The REPHY station (047-P-016 Concarneau Large) off-shore the Concarneau Bay has been sampled during the annual highest phytoplankton production (March-July 2012) with a frequent sample interval strategy (twice per week). Results obtained by both pigment and metabarcoding analyses showed a good resolution of all phytoplankton size classes (micro-, nano-, picophytoplankton) diversity, from a groups/class level (pigments) to a species/genetic clades taxonomic resolution (metabarcoding). Size class dynamics of phytoplankton communities is clearly controlled by the high nutrient concentrations measured during the study period, with pico-nano phytoplankton dominating in periods of nutrient depletion. The metabarcoding approach allowed the identification of protistan groups characteristic of all size classes and showed that diversity of each compartments evolve independently. Sequences of pico-nanophytoplankton together represent in most of the samples at more than the 50% of total identified OTUs (Operational Taxonomic Units), suggesting that pico- and nanophytoplankton communities are dominant compartments of the phytoplankton of the Concarneau Bay.

## KEY WORDS (THEMATIC AND GEOGRAPHICAL AREA)

Phytoplankton, Size classes, Picophytoplankton, Nanophytoplankton, Microphytoplankton, Genetic diversity, Metabarcoding, Pigment taxonomy, Atlantic coasts, Concarneau Bay

## SYNTHESE POUR L'ACTION OPERATIONNELLE

### Activités opérationnelles

La recherche d'indicateurs de biodiversité phytoplanctonique doit tenir compte de la **variabilité spatio-temporelle**, parfois très rapide, des communautés pélagiques. Il est donc nécessaire d'acquérir des données à haute résolution temporelle (fréquence < 5 jours) à des échelles spatiales qui puissent être représentatives des gradients environnementaux importants (par exemple embouchures des fleuves).

Pour l'étude de la **diversité temporelle** le point REPHY (047-P-016 Concarneau Large) situé en baie de Concarneau a été sélectionné. 26 prélèvements ont été réalisés pendant la période la plus importante pour le développement du phytoplancton (entre le 13 mars et le 12 juillet 2012) avec une fréquence bihebdomadaire (sauf contraintes météo). Les teneurs en sels nutritifs (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, Si(OH)<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub>) ont été mesurées par autoanalyseur ainsi que la température et la salinité du milieu.

Pour l'étude de la **diversité spatiale** la campagne Pelgas 2013 a été menée au mois de mai 2013 dans le Golfe de Gascogne. Le troisième Leg de la campagne (25-31 mai) a ciblé une radiale côte-large de l'embouchure de la Gironde aux accores du plateau, représentant donc un bon gradient environnemental correspondant probablement à des peuplements phytoplanctoniques différents. Le long de cette radiale, 8 stations ont été échantillonnées à deux profondeurs (surface et au maximum de chlorophylle). Des échantillons pour l'analyse pigmentaire, de metabarcoding, de cytométrie et de microscopie optique ont été prélevés.

Les activités au laboratoire en 2013 se sont concentrées sur la mise au point des méthodes et l'analyse de la biodiversité génétique (metabarcoding) et pigmentaire des échantillons récoltés à haute fréquence temporelle (Baie de Concarneau) et sur l'analyse préliminaire des données acquises. Les analyses de diversité pigmentaire, génétique et morphologique des échantillons de la campagne Pelgas 2013 sont envisagées en 2014.

Pour l'utilisation des approches de **diversité pigmentaire** et de **metabarcoding** il a fallu mettre en place des nouveaux protocoles d'analyses des échantillons. La mise au point de ces méthodes a représenté une grande partie des activités opérationnelles en 2013.

Les pigments ont été analysés en utilisant la méthode de Van Heulekem et Thomas (2001) selon le protocole de Ras et Claustre in Hooker et al (2010). La méthode a été mise en place au laboratoire en mars 2012. Les calibrations pour chacun des 24 composés standards (caroténoïdes et chlorophylles) ont été réalisées indépendamment pour chaque molécule sur un minimum de 5 concentrations comprises entre 50 et 1000 ng par ml (soit plus de 200 chromatographies réalisées de mai à juillet). Pour déterminer la structure de taille du phytoplancton (micro- > 20µm, nano- : 3-20 µm, et picophytoplancton < 3 µm), trois fractions sont obtenus par filtration différentielle des échantillons. L'ensemble des 78 échantillons a été analysé par HPLC en octobre 2013, périodiquement les analyses sont répliquées pour vérifier la bonne reproductibilité des protocoles.

Le développement et l'application des protocoles d'analyse génétique des échantillons prélevés en 2012 par metabarcoding ont été effectués en collaboration avec le groupe phytoplancton de la Station Biologique de Roscoff. Les analyses génétiques pré-pyrosequencing ont été effectuées en Avril 2013. Pour les analyses de la diversité génétique, les échantillons (filtrés) de trois classes de taille (micro- > 20 µm ; nano- 3-20 µm ; picoplancton 0,22-3 µm) de protistes marins ont été prélevés. L'ADN extrait des filtres (kit Nucleo Spin Plant II) a été quantifié (*Picogreen* Quant-it Kit) et la région V4 du 18S rDNA (480-560 bp) a été amplifiée en triplicatas. Ces amorces et le fragment génétique ciblé (V4 18rDNA) permettent d'analyser l'ensemble des protistes marins, autotrophes et hétérotrophes confondus, et ainsi de caractériser la totalité des organismes présents dans un écosystème. Les produits d'amplification ont été purifiés, re-quantifiés, et pyrosequencés par

454 GS-FLX (*Beckman Coulter Genomics* – USA – 3 mois de délais après l'envoi des séquences). Les séquences ont été annotées en utilisant la base PR2 (*Protist Ribosomal Reference database* <http://ssu-rrna.org/>). Une analyse manuelle et/ou l'introduction des nouvelles séquences dans la base ont permis de préciser certaines annotations au niveau de l'espèce ou du clade génétique (infraspécifique). Ce travail d'annotation d'une durée de 2 mois, a été effectué en collaboration avec R. Christen de l'Université de Nice et la Station Biologique de Roscoff. Pour la comparaison des échantillons, les données ont été normalisées et l'importance relative (%) de chaque OTU (Operational Taxonomic Unit) dans chaque échantillon a été calculée.

### Analyses de diversité temporelle

L'évolution des rapports N/P, Si/N et Si/P en parallèle à leur concentrations permettent de discriminer trois périodes peuvent être retenues :

- mars avril, les eaux sont essentiellement limités par les phosphates;
- fin avril - début mai, enrichissement des eaux en nutriments ;
- juin-juillet, les eaux sont fortement limitées par N et P et occasionnellement par la silice.

### Diversité pigmentaire

Au cours des trois périodes précédemment décrites la distribution de la structure de taille de la chlorophylle présente des changements importants. Les fractions pico- (41% en moyenne) et nanophytoplanctoniques (42%) dominent pendant la première période. Pendant la forte poussée consécutive à l'enrichissement, la chlorophylle de la fraction microphytoplanctonique domine largement (56% en moyenne) et peut représenter jusqu'à 86% de la chlorophylle (retenu comme indicateur de la biomasse micro-algale dans le cadre de la DCE). Enfin, en période post bloom, malgré des fluctuations temporelles, la chl a est approximativement répartie à parts égales dans les trois fractions. Sur l'ensemble de la période le picophytoplancton participe en moyenne à 30% de la biomasse, le nano à 32%, et le micro à 38%. Le microphytoplancton n'est dominant (> 50%) qu'environ 30 jours sur 120. **Cet écosystème très côtier est donc largement dominé par le phytoplancton de petite taille (pico+ nano) quand les eaux sont limitées en nutriments.**

Les biomarqueurs pigmentaires présentent des indications taxonomiques variables. Certains peuvent être ubiquistes, comme la chlorophylle a qui est présente chez tous les végétaux autotrophes, d'autres sont caractéristiques de « groupes taxonomiques : alloxantine pour les cryptophycées, péridine pour les dinophycées, prasinoxanthine pour les prasinophycées, d'autres enfin sont communs à plusieurs groupes. Les biomarqueurs pigmentaires sont donc à même de fournir des indications sur les catégories taxonomiques présentes.

Dans les échantillons analysés on peut distinguer trois types d'évolution temporelle des caroténoïdes; certains comme la prasinoxanthine, la chlorophylle b, ou la 19'hexanoyloxyfucoxanthine sont présents en quantités importantes pendant les périodes I et III quand la croissance des algues est limitée par les nutriments (P et P+N) et / ou quand le pico et le nano dominant. D'autres, fucoxanthine et chlorophylle C2 sont particulièrement abondants pendant la forte poussée de diatomées microphytoplanctoniques consécutive à l'enrichissement en sels nutritifs (Période II). D'autres, enfin, sont présents soit pendant la première période (alloxanthine, caractéristique des Cryptophyceae) ou pendant la période III (péridine, caractéristique des Dinophyceae).

## Diversité génétique (metabarcoding)

1859 différentes OTUs, hétérotrophes et autotrophes confondus, ont été identifiées. Seulement 635 d'entre elles (soit 34%) sont communes aux trois fractions de taille. Les 13%, 9% et 12% des OTUs totales sont respectivement caractéristiques du pico-, nano, et microplancton. L'abondance (nombre total de chaque OTUs et de leurs copies) d'OTUs pendant la période d'analyse reste relativement stable entre 52388 et 79507, par contre le nombre des OTUs spécifiques au picoplancton augmente à partir du mois de mai. Ceci montrerait que les organismes de trois fractions de taille se développeraient de manière indépendante pendant la période d'étude.

En analysant les nombres totaux de séquences des OTUs de chaque groupe/famille d'organismes identifiés **il est possible de mettre en évidence des groupes caractéristiques pour chaque fraction de taille**. Les diatomées (Bacillariophyta), les dinoflagellés (Dinophyceae ou Dinophyta) et les Prymnesiophyta sont présentes dans toutes les fractions de taille. Les séquences de Dinophyceae sont plus abondantes dans le microplancton, celles des Prymnesiophyta (Chrysochromulinaceae et Phaeocystaceae) dans le nano-picoplancton. Parmi les diatomées les séquences de Coscinodiscophyceae et Mediophyceae sont plus abondantes respectivement dans le nano et pico plancton. Les Cryptophyta sont typiques du nanoplancton et le Prasinophyta du picoplancton.

**L'importance relative en termes de nombre d'OTUs des organismes du micro, nano et picophytoplancton varie avec le temps**. Les trois périodes identifiées par les analyses pigmentaires en relation avec les concentrations en sels nutritifs sont identifiables aussi par le biais des analyses génétiques. Pendant la première période (mars – avril) l'abondance d'OTUs retrouvée dans la fraction du picophytoplancton est en général plus élevée (38% en moyenne) que dans ceux du nano et microphytoplancton. Pendant la deuxième période (mai) le nombre d'OTUs du microphytoplancton est plus élevé (44% en moyenne), et enfin pendant la troisième période (juin - juillet) le nombre d'OTUs du picophytoplancton redevient plus abondant (43% en moyenne). Il est donc possible de mettre en évidence l'alternance de l'importance relative du picophytoplancton au microphytoplancton. Toutefois il est important de souligner que pour **22 des 26 dates considérées le nombre d'OTUs du pico et nanophytoplancton ensemble représentent plus du 50% du nombre total d'OTUs identifiées, pouvant atteindre jusqu'à 95% des séquences totales**.

Dans le picoplancton, parmi les Prasinophyceae, les OTUs assignés à l'espèce *Micromonas pusilla* peuvent représenter jusqu'à le 69% (14 Avril) du nombre total d'OTUs du picophytoplancton. L'évolution de l'importance relative de *M. pusilla* est cohérente avec l'abondance totale d'OTUs du picophytoplancton pour la première et la troisième période de l'échantillonnage. Pendant la deuxième période, des OTUs assignés à *Bathycoccus prasinos* et *Ostreococcus* spp. (Prasinophyceae) ont été aussi retrouvées (Fig. 8). Une corrélation significative ( $R^2 = 0.6$ ) existe entre le nombre total des OTUs assignées à l'espèce *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) et la prasinoxanthine, pigment caroténoïde caractéristique des Prasinophyceae. Cette corrélation positive souligne une **bonne convergence des analyses pigmentaires et génétiques pour l'analyse de la biodiversité du picophytoplancton**.

## Conclusions

Les résultats obtenus par les méthodes d'analyses pigmentaires et de metabarcoding montrent une bonne résolution de la biodiversité phytoplanctonique, pouvant représenter au niveau des groupes ou familles (diversité pigmentaires) ou au niveau des espèces ou des clades génétiques (metabarcoding) toutes les classe de taille du phytoplancton y compris celles du pico (<3µm) ou du nano (3-20 µm), qui ne sont pas prises en compte dans les

analyses morphologiques de microscopie optique. Cette caractérisation exhaustive de la biodiversité permet une vision globale de la diversité du phytoplancton qui est incontournable si l'on veut décrire des indices de composition qui se démarquent des indices essentiellement liés au micro-phytoplancton, comme l'indice d'abondance actuellement utilisé pour l'indicateur DCE en Manche Atlantique (basé sur les blooms des taxons identifiables au microscope optique).

La structure de taille du phytoplancton est clairement contrôlée par la richesse en nutriments des eaux, les formes pico et nanophytoplanctoniques dominant dès que les sels nutritifs deviennent limitants.

Cette distribution de la structure de taille de la chlorophylle est confirmée par la distribution des pigments caroténoïdes caractéristiques du pico et du nanophytoplancton que nous renseigne également sur l'importance quantitative et l'évolution temporelle de certaines classes de phytoplancton (eg dinophycées, prasinophycées, cryptophycées, etc.)

L'approche metabarcoding a permis d'identifier des groupes de protistes typiques du micro, nano et picoplancton, et la diversité des OTUs évolue dans le temps de façon différente pour les trois classes de taille.

Les séquences du pico et nanophytoplancton ensemble représentent dans la plupart des cas plus du 50% du nombre total d'OTUs identifiées, pouvant être ainsi dominantes dans la communauté phytoplanctonique de la Baie de Concarneau.

Les analyses génétiques montrent que les OTUs assignés aux Prasinophyceae, et en particulier à *Micromonas pusilla*, représentent une grande partie du picophytoplancton. Des études sont encore nécessaires pour identifier le Prasinophyceae ou l'espèce *M. pusilla* comme indicateur de toute la communauté picophytoplanctonique.

La diversité génétique infraspécifique (séparation en clades) chez certains groupes ou morpho-espèces de protistes marins correspond à une phénologie différente (saisonnalité et/ou variation de l'importance relative) dans l'écosystème.

## **Perspectives de recherche d'indice de composition**

Les analyses pigmentaires et de metabarcoding mettent en évidence l'importance des compartiments du nano et picophytoplancton qui peuvent souvent être dominants au sein des communautés phytoplanctoniques des écosystèmes côtiers. Il a été aussi démontré que les changements de structure de taille et la variation des dominances du micro- phyto versus les pico-nanoplancton est en lien avec la disponibilité de ressources abiotiques.

Une première piste de recherche pour la définition d'un indice de composition pourrait tenir compte de cette variabilité des structures de taille en fonction des forçages en définissant quel(s) compartiment(s) (micro, nano, pico) serait dominant dans certaines conditions environnementales.

Une deuxième piste de recherche consisterait à aller plus dans les détails de la caractérisation de la biodiversité (par famille jusqu'aux espèces) des différents compartiments des communautés phytoplanctoniques pour définir quelle(s) famille(s) ou espèce(s) pourrait être représentative d'un certain compartiment.

Les analyses de metabarcoding ont montré l'importance relative élevée des OTUs assignées aux Prasinophyceae et en particulier à l'espèce *Micromonas pusilla*. De plus une corrélation positive entre les abondances d'OTUs de cette espèce et les teneurs en prasinoxanthine, pigment typique des Prasinophyceae, a été mise en évidence. Les Prasinophyceae et une espèce en particulier, *Micromonas pusilla*, seraient donc une famille importante au sein du picophytoplancton et probablement un indicateur de sa composition. Il reste encore à

confirmer que I) cette famille soit importante dans d'autres écosystèmes et le long de gradients environnementaux (analyses prévues en 2014 sur la radiale de la Gironde) et II) qu'elle soit représentative de la communauté picophytoplanctonique dans son intégralité. Des analyses statistiques précises sur plusieurs jeux de données sont nécessaires pour vérifier l'hypothèse que les Prasinophyceae et/ou l'espèce *Micromonas pusilla* puissent être un indice de composition de la communauté picophytoplanctonique.

## **Acquisition de données complémentaires aux dénombrements, avec les techniques d'analyses pigmentaires et de diversité génétique. Etat d'avancement et premiers résultats.**

### **1. Introduction et objectifs**

La recherche d'indicateurs de biodiversité phytoplanctonique doit tenir compte de la variabilité spatio-temporelle, parfois très rapide, des communautés pélagiques. Il est donc nécessaire d'acquérir des données à haute résolution temporelle (fréquence < 5 jours) à des échelles spatiales qui puissent être représentatives des gradients environnementaux importants (par exemple embouchures des fleuves).

Les activités de recherche 2013 se sont concentrées sur l'acquisition des données à haute fréquence temporelle, la mise au point des méthodes et l'analyse de la biodiversité génétique et pigmentaire des échantillons récoltés. De plus une nouvelle campagne d'échantillonnage (Pelgas 2013 – Leg 3) sur la radiale de la Gironde (Golfe de Gascogne) a été menée afin de prélever de nouveaux échantillons pour l'analyse de la biodiversité sur un gradient environnemental spatial.

Pour l'analyse de la biodiversité des communautés phytoplanctoniques, deux types d'approches alternatives et complémentaires à l'approche morphologique classique obtenue par analyse au microscope optique ont été utilisés : diversité pigmentaire et diversité génétique par approche de metabarcoding.

### **2. Activités effectués**

#### **2. 1 Analyses des échantillons de diversité temporelle**

Le point REPHY (047-P-016 Concarneau Large) situé en baie de Concarneau a été sélectionné pour cette étude. 26 prélèvements ont été réalisés pendant la période la plus importante pour le développement du phytoplancton (entre le 13 mars et le 12 juillet 2012) avec une fréquence bihebdomadaire (sauf contraintes météo). L'effet de la marée a été pris en compte afin d'échantillonner toujours dans la même masse d'eau. La structure hydrologique de la colonne d'eau est étudiée grâce aux paramètres mesurés par un profileur CTD (température, salinité, pH et fluorescence). Ces données sont récoltées en temps réel sur un pocket PC où le profil de fluorescence et de température apparaît, ce qui nous permet de sélectionner la profondeur du prélèvement dans la couche homogène de surface (5-10 m).

### **2. 1. 1. Analyses des sels nutritifs**

Les teneurs en sels nutritifs ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{Si}(\text{OH})_4$ ,  $\text{PO}_4$ ) ont été mesurées par autoanalyseur.

### **2. 1. 2. Mise en œuvre des méthodes de diversité pigmentaires et acquisition des données**

Les pigments ont été analysés en utilisant la méthode de Van Heulekem et Thomas (2001) selon le protocole de Ras et Claustre in Hooker et al (2010). La méthode a été mise en place au laboratoire en mars 2012. Les standards fournis par DHI sont trop peu concentrés pour que l'on puisse confectionner un standard complet, contenant l'ensemble des molécules. Il n'est donc pas possible d'effectuer une calibration simultanée pour l'ensemble des composés. Les calibrations pour chacun des 24 composés standards (caroténoïdes et chlorophylles) ont été réalisées indépendamment pour chaque molécule sur un minimum de 5 concentrations comprises entre 50 et 1000 ng par ml (soit plus de 200 chromatographies réalisées de mai à juillet).

Pour déterminer la structure de taille du phytoplancton (micro- > 20 $\mu\text{m}$ , nano- : 3-20  $\mu\text{m}$ , et picophytoplancton < 3  $\mu\text{m}$ ), trois fractions sont obtenus par filtration différentielle des échantillons. L'ensemble des 78 échantillons a été analysé par HPLC en octobre 2013, périodiquement les analyses sont répliquées pour vérifier la bonne reproductibilité des protocoles.

### **2. 1. 3. Mise en œuvre des méthodes de diversité génétiques (metabarcoding) et acquisition des données**

Le développement et l'application des protocoles d'analyse génétique des échantillons prélevés en 2012 par metabarcoding ont été effectués en collaboration avec le groupe phytoplancton de la Station Biologique de Roscoff qui est parmi les leaders mondiaux pour le développement des méthodes de metabarcoding de protistes marins, et un partenaire incontournable pour l'assignation des séquences issues du pyroséquencage, l'analyse et le nettoyage des données et l'interprétation des résultats. Les analyses génétiques pré-pyroséquencage ont été effectuées en Avril 2013 avec un déplacement de 1 mois de R. Siano à la Station Biologique.

Pour les analyses de la diversité génétique, les échantillons (filtrés) de trois classes de taille (micro- > 20  $\mu\text{m}$  ; nano- 3-20  $\mu\text{m}$  ; picoplancton 0,22-3  $\mu\text{m}$ ) de protistes marins ont été prélevés. L'ADN extrait des filtres (kit Nucleo Spin Plant II) a été quantifié (Picogreen Quant-it Kit) et la région V4 du 18S rDNA (480-560 bp) a été amplifiée en triplicatas avec les amorces Forward : 18S-8r12 5'-CCAGCASCYGC GGTAATTCC-3' et Reverse: 18S-REV1mod 3'-TTTAAGTTTCAGHCTTGCG-5'. Ces amorces et le fragment génétique ciblé (V4 18rDNA) permettent d'analyser l'ensemble des protistes marins, autotrophes et hétérotrophes confondus, et ainsi de caractériser la totalité des organismes présents dans un écosystème. Cette approche est incontournable si l'on s'intéresse à la compréhension de la biodiversité marine et à son fonctionnement. Les produits d'amplification ont été purifiés, re-quantifiés, et pyroséquencés par 454 GS-FLX (Beckman Coulter Genomics – USA – 3 mois de délais après l'envoi des séquences). Les séquences ont été annotées en utilisant la base PR2 (Protist

Ribosomal Reference database <http://ssu-rna.org/>). Une analyse manuelle et/ou l'introduction des nouvelles séquences dans la base ont permis de préciser certaines annotations au niveau de l'espèce ou du clade génétique (infraspécifique). Ce travail d'annotation d'une durée de 2 mois, a été effectué en collaboration avec R. Christen de l'Université de Nice et la Station Biologique de Roscoff. Pour la comparaison des échantillons, les données ont été normalisées et l'importance relative (%) de chaque OTU (Operational Taxonomic Unit) dans chaque échantillon a été calculée.

**N.B.** *Un OTU (Operational Taxonomic Unit) en génétique et phylogénie est utilisé pour classer une espèce ou un groupe d'espèces en utilisant les données génétiques. Cette classification est faite à partir de la comparaison de séquences dans les données, avec les séquences d'une base de données générale. Par exemple on définit l'OTU « A. minutum » dans notre jeu de données de séquences si une comparaison positive existe avec au moins une séquence référence (certifiée) d'une base de données générale. Si la séquence est complètement identique à celle de la base de référence, l'identité OTU est de 100%, si elle ne l'est pas, l'identité OTU est <100%. Dans ce dernier cas il faut décider à quel niveau d'identité on s'arrête pour désigner un OTU (par exemple 98% ou 95%). Dans la présente étude, tous les OTUs sont désignés à 100%.*

#### **2. 1. 4 Analyses des échantillons de diversité morphologique par microscopie optique)**

Afin de comparer les analyses pigmentaires et génétiques à des connaissances classiques de biodiversité du phytoplancton et pouvoir donc valider les nouvelles méthodes utilisées pour l'analyse de la biodiversité, des échantillons de phytoplancton destinés à l'analyse morphologique ont été prélevés en même temps que les autres. L'analyse de ces échantillons est en cours, et la comparaison avec les autres méthodes d'analyse de la biodiversité est prévue en 2014.

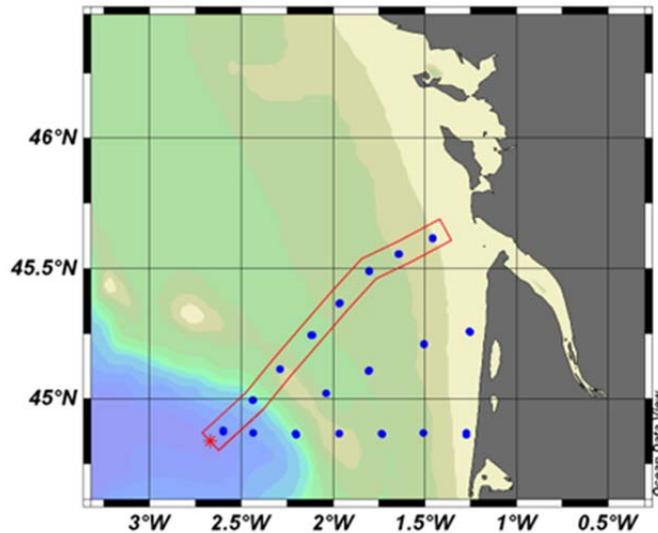
#### **2. 2 Prélèvement des échantillons de diversité spatiale**

La campagne Pelgas 2013 a été menée au mois de mai 2013 dans le Golfe de Gascogne. Le troisième Leg de la campagne (25-31 mai) a ciblé une radiale côte-large de l'embouchure de la Gironde aux accores du plateau, représentant donc un bon gradient environnemental correspondant probablement à des peuplements phytoplanctoniques différents.

Le long de cette radiale, 8 stations ont été échantillonnées à deux profondeurs (surface et au maximum de chlorophylle). Les prélèvements suivants ont été réalisés pour les analyses de la diversité phytoplanctonique :

- Analyse pigmentaire, 3 filtres (Total, > 3µm, < 20µm) (pico, nano, microplancton) ;
- Analyse de metabarcoding : 3 filtres (0.22-3 µm, 3-20µm, >20µm) (pico, nano, microplancton) ;
- Analyses en cytométrie du picoplancton (1 flacon) ;
- Analyses morphologiques en microscopie optique du nano et microplancton (1 flacon).

Les analyses de diversité pigmentaire, génétique et morphologique seront effectuées par le laboratoire DYNECO/Pelagos en 2014. Celles de cytométrie par le LOG de Wimereux (Felipe Artigas) en 2014. La comparaison des résultats issus des différentes méthodes d'analyse de la biodiversité est aussi envisagée en 2014.



**Fig. 1** Ensemble des stations d'échantillonnage de la campagne Pelgas 2013 avec la radiale de la Gironde sélectionnée pour les analyses de diversité spatiale.

### 3 Résultats des analyses de diversité temporelle

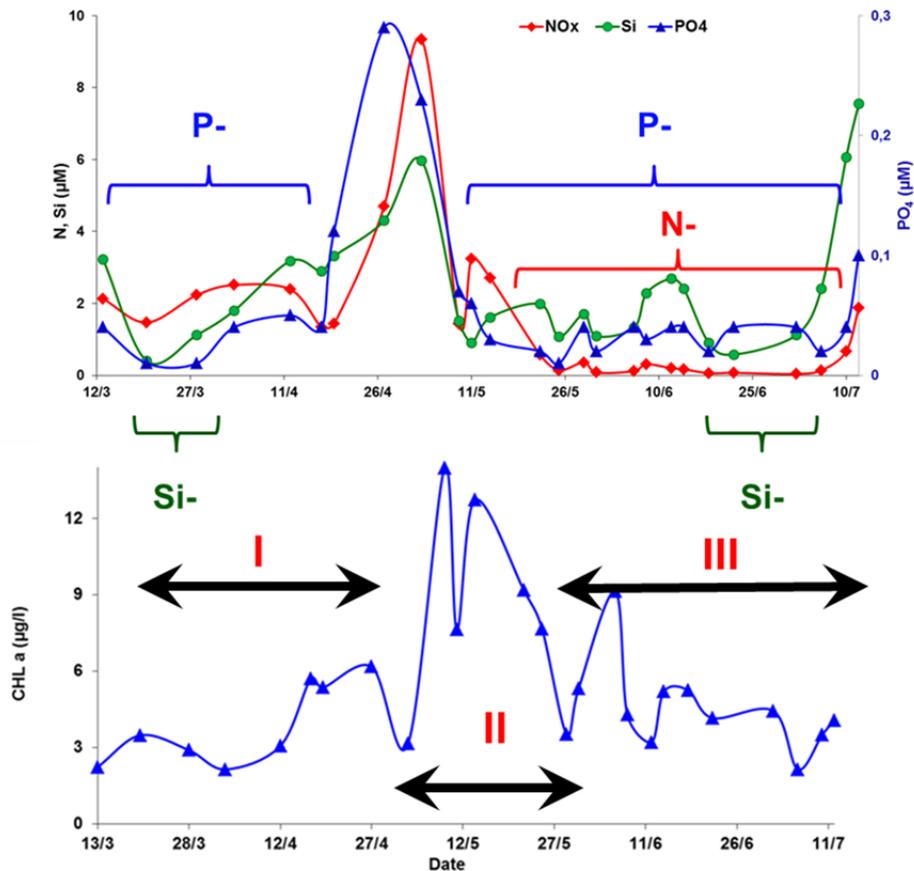
#### 3. 1 Contexte hydrologique

En fin d'hiver, début de printemps 2012, les teneurs en nutriments sont déjà faibles, mais on observe une forte augmentation des teneurs fin avril début mai, consécutive à une augmentation de la salinité des eaux liée au fort mélange vertical induit par un fort coup de vent les 23-25 avril (bulletin Previmer, n°16 avril juin 2012). Cet apport de sels nutritifs est rapidement consommé, puis ceux-ci restent présents en faible concentration pendant le reste de la période d'étude.

L'évolution des rapports N/P, Si/N et Si/P en parallèle à leur concentrations, montre que : pendant la première phase du suivi les teneurs en P sont fortement limitantes ( $N/P \gg 30$  et  $P < 0.05 \mu M$ ). Pendant l'enrichissement, il n'y a pas de limitation. Ensuite les teneurs en P et N deviennent fortement limitantes ( $N < 0.5 \mu M$ ,  $P < 0.04 \mu M$ ), les teneurs en Si sont basses, généralement comprises entre 1 et 2  $\mu M$  et deviennent ponctuellement limitantes. En fin de suivi elles ré-augmentent (7  $\mu M$ ) (Fig. 2)

Ainsi, **trois périodes peuvent être retenues** :

- **I** : mars-avril, les eaux sont essentiellement limités par les phosphates;
- **II** : fin avril-début mai, enrichissement des eaux en nutriments;
- **III** : juin-juillet, les eaux sont fortement limitées par N et P et occasionnellement par la silice.



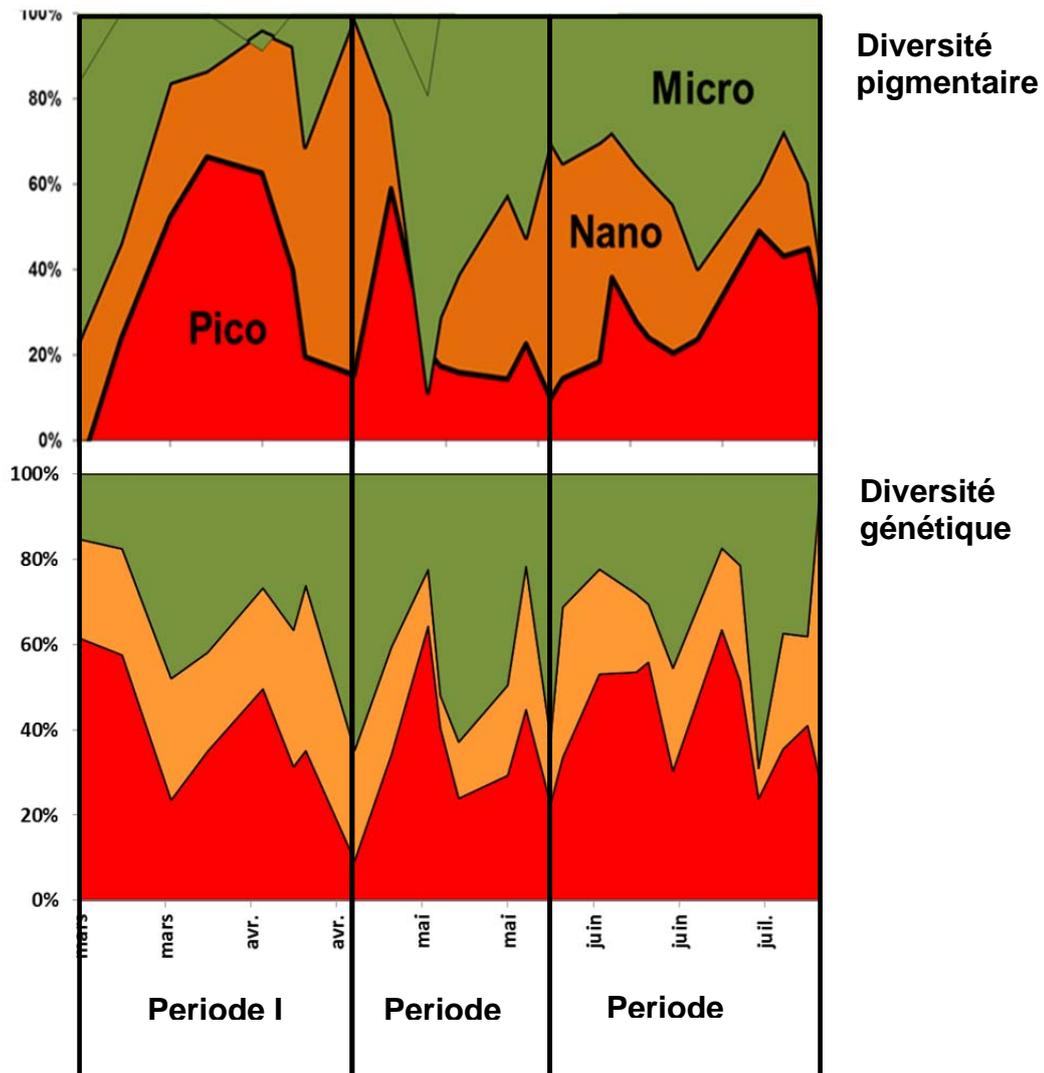
**Fig. 2** Evolution des concentrations de sels nutritifs et de la chlorophylle *a* (*chl a*) de mars à juillet 2012 en Baie de Concarneau. Trois périodes d'évolution de la *chl a* (I, II, III) ont été identifiées en relation aux teneurs en sels nutritifs.

### 3.2 Analyse pigmentaire

Les teneurs en *chl a* totale varient entre 2 et 5 µg/l en mars et avril, ensuite, consécutivement à l'apport de nutriments, elles augmentent fortement début mai (14 µg/l), puis décroissent en présentant des pulses.

Au cours des trois périodes précédemment décrites la distribution de la structure de taille de la chlorophylle présente des changements importants. Les fractions pico- (41% en moyenne) et nanophytoplanctoniques (42%) dominent pendant la première période. Pendant la forte poussée consécutive à l'enrichissement, la chlorophylle de la fraction microphytoplanctonique domine largement (56% en moyenne) et peut

représenter jusqu'à 86% de la chlorophylle (retenu comme indicateur de la biomasse micro-algale dans le cadre de la DCE) Enfin, en période post bloom, malgré des fluctuations temporelles, la chl a est approximativement répartie à parts égales dans les trois fractions. Sur l'ensemble de la période le picophytoplancton participe en moyenne à 30% de la biomasse, le nano à 32%, et le micro à 38%. Le microphytoplancton n'est dominant (> 50%) qu'environ 30 jours sur 120 (Fig. 3). Cet écosystème très côtier est donc largement dominé par le phytoplancton de petite taille (pico+ nano) quand les eaux sont limitées en nutriments.



**Figure 3** : Structures des peuplements planctoniques autotrophes par classe de taille (pico, nano et microphytoplancton) pendant les trois périodes identifiées dans la Fig. 2

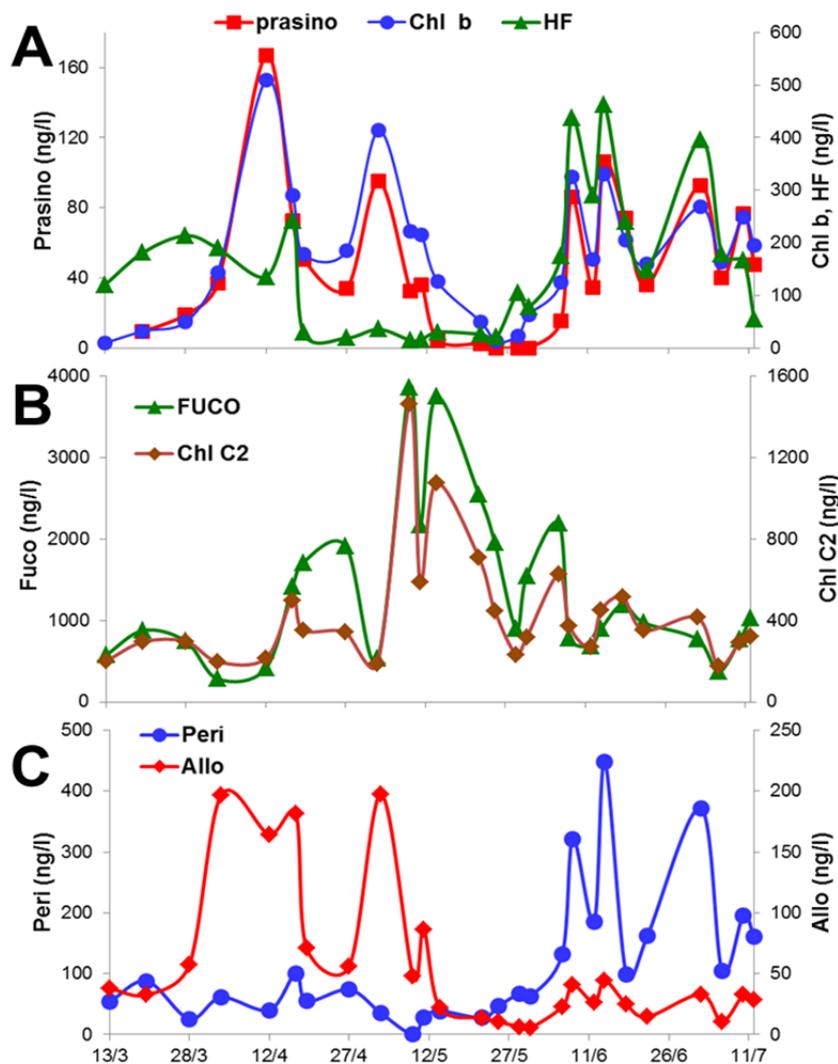
**Tableau 1** Importance relative (min-max, moyenne) du pico-, nano- et microphytoplancton pendant les trois périodes identifiées sur la base des analyses de diversité pigmentaire et génétique

	Diversité pigmentaire			Diversité génétique		
	Période I	Période II	Période III	Période I	Période II	Période III
<b>Picophytoplacton</b>	16-69% <b>41%</b>	14-59% 26%	10-50% 29%	9-61% <b>38%</b>	23-64% 37%	24-63% <b>43%</b>
<b>Nanophytoplancton</b>	12-84% <b>42%</b>	11-40% 18%	11-60% 32%	23-39% 28%	8-34% 18%	7-66% 26%
<b>Microphytoplancton</b>	1-70% 17%	52-86% <b>56%</b>	28-60% 39%	15-65% 35%	22-63% <b>44%</b>	5-69% 32%

Les biomarqueurs pigmentaires présentent des indications taxonomiques variables. Certains peuvent être ubiquistes, comme la chlorophylle *a* qui est présente chez tous les végétaux autotrophes, d'autres sont caractéristiques de « groupes taxonomiques : alloxantine pour les cryptophycées, péridine pour les dinophycées, prasinoxanthine pour les prasinophycées, d'autres enfin sont communs à plusieurs groupes. Les biomarqueurs pigmentaires sont donc à même de fournir des indications sur les catégories taxonomiques présentes.

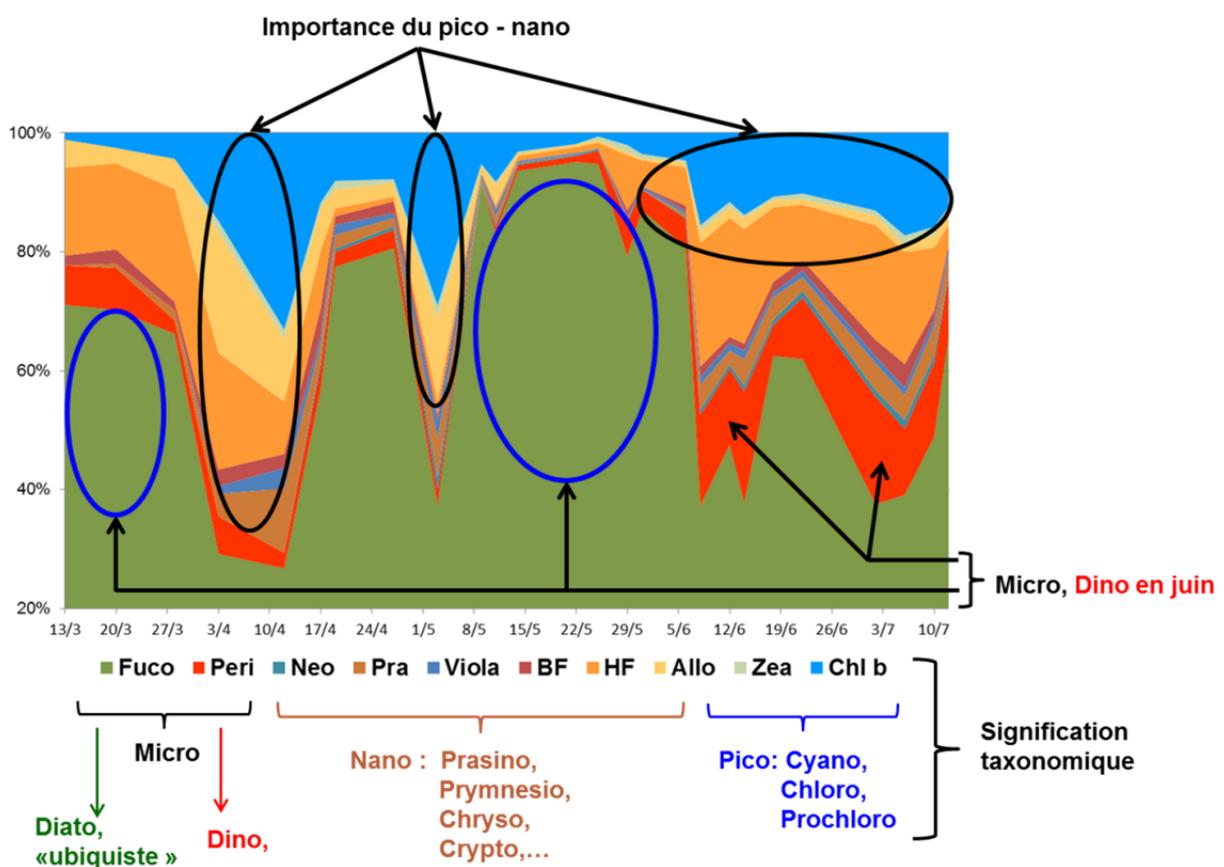
Enfin la distribution des pigments au sein des différents groupes taxonomiques permet, en associant différents composés d'estimer la distribution en classe de tailles du phytoplancton (Claustre, 1994, Vidussi et al, 2001). Voir annexe 1.

On peut distinguer trois types d'évolution temporelle des caroténoïdes ; certains comme la prasinoxanthine, la chlorophylle *b*, ou la 19'hexanoyloxyfucoxanthine sont présents en quantités importantes pendant les périodes I et III quand la croissance des algues est limitée par les nutriments (P et P+N) et / ou quand le pico et le nano dominant (Fig. 4A). D'autres, fucoxanthine et chlorophylle C<sub>2</sub> sont particulièrement abondants pendant la forte poussée de diatomées microphytoplanctoniques consécutive à l'enrichissement en sels nutritifs (Période II Fig. 4B). D'autres, enfin, sont présents soit pendant la première période (alloxanthine, caractéristique des Cryptophyceae) ou pendant la période III (péridine, caractéristique des Dinophyceae, Fig 4C).



**Figure 4 :** Evolution temporelle caractéristique des pigments indicateurs du pico et du nanophytoplancton (A), du microphytoplancton (diatomées) (B), des dinoflagellés et des cryptophytes (C).

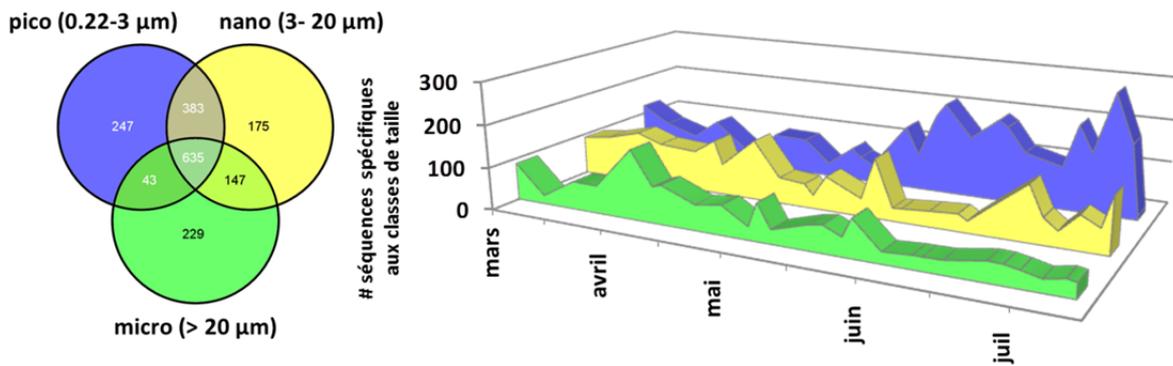
Si l'on examine l'importance relative des pigments « diagnostiques », c'est-à-dire caractéristiques de certains groupes du phytoplancton (Fig.5) on peut noter que les marqueurs caroténoïdes du picophytoplancton (chlorophylle *b* et zéaxanthine) et du nanophytoplancton sont bien représentés en avril (période I) et en juin (période III). Inversement les caroténoïdes du microphytoplancton (fucoxanthine et périidine) sont particulièrement abondants en tout début du suivi (mars), au mois de mai, consécutivement à l'apport de nutriments (période II). A noter l'importance prise par la périidine en juin suggérant la mise en place d'une population de dinoflagellés en début de période estivale, confirmé par les analyses microscopiques. Enfin, il faut souligner que l'information taxonomique supportée par la distribution des pigments caroténoïdes est parfaitement cohérente avec celle fournie par l'analyse de la structure de taille de la chlorophylle a.



**Figure 5 :** Evolution temporelle de la distribution relative des biomarqueurs pigmentaire: (fraction totale) montrant la succession des populations phytoplanctoniques.

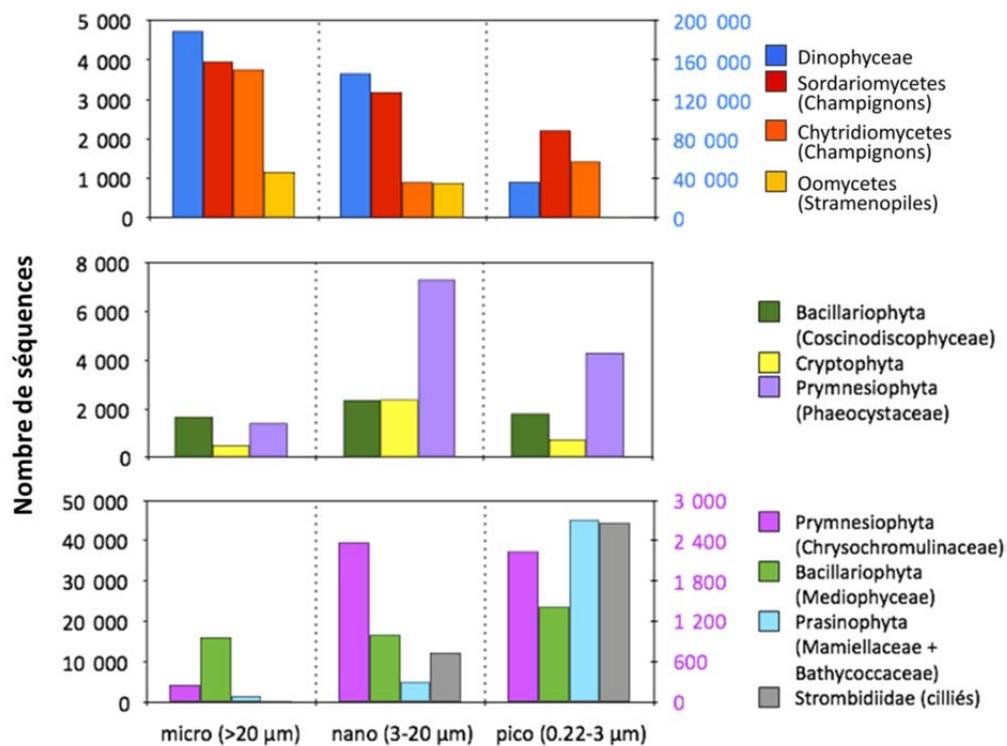
### 3.3 Diversité génétique

Grace à l'approche de metabarcoding, 1859 différentes OTUs, hétérotrophes et autotrophes confondus, ont été identifiées. Seulement 635 d'entre elles (soit 34%) sont communes aux trois fractions de taille. Les 13%, 9% et 12% des OTUs totales sont respectivement caractéristiques du pico-, nano, et microplancton. L'abondance (nombre total de chaque OTUs et de leurs copies) d'OTUs pendant la période d'analyse reste relativement stable entre 52388 et 79507, par contre le nombre des OTUs spécifiques au picoplancton augmente à partir du mois de mai (Fig. 6). Ceci montrerait que les organismes de trois fractions de taille se développeraient de manière indépendante pendant la période d'étude.



**Figure 6** : Diversité et dynamique temporelle des OTUs caractéristiques de chaque fraction de taille.

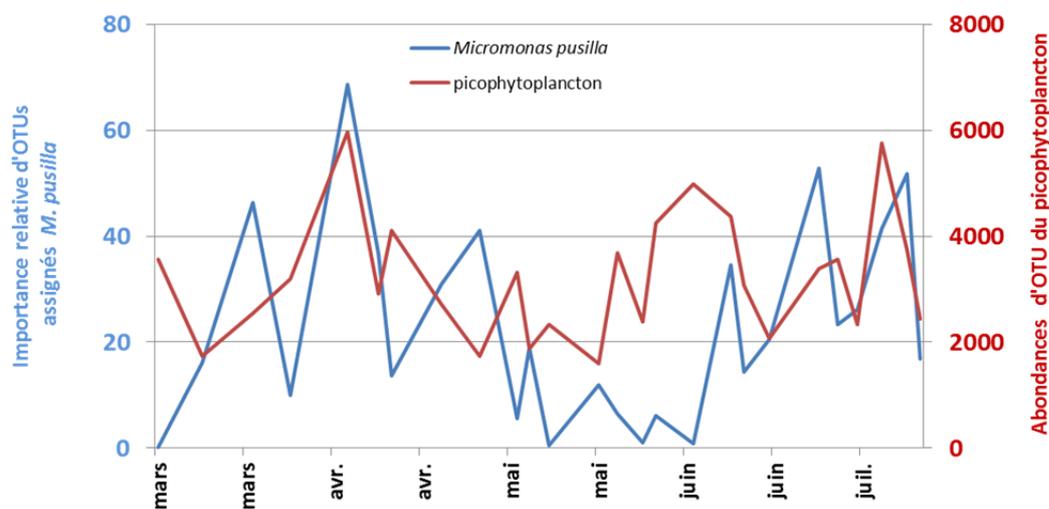
En analysant les nombres totaux de séquences des OTUs de chaque groupe/famille d'organismes identifiés il est possible de mettre en évidence des groupes caractéristiques pour chaque fraction de taille. Les séquences de champignons marins, qui sont des organismes en général de petite taille (<10µm) sont plus nombreuses dans le microplancton. La présence de champignons marins dans le microplancton mettrait en évidence l'existence de possibles relations symbiotiques (mutualisme ou parasitisme) entre ces organismes et d'autres organismes de plus grosse taille. Les séquences de certains ciliés qui appartiennent typiquement au microplancton (par exemple les Strombididiidae) sont plus abondantes dans le picoplancton. Les structures cellulaires de ces ciliés étant très fragiles, la présence de leurs séquences dans le picoplancton peut être expliquée par une rupture des cellules au moment de la filtration qui aurait causé une accumulation des débris de cellules de ciliés dans la plus petite fraction de taille. Les diatomées (Bacillariophyta), les dinoflagellés (Dinophyceae ou Dinophyta) et les Prymnesiophyta sont présentes dans toutes les fractions de taille. Les séquences de Dinophyceae sont plus abondantes dans le microplancton, celles des Prymnesiophyta (Chrysochromulinaceae et Phaeocystaceae) dans le nano-picoplancton. Parmi les diatomées les séquences de Coscinodiscophyceae et Mediophyceae sont plus abondantes respectivement dans le nano et pico plancton. Les Cryptophyta sont typiques du nanoplancton et le Prasinophyta du picoplancton (Fig. 7).



**Figure 7 :** Groupes d'organismes planctoniques typiques de chaque fraction de tailles identifiés sur la base de l'abondance absolue de leurs OTUs.

Si l'on ne s'intéresse qu'aux organismes autotrophes et à leur évolution dans le temps pendant la période d'échantillonnage on s'aperçoit que l'importance relative en termes de nombre d'OTUs des organismes du micro, nano et picophytoplancton varie avec le temps. Les trois périodes identifiées par les analyses pigmentaires en relation avec les concentrations en sels nutritifs sont identifiables aussi par le biais des analyses génétiques. Pendant la première période (mars – avril) l'abondance d'OTUs retrouvée dans la fraction du picophytoplancton est en général plus élevée (38% en moyenne) que dans ceux du nano et microphytoplancton. Pendant la deuxième période (mai) le nombre d'OTUs du microphytoplancton est plus élevé (44% en moyenne), et enfin pendant la troisième période (juin - juillet) le nombre d'OTUs du picophytoplancton redevient plus abondant (43% en moyenne). Il est donc possible de mettre en évidence l'alternance de l'importance relative du picophytoplancton au microphytoplancton (comme montré dans la Fig. 2 et le Tableau 1). Toutefois il est important de souligner que pour 22 des 26 dates considérées le nombre d'OTUs du pico et nanophytoplancton ensemble représentent plus du 50% du nombre total d'OTUs identifiées, pouvant atteindre jusqu'à 95% des séquences totales.

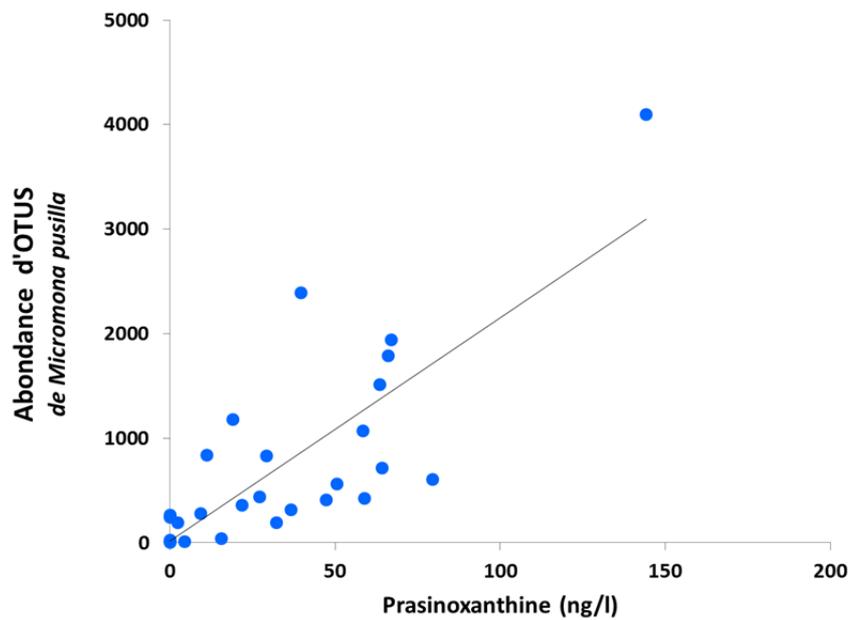
Dans le picoplancton, parmi les Prasinophyceae, les OTUs assignés à l'espèce *Micromonas pusilla* peuvent représenter jusqu'à le 69% (14 Avril) du nombre total d'OTUs du picophytoplancton. L'évolution de l'importance relative de *M. pusilla* est cohérente avec l'abondance totale d'OTUs du picophytoplancton pour la première et la troisième période de l'échantillonnage. Pendant la deuxième période, des OTUs assignés à *Bathycoccus prasinos* et *Ostreococcus* spp. (Prasinophyceae) ont été aussi retrouvées (Fig. 8).



**Figure 8:** Evolution temporelle de l'importance de *M. pusilla* (Prasinophyceae) en relation avec l'abondance d'OTUs du picophytoplancton

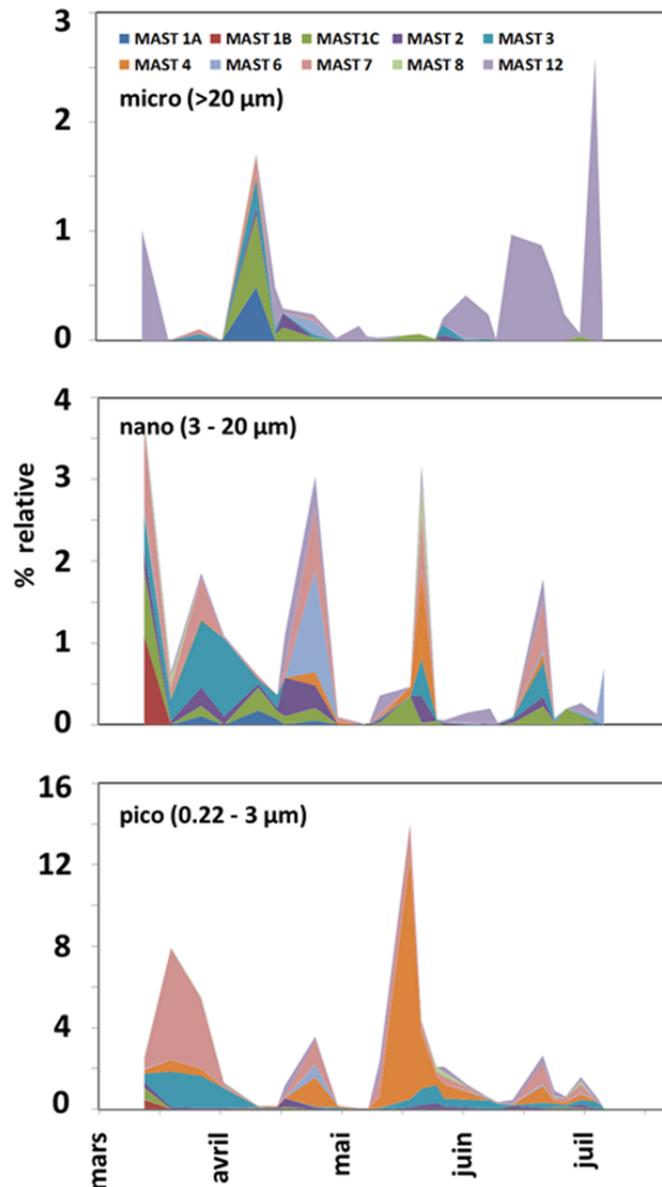
Une corrélation significative ( $R^2 = 0.6$ ) existe entre le nombre total des OTUs assignées à l'espèce *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) et la prasinoxanthine, pigment caroténoïde caractéristique des Prasinophyceae (Fig. 9).

Cette corrélation positive souligne une bonne convergence des analyses pigmentaires et génétiques pour l'analyse de la biodiversité du picophytoplancton.



**Figure 9 :** Relation entre l'abondance des OTUs assignés à *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) et les teneurs en prasinoxanthine

Des populations génétiquement différentes de protistes marins caractérisent les trois fractions de taille. Parmi les organismes hétérotrophes par exemple, l'importance relative des différents clades (1-12) génétiques des Marine Stramenopiles (MAST – flagellés hétérotrophes prédateurs ou parasites de 2-20  $\mu\text{m}$  en taille) varie en fonction de la classe de taille et avec le temps. Le clade 12 domine le microplancton pendant le période estivale tardive, tandis que le clade 4 est plus important au mois de mai et dans le nanoplancton (Fig. 10).



**Figure 10.** : Evolution temporelle de l'importance relative de 12 clades génétiques de Marine Stramenopiles (MAST) par fraction de taille.

Les résultats des analyses génétiques par metabarcoding sur les échantillons de la Baie de Concarneau ont été présentés sous forme de poster à l'occasion du 2ème Congrès de Génomique Environnementale qui a eu lieu à Rennes du 4 au 6 novembre 2013 (voir Annexe 2). Ce congrès réunit les communautés nationales qui travaillent sur le metabarcoding d'organismes marins et terrestres et il représente une occasion unique d'échanges sur la technologie, les stratégies d'échantillonnage, les protocoles d'analyse et l'analyse des résultats.

#### 4. Conclusions

Les résultats obtenus par les méthodes d'analyses pigmentaires et de metabarcoding montrent une bonne résolution de la biodiversité phytoplanctonique, pouvant représenter au niveau des groupes ou familles (diversité pigmentaires) ou au niveau des espèces ou des clades génétiques (metabarcoding) toutes les classes de taille du phytoplancton y compris celles du pico (<3µm) ou du nano (3-20 µm), qui ne sont pas prises en compte dans les analyses morphologiques de microscopie optique. Cette caractérisation exhaustive de la biodiversité permet une vision globale de la diversité du phytoplancton qui est incontournable si l'on veut décrire des indices de composition qui se démarquent des indices essentiellement liés au micro-phytoplancton, comme l'indice d'abondance actuellement utilisé pour l'indicateur DCE en Manche Atlantique (basé sur les blooms des taxons identifiables au microscope optique).

La structure de taille du phytoplancton est clairement contrôlée par la richesse en nutriments des eaux, les formes pico et nanophytoplanctoniques dominent dès que les sels nutritifs deviennent limitants.

Cette distribution de la structure de taille de la chlorophylle est confirmée par la distribution des pigments caroténoïdes caractéristiques du pico et du nanophytoplancton. Celle-ci nous renseigne également sur l'importance quantitative et l'évolution temporelle de certaines classes de phytoplancton (eg dinophycées, prasinophycées, cryptophycées, etc.)

L'approche metabarcoding a permis d'identifier des groupes de protistes typiques du micro, nano et picoplancton, et la diversité des OTUs évolue dans le temps de façon différente pour les trois classes de taille.

Les séquences du pico et nanophytoplancton ensemble représentent dans la plupart des cas plus du 50% du nombre total d'OTUs identifiées, pouvant être ainsi dominantes dans la communauté phytoplanctonique de la Baie de Concarneau.

Les analyses génétiques montrent que les OTUs assignés aux Prasinophyceae, et en particulier à *Micromonas pusilla*, représentent une grande partie du picophytoplancton. Des études sont encore nécessaires pour identifier le Prasinophyceae ou l'espèce *M. pusilla* comme indicateur de toute la communauté picophytoplanctonique.

La diversité génétique infraspécifique (séparation en clades) chez certains groupes ou morpho-espèces de protistes marins correspond à une phénologie différente (saisonnalité et/ou variation de l'importance relative) dans l'écosystème.

## 5. Perspectives de recherche d'indice de composition

Les analyses pigmentaires et de metabarcoding mettent en évidence l'importance des compartiments du nano et picophytoplancton qui peuvent souvent être dominants au sein des communautés phytoplanctoniques des écosystèmes côtiers. Il a été aussi démontré que les changements de structure de taille et la variation des dominances du micro- phyto versus les pico-nanoplancton est en lien avec la disponibilité de ressources abiotiques.

Une première piste de recherche pour la définition d'un indice de composition pourrait tenir compte de cette variabilité des structures de taille en fonction des forçages en définissant quel(s) compartiment(s) (micro, nano, pico) serait dominant dans certaines conditions environnementales.

Une deuxième piste de recherche consisterait à aller plus dans les détails de la caractérisation de la biodiversité (par famille jusqu'aux espèces) des différents compartiments des communautés phytoplanctoniques pour définir quelle(s) famille(s) ou espèce(s) pourrait être représentative d'un certain compartiment.

Les analyses de metabarcoding ont montré l'importance relative élevée des OTUs assignées aux Prasinophyceae et en particulier à l'espèce *Micromonas pusilla*. De plus une corrélation positive entre les abondances d'OTUs de cette espèce et les teneurs en prasinoxanthine, pigment typique des Prasinophyceae, a été mise en évidence. Les Prasinophyceae et une espèce en particulier, *Micromonas pusilla*, seraient donc une famille importante au sein du picophytoplancton et probablement un indicateur de sa composition. Il reste encore à confirmer que I) cette famille soit importante dans d'autres écosystèmes et le long de gradients environnementaux (analyses prévues en 2014 sur la radiale de la Gironde) et II) qu'elle soit représentative de la communauté picophytoplanctonique dans son intégralité. Des analyses statistiques précises sur plusieurs jeux de données sont nécessaires pour vérifier l'hypothèse que les Prasinophyceae et/ou l'espèce *Micromonas pusilla* puissent être un indice de composition de la communauté picophytoplanctonique.

# Annexe 1 : Les pigments : marqueurs taxonomiques et de la structure en taille des populations phytoplanctoniques.

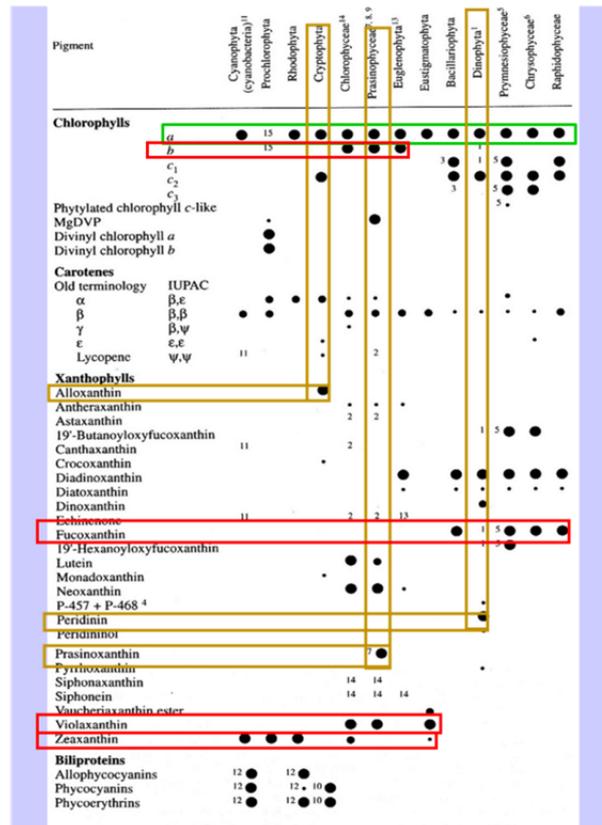
## Major marker pigments

**Ubiquitous**  
**Chl a**

**Unambiguous**  
**Alloxanthin**  
**Peridinin**  
**Prasincoxanthin**

**Communs**  
**e.g.**  
**Fucoxanthin**  
**Chl b**  
**Zeaxanthin**  
**Violaxanthin**

Jeffrey and Vesk (1997)



Pigment	Signification taxonomique	taille
Zea	Cyanobactéries + Prochlorophycées	< 2 µm
T chl b	Chlorophycées + Prochlorophycées	< 2 µm
19 HF + 19 BF	Nanoflagellés chromophycées	2-20 µm
Allo	Cryptophycées	2-20 µm
Fuco	Diatomées	> 20 µm
Peri	Dinoflagellés	> 20 µm

$$BP \text{ pico} = (Zea + chl \ b) / \sum DP$$

$$BP \text{ nano} = (Allo + 19BF + 19 HF) / \sum DP$$

$$BP \text{ micro} = (Fuco + Péri) / \sum DP$$

Claustre H. 1994. The trophic status of various oceanic provinces as revealed by phytoplankton pigment signatures. *Limnol oceanogr.* 39 : 1206-1210.

Jeffrey SW , Vesk M., 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds) Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods . UNESCO, Paris .37-84

Vidussi F, et al 2001. Phytoplankton pigment distribution in relation to upper thermocline circulation in yhe eastern mediterranean sea during winter J Geophy res 106, C9 :19939-19956.

## **Annexe 2 : abstract et poster Congrès Génomique Environnementale de Rennes (4-6 Novembre 2013)**

### **DIFFERENTIATION TEMPORELLE DES NICHES ECOLOGIQUES DES PROTISTES MARINS**

Raffaele Siano<sup>1</sup>, Julien Quéré<sup>1</sup>, Richard Christen<sup>2</sup>, Laure Guillou<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ifremer – Centre de Bretagne, DYNECO/Pelagos Technopôle Brest Iroise - BP 7029280 Plouzané (France)

<sup>2</sup> CNRS UMR 7138. Parc Valrose Université de Nice. BP 71, 06108 NICE CEDEX 02 (France)

<sup>3</sup> Station Biologique de Roscoff (CNRS/UPMC) UMR 7144/DIPO Place Georges Teissier 29680 Roscoff (France)

Les protistes marins sont caractérisés par une très forte diversité. La coexistence de nombreuses espèces au sein d'une même masse d'eau relativement homogène constitue un véritable paradoxe. La diversification des niches écologiques (saisonnalité, rôles fonctionnels, interactions) est très probablement à l'origine de cette coexistence et permet également la stabilité des écosystèmes marins. Caractériser ces niches écologiques est aujourd'hui primordial dans la compréhension du fonctionnement des écosystèmes et de l'écologie des microorganismes marins. Dans cette étude, nous avons choisi d'aborder cette question par le suivi temporel des communautés sur des pas de temps relativement resserrés en essayant de définir si des espèces/groupes planctoniques proches génétiquement ont une période d'occurrence différente ou synchrone, ce qui pourrait suggérer une différenciation en niches particulières ou de possibles associations privilégiées (coopérations type mutualisme ou commensalisme et interactions antagonistes).

Pour cela des échantillons de trois classes de taille (micro > 20 µm ; nano > 3µm ; pico > 0.22 µm) de protistes marins ont été prélevés dans les eaux de surface de la Baie de Concarneau (Bretagne Sud) pendant la période de Mars à Juillet 2012 avec une fréquence d'échantillonnage bi-hebdomadaire. La diversité génétique des protistes a été analysée par séquençage à haut débit (Roche 454 GS- FLX, région V4 du 18S). Cette approche nous a permis effectivement de caractériser de manière précise l'évolution de la biodiversité de la communauté échantillonnée tout en étudiant la phénologie de certains groupes de protistes marins autotrophes et/ou hétérotrophes.

Une première annotation utilisant la base de données PR2 (Protist Ribosomal Reference database, <http://ssu-rna.org/>) a permis de révéler la dominance des Stramenopiles durant toute la durée de l'échantillonnage au sein des trois classes de taille analysées. La diversité génétique des groupes les plus abondants a ensuite été finement analysée par similarité de séquence avec les références de la Base PR2. En cas d'assignation imprécise, une analyse manuelle a permis (pour les reads abondants) soit d'améliorer la qualité de l'annotation dans PR2, soit d'introduire dans PR2 de nouvelles séquences de référence. Ce travail aboutit à la discrimination la plus fine possible des différents génotypes le long de notre suivi et à la discrimination temporelle des niches écologiques au sein du plancton marin.

# DIFFERENTIATION TEMPORELLE DES NICHES ECOLOGIQUES DES PROTISTES MARINS



raffaele.siano@ifremer.fr

Raffaële Siano<sup>1</sup>, Julien Quéré<sup>1</sup>, Richard Christen<sup>2</sup>, Laure Guillou<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ifremer – Centre de Bretagne, DYNECO/Pelagos, Technopôle Brest Iroise - BP 7029280 Plouzané (France)

<sup>2</sup> CNRS UMR 7138, Parc Valrose Université de Nice, BP 71, 06108 NICE CEDEX 02 (France)

<sup>3</sup> Station Biologique de Roscoff (CNRS/UPMC) UMR 7144/DIPO, Place Georges Teissier 29680 Roscoff (France)

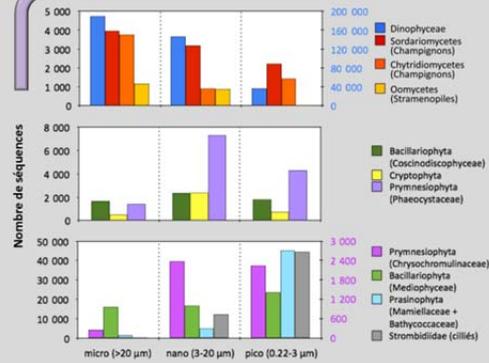


Caractériser les niches écologiques des microorganismes marins est essentiel pour essayer d'expliquer la coexistence des nombreuses espèces au sein d'une même masse d'eau relativement homogène (paradoxe d'Hutchinson, 1961). Cette question a été abordée par le suivi temporel des communautés sur un pas de temps relativement resserré et par une approche de metabarcoding.



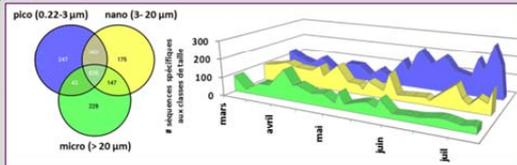
Des échantillons (filtres) de trois classes de taille (micro > 20 µm ; nano 3-20 µm ; pico 0.22-3 µm) de protistes marins ont été prélevés dans les eaux de surface de la Baie de Concarneau (Bretagne Sud) pendant la période de Mars à Juillet 2012 avec une fréquence d'échantillonnage bi-hebdomadaire.

L'ADN extrait des filtres (kit Nucleo Spin Plant II) a été quantifié (Picogreen Quant-it Kit) et la région V4 du 18S rDNA (480-560 bp) a été amplifiée en triplicatas. Les résultats de l'amplification ont été purifiés, re-quantifiés, et pyrosequencés par 454 GS-FLX (Beckman Coulter Genomics – USA). Les séquences ont été annotées en utilisant la base PR2 (Protist Ribosomal Reference database <http://ssu-rrna.org/>). Une analyse manuelle et/ou l'introduction des nouvelles séquences dans la base ont permis de préciser certaines annotations au niveau de l'espèce ou du clade génétique (intraspécifique). Pour la comparaison des échantillons, les données ont été normalisées et l'importance relative (%) de chaque OTU (Operational Taxonomic Unit) dans chaque échantillon a été calculée.



Des groupes caractéristiques de chaque fraction de taille ont été identifiés.

Les séquences de champignons marins sont plus nombreuses dans le microplancton, celles des certains ciliés dans le picoplancton. Le nano- et picoplancton sont caractérisés par différentes familles de diatomées (Bacillariophyta) et Prymnesiophyta. Les Cryptophyta sont typiques du nanoplancton.



1859 OTUs ont été identifiés, et seulement 635 (=34%) sont en commun aux trois fractions de taille.

Le nombre des OTUs spécifiques au picoplancton augmente à partir du mois de mai, mais leur nombre totale reste relativement stable. Ceci indique que la richesse spécifique augmente pour cette fraction de taille pendant la période estivale.

## Conclusions et Perspectives

L'approche metabarcoding a permis d'identifier des groupes de protistes typiques du micro-nano et picoplancton.

La diversité des OTUs et son évolution dans le temps est différente pour les trois classes de taille.

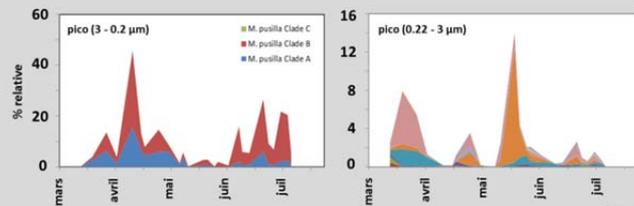
La diversité génétique intraspécifique (séparation en clades) chez certains groupes ou morpho-espèces de protistes marins correspond à une phénologie différente (saisonnalité et/ou variation de l'importance relative) dans l'écosystème.

Il est envisagé de comparer ces données de diversité génétique avec les données de microscopie optique et de taxinomie pigmentaire.

L'importance relative des différents clades (1-12) génétiques des Marine Stramenopiles (MAST – flagellés hétérotrophes prédateurs ou parasites de 2-20 µm en taille) varie en fonction de la classe de taille et avec le temps.

Le clade 12 domine le microplancton pendant la période estivale tardive, tandis que le clade 4 est plus important au mois de mai et dans le nanoplancton.

Les trois principaux clades génétiques (A,B,C) de la microalgue *Micromonas pusilla* (Mamiellaceae) sont détectés, et représentent jusqu'à 46% des séquences du picoplancton. L'importance relative du clade B par rapport au clade A augmente au cours de l'année.



Remerciements: Dr. Mathieu Guri pour sa collaboration pour les analyses génétiques. Ce travail rentre dans les objectifs de recherche d'indices de biodiversité du phytoplancton marin (financement ONEMA).