



**HAL**  
open science

# Distribution des principaux groupes d'eucaryotes de petite taille en milieu marin et lacustre

Sylvie Masquelier

► **To cite this version:**

Sylvie Masquelier. Distribution des principaux groupes d'eucaryotes de petite taille en milieu marin et lacustre. Biodiversité et Ecologie. Paris 6, 2009. Français. NNT: . tel-01111020

**HAL Id: tel-01111020**

**<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01111020v1>**

Submitted on 29 Jan 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



LE GOUVERNEMENT  
DU GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG  
Ministère de la Culture, de l'Enseignement  
supérieur et de la Recherche

**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Océanologie biologique – Environnements marins et lacustres

**Ecole doctorale Diversité du vivant**

Présentée par  
Sylvie Masquelier

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**Distribution des principaux groupes d'eucaryotes  
de petite taille en milieu marin et lacustre**

Soutenue le 19 janvier 2009

Devant le jury composé de :

Dr Daniel Vaultot, CNRS - Station Biologique de Roscoff	Directeur de thèse
Dr Lucien Hoffmann, CRP Gabriel Lippmann, Luxembourg	Rapporteur
Dr Marcel Veldhuis, NIOZ, Netherlands	Rapporteur
Pr Philippe Lebaron, UPMC – Laboratoire Arago, Banyuls/mer	Examineur
Dr Isabelle Domaizon, Université de Savoie, Bourget du lac	Examineur
Dr Nathalie Simon, UPMC – Station Biologique de Roscoff	Examineur

## Remerciements

*J'aimerais tout d'abord remercier Daniel qui m'a permis d'effectuer ma thèse dans son équipe et qui a été une source de conseils précieux pour la mener à bien.*

*Bien sûr, réaliser sa thèse à Roscoff n'aurait pas été aussi enrichissant sans l'équipe Plancton Océanique dont la compétence, la sympathie et la bonne humeur quotidiennes ne sont plus à démontrer. Je vous remercie tous pour votre accueil et pour votre gentillesse. Et plus particulièrement aux thésards, Aurélie notamment pour les supers plongées faites avec toi ; Elodie la campagne en Mer du Nord m'aura permis de mieux te connaître et de découvrir quelqu'un de valeur ; Mimi pour les conversations, ton humour et ta gentillesse.*

*Un grand merci également aux membres de l'équipe EVA du CRP Gabriel Lippmann au Luxembourg, plus particulièrement Nicolas, Delphine, Julie, Laurent, François, Isabelle, Raphaël, Henry-Michel et Lucien Hoffmann pour leur aide lors des sorties échantillonnage sur le lac d'Esch-sur-Sûre. J'ai bien entendu également une pensée pour les « anciens » du CRP qui se reconnaîtront et avec lesquels j'ai passé de très bons moments.*

*Merci à Cécile Lepère, Jean-François Mangot et Isabelle Domaizon pour m'avoir fourni les échantillons des lacs Pavin, du Bourget et Aydat.*

*J'aimerais également remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Enfin, merci à mes amis, et surtout à ma famille.*

*A maman et papa qui ont toujours été présents. Nathalie, merci pour les photos régulièrement envoyées, histoire que je reconnaisse mes neveux lors de mes retours à la maison. Marraine, merci pour tes appels réguliers. Thomas, tes bouquets et tes coups de fils interminables étaient des petits rayons de soleil dans ma vie au quotidien. Aller, au revoir, voir, voir...Sophie, tu es la lumière qui éclaire ma vie, sans toi je ne suis plus que l'ombre de moi-même. Toky, « mon grand frère », tu permets entre autre, à la lumière de ma vie d'être plus brillante chaque jour, merci. Martial, merci pour tout et surtout pour ta patience.*

# SOMMAIRE

## Chapitre I : Introduction

I. 1 Le phytoplancton	p.1
I. 2 Le plancton de petite taille	p.2
I. 2.1 Importance du plancton de petite taille	p.3
I. 2.2 Diversité au sein du plancton eucaryote de petite taille	p.6
I. 3 Taxons étudiés	p.8
I. 3.1 Chlorophyta	p.8
I. 3.2 Haptophyta	p.12
I. 4 Milieux étudiés	p.14
I. 4.1 Le lac d'Esch-sur-Sûre (Luxembourg)	p.14
I. 4.2 Les lacs français Pavin, du Bourget et Aydat	p.14
I. 4.3 La Manche et la Mer du Nord (Microvir 2007)	p.16
I. 4.4 Le Pacifique Sud-Est (BIOSOPE 2004)	p.17
I. 5 Méthodes utilisées pour l'étude de la structure des communautés eucaryotiques de petite taille	p.18
I. 6 Objectifs et approche du travail	p.20

## Chapitre II : Communautés planctoniques de petite taille d'un lac méso-eutrophe (Esch-sur-Sûre, Luxembourg)

II. 1 Résumé en français	p.22
II. 2 Article	p.23

## Chapitre III : Distribution du plancton eucaryote en Manche et en Mer du Nord en été

III. 1 Résumé en français	p.49
III. 2 Article	p.50

## Chapitre IV : Distribution des micro-organismes le long d'un transect dans le Pacifique Sud-Est (campagne BIOSOPE)

IV. 1 Résumé en français	p.73
IV. 2 Article	p.74

## Chapitre V : Conclusions et perspectives

V. 1 Considérations méthodologiques	p.89
V. 2 Contributions des Chlorophyta et des Haptophyta dans les différents milieux étudiés	p.90

<b>Bibliographie</b>	p.93
----------------------	------

## **Annexe I : Méthodes utilisées**

A. I La cytométrie en flux	p.105
A. II La microscopie à épifluorescence	p.106
A. II.1 Filtres marqués uniquement au DAPI	p.106
A. II.2 FISH-TSA	p.107
A. III Clonage-séquençage du gène de l'ARNr 18S	p.111
A. III.1 Echantillonnage	p.111
A. III.2 Extraction d'ADN	p.111
A. III.3 Amplification de l'ARNr 18S	p.111
A. III.4 Banques de clones	p.112
A. III.5 Phylogénie	p.112

## **Annexe II : Comparaison avec les lacs français** p.113

## **Annexe III** p.118

Bonnet, S., Guieu, C., Bruyant, F., Prášil, O., Van Wambeke, F., Raimbault, P., Moutin, T., Grob, C., Gorbunov, M. Y., Zehr, J. P., Masquelier, S., Garczarek, L., Claustre, H. (2008). Nutrient limitation of primary productivity in the Southeast Pacific (BIOSOPE cruise). *Biogeosciences*, 5: 215-225

## ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
<b>ARN</b>	<u>A</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique
<b>ARNr 18S</b>	Sous-unité <u>18S</u> de l' <u>ARN</u> ribosomal
<b>Chlo01</b>	Sonde oligonucléotidique 18S ciblant la plupart des Chlorophyta et quelques non-Chlorophyta
<b>Chlo02</b>	Sonde oligonucléotidique 18S ciblant les Chlorophyta
<b>CTD</b>	Appareil d'enregistrement <i>in situ</i> de la conductivité, température et profondeur ( <u>C</u> onductivity <u>T</u> emperature <u>D</u> epth)
<b>DAPI</b>	4',6- <u>d</u> iamidino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndole
<b>DCM</b>	Profondeur du maximum de Chlorophylle ( <u>D</u> epth <u>C</u> hlorophyll <u>M</u> aximum)
<b>EDTA</b>	Acide <u>t</u> étra- <u>a</u> cétique <u>d</u> iamino <u>e</u> thylène
<b>Euk1209</b>	Sonde oligonucléotidique 18S ciblant les eukaryotes
<b>FISH</b>	Hybridation <i>in situ</i> fluorescente ( <u>F</u> luorescent <u>I</u> n <u>S</u> itu <u>H</u> ybridization)
<b>FITC</b>	<u>F</u> luorescéine <u>i</u> so <u>t</u> hiocyanate
<b>HNLC</b>	Région océanique une région riche en nutriments et pauvre en chlorophylle ( <u>H</u> igh <u>N</u> utrient <u>L</u> ow <u>C</u> hlorophyll)
<b>HRP</b>	<u>H</u> orse <u>R</u> adish <u>P</u> eroxidase
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide haute performance ( <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
<b>IPTG</b>	<u>I</u> sopropyl $\beta$ -D-1- <u>t</u> hiogalactopyranoside
<b>ITSr</b>	Séquence transcrite entre les gènes d'ADNr ( <u>I</u> nternal <u>T</u> ranscribed <u>S</u> pacer)
<b>NChlo01</b>	Sonde oligonucléotidique 18S ciblant la plupart des non-Chlorophyta et quelques Chlorophyta
<b>PE</b>	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrine
<b>PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne ( <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
<b>PFA</b>	<u>P</u> ara <u>f</u> ormal <u>d</u> éhyde
<b>Pras04</b>	Sonde oligonucléotidique 18S ciblant les Mamiellales
<b>Prym02</b>	Sonde oligonucléotidique 18S ciblant les Haptophyta

<b>rbcL</b>	Grande sous-unité de l'enzyme Ribulose 1,5 Bis-phosphate carboxylase oxygénase ( <u>L</u> arge sub-unit of <u>R</u> ibulose 1,5 <u>B</u> is-phosphate <u>c</u> arboxylase)
<b>RCC</b>	Collection de cultures de Roscoff ( <u>R</u> oscoff <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection)
<b>SDS</b>	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
<b>SSU</b>	Petite sous-unité du ribosome ( <u>S</u> mall <u>S</u> ub- <u>U</u> nit)
<b>TNT</b>	Tampon <u>T</u> ris, <u>N</u> aCl, <u>T</u> ween
<b>TSA</b>	Amplification du signal par l'enzyme tyramide ( <u>T</u> yramide <u>S</u> ignal <u>A</u> mplification)
<b>UV</b>	<u>U</u> ltra <u>V</u> iolet
<b>w:v</b>	Rapport poids/volume ( <u>W</u> eight/ <u>V</u> olume)
<b>X-gal</b>	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D- <u>g</u> alactopyranoside
<b>19'hex</b>	<u>19'</u> hexanoyloxyfucoxanthine

## LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

Les figures et tableaux des articles sont numérotés de façon indépendante

- Figure I-1** : Schéma représentant une des hypothèses des évènements d'endosymbiose expliquant la formation des plastes. **p.2**
- Figure I-2** : Distribution des différents compartiments trophiques du plancton selon leur classe de taille. **p.2**
- Figure I-3** : Photos d'algues eucaryotes picoplanctoniques. **p.6**
- Figure I-4** : Arbre phylogénétique des Prasinophyceae basé sur l'analyse de séquences du gène de l'ARNr 18S. **p.9**
- Figure I-5** : Localisation du Luxembourg, du lac d'Esch-sur-Sûre et du point de prélèvement sur le lac. **p.14**
- Figure I-6** : Photos des lacs français étudiés dans ce travail. **p.15**
- Figure I-7** : Photo du « Pelagia » et trajet réalisé au cours de la campagne Microvir. **p.16**
- Figure I-8** : Carte des différentes masses d'eau présentes en Mer du Nord et leurs caractéristiques. **p.16**
- Figure I-9** : Transect réalisé au cours de la campagne BIOSOPE. **p.17**
- Figure IV-1** : Distribution en fonction de la longitude et de la profondeur, du pourcentage d'hybridation obtenu avec le mélange de sondes (Euk1209+NChlo01+Chlo01) pour les échantillons du Pacifique Sud-Est. **p.85**
- Figure IV-2** : Distribution en fonction de la longitude et de la profondeur, du pourcentage d'Haptophyta (a) et du rapport 19'hex / chl *a* (b) pour les échantillons du Pacifique Sud-Est. **p.85**
- Figure IV-3** : Distribution en fonction de la longitude et de la profondeur, du pourcentage de Chlorophyta (a) et de Mamiellales (b) pour les échantillons du Pacifique Sud-Est. **p.87**
- Figure AI-1** : Schéma résumant le principe de la cytométrie en flux. **p.105**
- Figure AI-2** : Exemple de cytogrammes obtenus dans ce travail **p.105**
- Figure AI-3** : Différentes étapes de la préparation et de l'observation des échantillons marqués au DAPI. **p.106**
- Figure AI-4** : Différentes étapes du FISH-TSA. **p.107**
- Figure AI-5** : Faux positifs obtenus avec la méthode FISH-TSA. **p.108**



<b>Figure AI-6</b> : Résumé des étapes réalisées pour l'étude temporelle de la diversité des communautés picoplanctoniques du lac d'Esch-sur-Sûre.	<b>p.111</b>
<b>Figure AII-1</b> : Profils verticaux de la température (°C) et de la saturation en oxygène (%) des lacs Pavin, du Bourget, d'Esch-sur-Sûre et Aydat.	<b>p.114</b>
<b>Figure AII-2</b> : Profils verticaux des contributions en Chlorophyta et Haptophyta des lacs Pavin, du Bourget, d'Esch-sur-Sûre et Aydat pour l'ensemble des eucaryotes.	<b>p.115</b>
<b>Figure AII-3</b> : Profils verticaux des contributions en Chlorophyta et Haptophyta des lacs Pavin, du Bourget, d'Esch-sur-Sûre et Aydat pour les différentes classes de taille étudiées.	<b>p.116</b>
<b>Tableau I-1</b> : Liste des espèces décrites de petits eucaryotes phytoplanctoniques marins et d'eau douce.	<b>p.7</b>
<b>Tableau I-2</b> : Caractéristiques morphométriques des lacs étudiés dans ce travail.	<b>p.14</b>
<b>Tableau IV-1</b> : Pourcentages d'hybridation obtenus avec les différentes sondes oligonucléotidiques utilisées dans ce travail dans chaque classe de taille pour les échantillons du Pacifique Sud-Est.	<b>p.88</b>
<b>Tableau V-1</b> : Moyennes des contributions (%) des Chlorophyta et des Haptophyta dans les différentes classes de taille dans les milieux marins étudiés dans ce travail.	<b>p.90</b>
<b>Tableau V-2</b> : Moyennes des contributions (%) des Chlorophyta et des Haptophyta dans les différentes classes de taille dans les milieux lacustres étudiés dans ce travail.	<b>p.90</b>
<b>Tableau AI-1</b> : Sondes oligonucléotidiques utilisées dans ce travail.	<b>p.107</b>
<b>Tableau AI-2</b> : Résultats des hybridations FISH-TSA réalisées sur 27 cultures de la RCC.	<b>p.108</b>

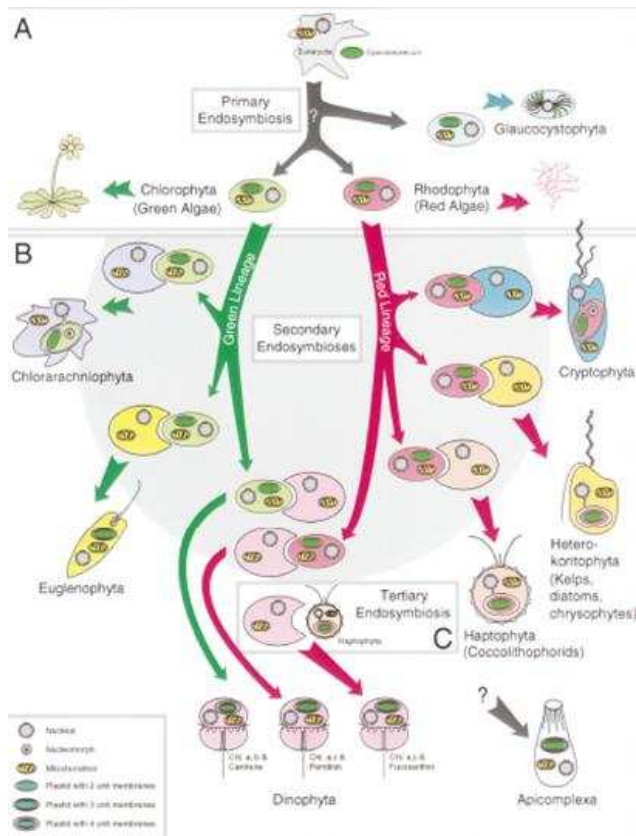
# CHAPITRE I

## **Introduction**

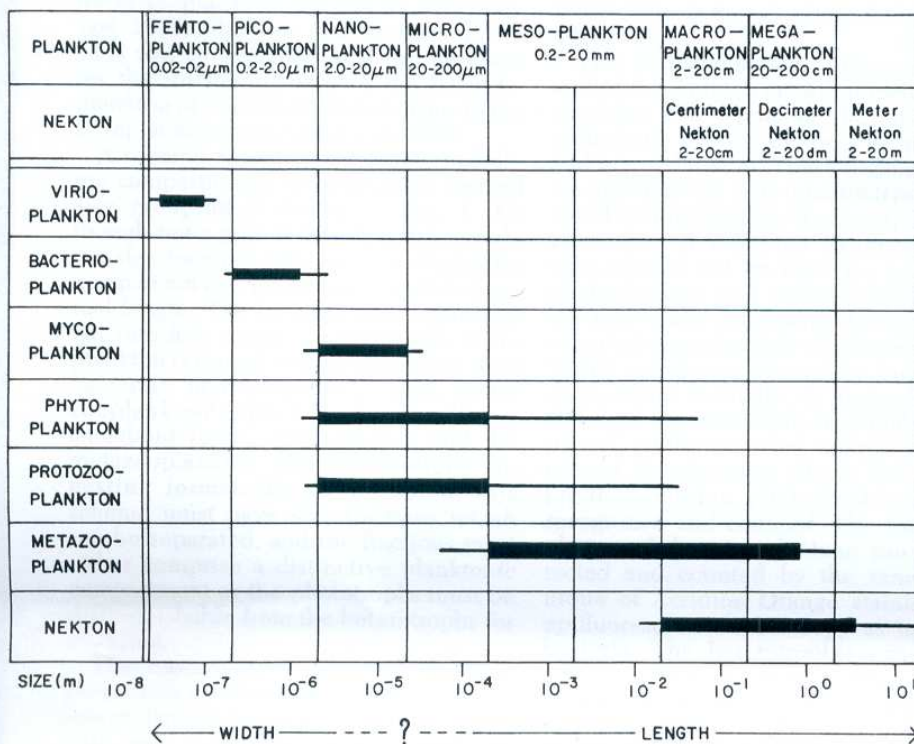
## I. 1 Le phytoplancton

Le terme « plancton » désigne tous les organismes dérivant avec les courants. Ces organismes sont généralement composés d'algues microscopiques, de protozoaires et des formes larvaires d'animaux supérieurs (Thurman & Trujillo 1999). Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la partie « algale » du plancton c'est-à-dire au phytoplancton (*Phyton* signifiant « plante »). Le phytoplancton marin qui ne compte pourtant que pour 1 % à 2 % du carbone végétal total sur Terre, réalise presque la moitié de la photosynthèse mondiale. Il joue donc un rôle important dans le cycle biogéochimique du carbone et dans la régulation du climat en contrôlant la quantité de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) dans l'atmosphère (Chisholm 2000). De plus, par l'intermédiaire des coccolithophores il joue également un rôle important dans le cycle du soufre (Malin & Steinke 2004).

Des études sur l'évolution du phytoplancton eucaryote montrent que l'Océan moderne est dominé par les diatomées, les dinoflagellés et les coccolithophores (Falkowski et al. 2004). Ces trois groupes d'algues ont en commun l'origine de leur plaste. D'après la théorie de l'endosymbiose, les plastes (à trois ou quatre membranes) des Cryptophyta, Chlorarachniophyta, Haptophyta (dont les coccolithophores), Ochrophyta (dont les diatomées), Euglenophyta et Dinophyta (dinoflagellés) résulteraient d'une endosymbiose secondaire avec une algue unicellulaire primitive, provenant elle-même d'une endosymbiose primaire avec une cyanobactérie, à l'origine des plastes (à deux membranes) des Glaucophyta, Rhodophyta et Chlorophyta (Figure I-1) (de Reviers 2002). Les plastes des Chlorarachniophyta et des Euglenophyta auraient été formés à partir de l'ancêtre des Chlorophyta et appartiendraient donc à la « lignée verte ». Les plastes des Cryptophyta, Haptophyta, Ochrophyta et Dinophyta auraient été formés à partir de l'ancêtre des Rhodophyta et appartiendraient donc à la « lignée rouge » (Delwiche 1999). Les océans apparaissent a priori dominés par la « lignée rouge » (Grzebyk et al. 2003 ; Katz et al. 2004), en particulier par les diatomées, les dinoflagellés et les coccolithophores. Cependant, ces groupes sont essentiellement présents dans le microplancton (> 20 µm) et le nanoplancton supérieur à 5 µm. La composition du plancton de petite taille, inférieur à 5 µm, reste bien moins connue et certains travaux ont suggéré que la « lignée verte » pouvait y être importante (Not et al. 2005).



**Figure I-1 :** Schéma représentant une des hypothèses des évènements d'endosymbiose expliquant la formation des plastides. D'après Delwiche (1999).



**Figure I-2 :** Distribution des différents compartiments trophiques du plancton selon leur classe de taille. D'après Sieburth et al. (1978).

## I. 2 Le plancton de petite taille

Dans les zones océaniques et les lacs oligotrophes, plus de 70 % de la biomasse chlorophyllienne est attribuable au picoplancton (Caron et al. 1985 ; Munavar & Fahnenstiel 1982 ; Veldhuis et al. 2005). Ce dernier est défini comme étant la fraction du plancton dont la taille est comprise entre 0,2 et 2  $\mu\text{m}$  (Figure I-2) (Sieburth et al. 1978). Leur petite taille associée à un grand rapport surface/volume les avantagent dans l'acquisition des nutriments (Raven 1998) et leur permettent ainsi non seulement de contribuer à la majeure partie de la biomasse phytoplanctonique des zones oligotrophes mais également à la production primaire (Bell & Kalff 2001; DuRand et al. 2001). Le picoplancton est constitué de cellules eucaryotes (cellules dotées d'un noyau) et de cellules procaryotes (dépourvus de noyau).

Les procaryotes photosynthétiques picoplanctoniques marins sont constitués essentiellement de cyanobactéries appartenant à deux genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus*. Ce sont les organismes picoplanctoniques les mieux caractérisés au niveau taxinomique, physiologique et écologique (Partensky et al. 1999). Récemment, les génomes complets de *Prochlorococcus* et *Synechococcus* ont été séquencés (Dufresne et al. 2003 ; Palenik et al. 2003 ; Rocop et al. 2003).

Dans les eaux douces, les procaryotes photosynthétiques picoplanctoniques se présentent soit sous forme « solitaire » (*Cyanobium*, *Synechococcus* et *Cyanothece*) soit sous forme coloniale dont les genres *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Coelosphaerium*, *Cyanodictyon*, *Merismopedia*, *Snowella* et *Tetrarcus* sont les plus souvent rencontrés (Stockner et al. 2000). Comme les espèces marines, les picocyanobactéries d'eau douce sont mieux caractérisées au niveau taxinomique, physiologique et écologique, que les espèces de picoeucaryotes. Ceci est principalement dû au fait qu'elles présentent en général des densités plus importantes que ces derniers dans le milieu. Les génomes complets de différentes souches de *Cyanothece*, picocyanobactéries diazotrophes ont été récemment séquencés (Welsh et al. 2008).

Le séquençage complet de 8 souches d'eucaryotes de petite taille a été réalisé ou est en cours d'annotation. Il s'agit de souches d'*Ostreococcus*, de *Micromonas pusilla*, de *Chlorella*, de *Chlamydomonas reinhardtii* et d'*Emiliania huxleyi* (Derelle et al. 2006 ; Merchant et al. 2007 ; Palenik et al. 2007 ; Vaultot et al. 2008). Quelques études ont été réalisées sur la diversité du picophytoplancton marin et d'eau douce (Hepperle & Schlegel 2002 ; Romari & Vaultot 2004 ; Fuller et al. 2006), mais les études quantitatives sont encore rares, aussi bien en

milieu marin qu'en eau douce (Not et al. 2005 ; Zhu et al. 2005 ; Burns & Stockner 1991 ; Jasser 2002).

### I. 2.1 Importance du plancton de petite taille

En milieu aquatique, les concentrations et la distribution des organismes de petite taille, procaryotes et eucaryotes, sont en général obtenues par l'utilisation de la microscopie à épifluorescence et de la cytométrie en flux.

- ***Dans les Océans***

Le picoplancton a été étudié dans des milieux marins très divers, des mers Arctique à l'Océan Austral en passant par l'Océan Pacifique (Detmer et al. 1997 ; Blanchot et al. 2001 ; Lovejoy et al. 2007). Les densités de *Prochlorococcus* atteignent des valeurs de l'ordre de  $10^5$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  alors que *Synechococcus* montre des concentrations pouvant aller de  $10^2$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  à  $10^6$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  (Partensky et al. 1999). Les picoeucaryotes présentent des concentrations de  $10^2$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  dans les zones oligotrophes à  $10^5$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  dans les zones eutrophes (Grob et al. 2007).

La cytométrie en flux a permis de montrer que, alors que l'aire de répartition de *Prochlorococcus* se situe dans les zones oligotrophes intertropicales ( $30^\circ\text{S}$ - $30^\circ\text{N}$ ), *Synechococcus* a une aire de distribution plus large : des eaux d'Arctique ( $70^\circ\text{N}$ ) au front Antarctique ( $50^\circ\text{S}$ ) (Gradinger & Lenz., 1989 ; Legendre et al. 1999 ; Zubkov et al. 2000). Quant aux picoeucaryotes, on les retrouve d'un pôle à un autre (Veldhuis et al. 2005). Différentes études ont montré que *Synechococcus* et les picoeucaryotes sont plus nombreux lorsque la teneur en nutriments augmente, notamment en milieu côtier (Partensky et al. 1999 ; Agawin et al. 2000 ; Zubkov et al. 2000).

De part leur volume cellulaire supérieur à celui des cyanobactéries, les picoeucaryotes contribuent à une part relativement importante de la biomasse phytoplanctonique totale, malgré leur faible densité dans les zones oligotrophes. Par exemple, Li (1995) attribue 61 % de la biomasse (biomasse chlorophyllienne) et 68 % de la productivité du picoplancton aux picoeucaryotes dans l'Atlantique Nord. Dans l'Océan Austral, la contribution des picoeucaryotes en termes de biomasse chlorophyllienne varie de 10 % à 40 % (Veldhuis et al. 2005). En zone océanique, la contribution des picoeucaryotes est estimée à un tiers de la

biomasse phytoplanctonique et est maximale au niveau du maximum profond de chlorophylle (Campbell et al. 1994 ; Li 1995).

- *En eau douce*

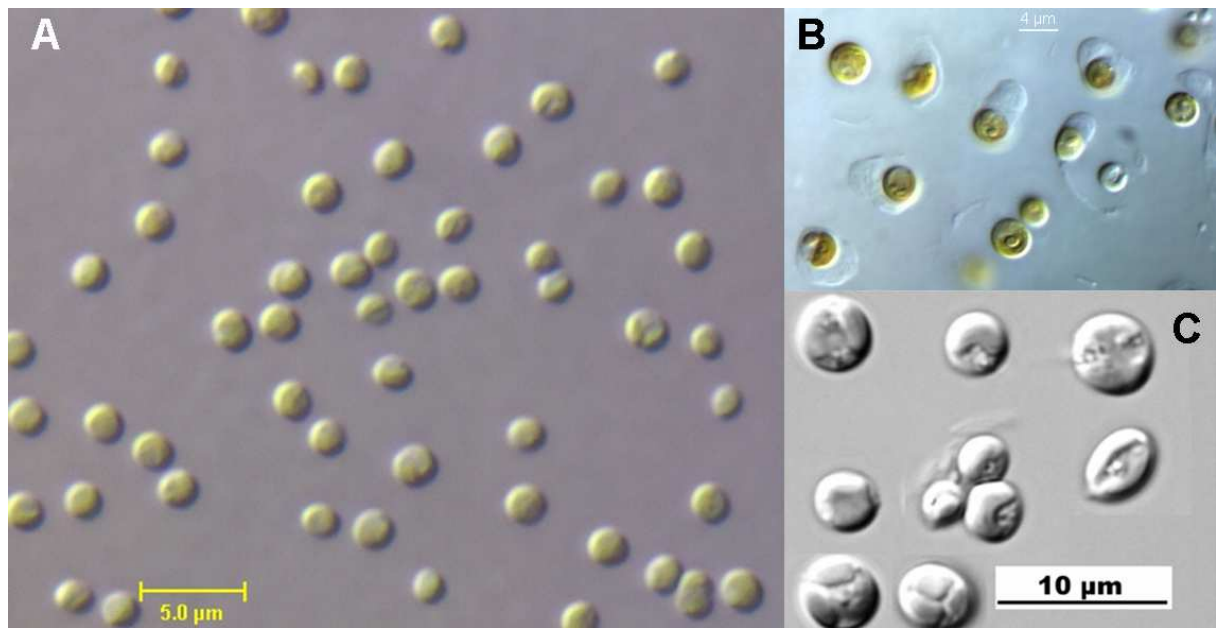
Le picophytoplancton a été mis en évidence dans des milieux d'eau douce très divers, incluant des lacs ultra-oligotrophes comme le lac Baikal en Russie (Boraas et al. 1991), des lacs subpolaires (Vincent 2000), et des lacs eutrophes peu profonds ou des étangs (Vörös et al. 1998). Malgré la distribution ubiquiste de ces organismes, leur composition varie fortement avec le gradient trophique et les saisons. Le picophytoplancton procaryote unicellulaire est très abondant dans les lacs oligo à mésotrophes, alors que les formes coloniales sont présentes, le plus souvent, dans les lacs méso à eutrophes ou les étangs (Stockner et al. 2000). Les densités de picocyanobactéries varient de  $10^2$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  en lac oligotrophe à  $10^7$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  en lac hyper-eutrophe (Stockner et al. 2000). En général, deux pics de concentration sont observés, un premier au printemps ou en été et un second en automne. La température et le début de stratification de la colonne d'eau sont généralement les éléments déclencheurs du pic de printemps alors que le déclin des densités est dû principalement au broutage (Weisse 1993). L'abondance du picophytoplancton eucaryote varie de  $10^2$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  en lac oligotrophe à  $10^5$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  en lac eutrophe. Dans les régions tempérées, un seul pic d'abondance est observé pour le picophytoplancton eucaryote au printemps ou en été. En général, leur concentration est de 10 à 100 fois plus élevée que celle des picocyanobactéries (Burns & Stockner 1991). Dans les lacs, le picophytoplancton eucaryote remplace progressivement le picophytoplancton procaryote lorsque les nutriments augmentent et le pH diminue (Callieri & Stockner 2002).

D'après Bell & Kalff (2001), la biomasse absolue du picophytoplancton et sa contribution relative à la biomasse phytoplanctonique totale sont toujours plus élevées en eau douce qu'en milieu marin. Cependant, son importance relative diminue lorsque le statut trophique augmente quelque soit le milieu considéré. Ceci confirme le modèle proposé par Stockner en 1991. Ces auteurs ont également montré que l'importance du picophytoplancton en eau douce n'est pas seulement fonction du statut trophique mais est également fonction de la profondeur de la colonne d'eau. Cette dernière jouerait un rôle complémentaire au statut trophique en déterminant la distribution des tailles au sein des communautés phytoplanctoniques.

En lac oligotrophe, la contribution des picoeucaryotes photosynthétiques peut atteindre jusqu'à 30 % de la biomasse phytoplanctonique totale (Hepperle & Krienitz 2001). En lac eutrophe, cette contribution peut diminuer très fortement, comme par exemple dans le lac Kinneret en Israël où elle n'atteint que 1 % de la biomasse phytoplanctonique totale (Malinsky-Rushansky et al. 1997).

Les principaux facteurs contrôlant la distribution du pico et nanoplancton aussi bien en milieu marin qu'en eau douce, sont l'intensité lumineuse, les concentrations en nutriments et les phénomènes physiques. Les facteurs biotiques comme le broutage et la lyse virale influent quant à eux sur la mortalité cellulaire (Caron et al. 1999 ; Callieri & Stockner 2002).





**Figure I-3 :** Photos d'algues eucaryotes picoplanctoniques : *Nannochloris* sp. (A), *Prasinococcus* sp. (B) et *Nannochloropsis limnetica* (C). Les photos (A) et (B) sont issues du site internet de la Roscoff Culture Collection ([www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC/index.php](http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC/index.php)). La photo (C) est issue de Fawley & Fawley (2007).

### I. 2.2 Diversité au sein du plancton eucaryote de petite taille

Même si certains picoeucaryotes présentent des caractères morphologiques différents, comme des flagelles ou des écailles, la plupart de ces organismes ont une forme coccoïde (Figure I-3). Cette similarité dans la forme et leur petite taille rendent difficile l'étude de la diversité au sein du picoplancton par des méthodes classiques. L'utilisation combinée de techniques comme la mise en culture, la microscopie électronique, les analyses pigmentaires et la phylogénie ont permis de mettre en évidence et de caractériser un peu plus de cent espèces d'algues eucaryotes picoplanctoniques marines et d'eau douce réparties dans plusieurs lignées (Tableau I-1). Des nouvelles classes ont été décrites à partir d'espèces picoplanctoniques. Il s'agit des Pelagophyceae (Andersen et al. 1993), des Bolidophyceae (Guillou et al. 1999) et des Pinguiphyceae (Kawachi et al. 2002). Récemment, un nouveau groupe d'algues marines, les picobiliphytes, a été détecté par l'analyse de séquences du gène de l'ARNr 18S et mis en évidence par l'utilisation de sondes spécifiques ARNr (Not et al. 2007).

Comme l'illustre le tableau I-1, les espèces de plancton eucaryote de petite taille sont réparties dans la plupart des classes d'algues. Le plus grand nombre d'espèces appartient au groupe des Heterokontophyta, aussi appelé Stramenopiles, suivi par les Chlorophyta et en particulier, la classe des Prasinophyceae ainsi que les Haptophyta. Ces deux groupes ont donc été sélectionnés comme cibles d'étude dans le cadre de cette thèse.

**Tableau I-1** : Liste des espèces décrites de petits eucaryotes phytoplanctoniques marins et d'eau douce dont la taille minimale est inférieure ou égale à 3 µm. Ce tableau a été modifié et complété à partir de Vaultot et al. (2008) en y ajoutant en particulier, les espèces d'eau douce.

Group	Class	Genus-Species	Authority	Year Basionym	Min. size (µm)	Max. size (µm)	System
Chlorophyta	Pedinophyceae	<i>Marsupiomonas pelliculata</i>	Jones et al.	1994	3	3	brackish and marine
	Pedinophyceae	<i>Resultor micron</i>	(Thronsdén) Moestrup	1969	1.5	2.5	marine
	Pedinophyceae	<i>Pedinomonas major</i>	Korshikov	1923	3	6.5	freshwater
	Pedinophyceae	<i>Pedinomonas minor</i>	Korshikov	1923	2	7	freshwater
	Prasinophyceae	<i>Bathycoccus prasinos</i>	Eikrem et Thronsdén	1990	1.5	2.5	marine
	Prasinophyceae	<i>Crustomastix stigmatica</i>	Zingone	2002	3	5	marine
	Prasinophyceae	<i>Dolichomastix lepidota</i>	Manton	1977	2.5	2.5	marine
	Prasinophyceae	<i>Dolichomastix eurylepis</i>	Manton	1977	3	3	marine
	Prasinophyceae	<i>Dolichomastix tenuilepis</i>	Thronsdén et Zingone	1997	3	4.5	marine
	Prasinophyceae	<i>Mantoniella squamata</i>	(Manton et Parke) Desikachary	1960	3	5	marine
	Prasinophyceae	<i>Micromonas pusilla</i>	(Butcher) Manton et Parke	1952	1	3	marine
	Prasinophyceae	<i>Ostreococcus tauri</i>	Chrétiennot-Dinet et Courties	1994	0.8	1.1	marine
	Prasinophyceae	<i>Picocystis salinarum</i>	Lewin	2000	2	3	hypersaline
	Prasinophyceae	<i>Prasinococcus capsulatus</i>	Miyashita et Chihara	1993	3	5.5	marine
	Prasinophyceae	<i>Prasinoderma coloniale</i>	Hasegawa et Chihara	1996	2.5	5.5	marine
	Prasinophyceae	<i>Pseudoscourfieldia marina</i>	(Thronsdén) Manton	1969	3	3.5	marine
	Prasinophyceae	<i>Pycnococcus provasolii</i>	Guillard	1991	1.5	4	marine
	Prasinophyceae	<i>Pyramimonas virginica</i>	Pennick	1977	2.7	3.5	marine
	Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas grovei</i>	(West) Gerloff et Ettl	1916	2	4	freshwater
	Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas dinobryonis</i>	Smith	1920	2	5	freshwater
	Chlorophyceae	<i>Kermatia pupukensis</i>	Kalina et Punčochářová	1987	2.5	3	freshwater
	Chlorophyceae	<i>Monoraphidium convolutum</i>	(Corda) Komárková-Legnerová	1969	1.4	11	freshwater
	Chlorophyceae	<i>Mychonastes ruminatus</i>	Simpson	1978	3	7	brackish
	Chlorophyceae	<i>Mychonastes homosphaera</i>	(Skuja) Kalina et Punčochářová	1948	2	5	freshwater
	Chlorophyceae	<i>Pseudodictyosphaerium jurisii</i>	(Hindák) Krienitz et al.	1977	2.3	4.5	brackish and freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Gerneck	1907	1.5	15	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella emersonii</i>	Shihira et Krauss	1965	3	17	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella miniata</i>	(Nägeli) Oltmanns	1904	3	15	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella minutissima</i>	Fott et Nováková	1969	1	3	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella mirabilis</i>	Andreyeva	1973	3	11	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella nana</i>	Andreoli et al.	1978	1.5	3	marine
	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella saccharophila</i>	(Krüger) Migula	1907	2	10.2	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Shihira et Krauss	1965	2	5	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella spärckii</i>	Ålvik	1934	2.8	7	marine
	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella vulgaris</i>	Beijerinck	1890	1.5	13.3	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Choricystis coccooides</i>	(Rodhe et Skuja) Fott	1948	0.8	1.5	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Choricystis hindakii</i>	Tell	1979	1.5	3.5	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Choricystis minor</i>	(Skuja) Fott	1948	1.5	7	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Marvania coccooides</i>	(Naumann) Henley et al.	1919	1.5	2	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Meyrella planktonica</i>	Fawley et al.	2005	1.8	5	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Nannochloris bacillaris</i>	Naumann	1919	1.5	2	freshwater
	Trebouxiophyceae	<i>Picochlorum atomus</i>	(Butcher) Henley et al.	1952	2	3	brackish
Trebouxiophyceae	<i>Picochlorum eukaryotum</i>	(Wilhelm et al.) Henley et al.	1982	3	3	marine	
Trebouxiophyceae	<i>Picochlorum maculatus</i>	(Butcher) Henley et al.	1952	3	3	brackish hypersaline and freshwater	
Trebouxiophyceae	<i>Picochlorum oklahomensis</i>	Henley et al.	2004	2	2	freshwater	
Trebouxiophyceae	<i>Stichococcus bacillaris</i>	Nägeli	1849	3	4	marine and freshwater	
Trebouxiophyceae	<i>Stichococcus minutissimus</i>	Skuja	1955	1	6	freshwater	
Cryptophyta	Cryptophyceae	<i>Hillea marina</i>	Butcher	1952	1.5	2.5	marine

Tableau I-1 : suite

Group	Class	Genus-Species	Authority	Year Basionym	Min. size ( $\mu\text{m}$ )	Max. size ( $\mu\text{m}$ )	System
Haptophyta	Prymnesiophyceae	<i>Chrysochromulina apheles</i>	Moestrup et Thomsen	1986	3	4	marine
	Prymnesiophyceae	<i>Chrysochromulina minor</i>	Parke et Manton	1955	2.5	7.5	marine
	Prymnesiophyceae	<i>Chrysochromulina parva</i>	Lackey	1939	2	7	freshwater
	Prymnesiophyceae	<i>Chrysochromulina planisquama</i>	Hu et al.	2005	3	6	marine
	Prymnesiophyceae	<i>Chrysochromulina tenuisquama</i>	Estep et al.	1984	2	5	marine
	Prymnesiophyceae	<i>Dicrateria inornata</i>	Parke	1949	3	5.5	marine
	Prymnesiophyceae	<i>Ericolus spiculiger</i>	Thomsen	1995	3	3.8	marine
	Prymnesiophyceae	<i>Imantonia rotunda</i>	Reynolds	1974	2	4	marine
	Prymnesiophyceae	<i>Phaeocystis cordata</i>	Zingone	1999	3	4	marine
	Prymnesiophyceae	<i>Phaeocystis pouchetii</i>	(Hariot) Lagerheim	1892	3	8	marine
	Prymnesiophyceae	<i>Trigonaspis minutissima</i>	Thomsen	1980	2	3.6	marine
Heterokontophyta (Stramenopiles)	Bacillariophyceae	<i>Atrocellulus cornucervis</i>	Hasle et al.	1983	1	17	marine
	Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros minimus</i>	(Levander) Marino et al.	1991	2	7	marine
	Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros thronsenii</i>	(Marino et al.) Marino et al.	1991	1.5	5	marine
	Bacillariophyceae	<i>Cyclotella glomerata</i>	Bachmann	1911	3	4	freshwater
	Bacillariophyceae	<i>Cyclotella pseudostelligera</i>	Hustedt	1939	2.3	5.8	freshwater
	Bacillariophyceae	<i>Minidiscus chilensis</i>	Rivera	1984	3	7.5	marine
	Bacillariophyceae	<i>Minidiscus comicus</i>	Takano	1981	2	7	marine
	Bacillariophyceae	<i>Minidiscus trioculatus</i>	(F.J.R. Taylor) Hasle	1967	2.5	3.8	marine
	Bacillariophyceae	<i>Minidiscus spinulosus</i>	Gao et al.	1992	3	5	marine
	Bacillariophyceae	<i>Minutocellus polymorphus</i>	(Hagraves et Guillard) Hasle et al.	1983	2	30	marine
	Bacillariophyceae	<i>Minutocellus scriptus</i>	Hasle et al.	1983	3	36	marine
	Bacillariophyceae	<i>Skeletonema menzelii</i>	Guillard et al.	1974	2	7	marine
	Bacillariophyceae	<i>Skeletonema pseudocostatum</i>	Medlin	1991	2	9	marine
	Bacillariophyceae	<i>Skeletonema grethae</i>	Zingone et Sarno	2005	2	10.5	marine
	Bacillariophyceae	<i>Skeletonema japonicum</i>	Zingone et Sarno	2005	2	10	marine
	Bacillariophyceae	<i>Skeletonema marinoi</i>	Sarno et Zingone	2005	2	12	marine
	Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira bulbosa</i>	Syvertsen	1984	2	16	marine
	Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira mala</i>	Takano	1965	2	10	marine
	Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira oceanica</i>	Hasle	1983	3	12	marine
	Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira proschkiniae</i>	Makarova	1979	2	11.5	marine
	Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Hasle et Heimdal	1970	2.3	5.5	marine
	Bacillariophyceae	<i>Stausira construens</i>	(Ehrenberg) Grunow	1881	3	12	freshwater
	Bacillariophyceae	<i>Stausira elliptica</i>	(Schumann) Williams et Round	1987	2	8	freshwater
	Bacillariophyceae	<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	Cleve & Grunow	1880	3	5	freshwater
	Bolidophyceae	<i>Bolidomonas mediterranea</i>	Guillou et Chrétiennot-Dinet	1999	1	1.7	marine
	Bolidophyceae	<i>Bolidomonas pacifica</i>	Guillou et Chrétiennot-Dinet	1999	1	1.7	marine
	Chrysophyceae	<i>Chrysococcus punctiformis</i>	Pascher	1911	2	3	freshwater
	Chrysophyceae	<i>Ollicola vangoorii</i>	(Conrad) Vørs	1938	2.5	5	marine
	Chrysophyceae	<i>Tetraparma pelagica</i>	Booth et Marchant	1987	2.2	2.8	marine
	Chrysophyceae	<i>Tetraparma insecta</i>	Bravo-Sierra et Hernández-Becerril	2003	2.8	3.8	marine
	Chrysophyceae	<i>Triparma columacea</i>	Booth	1981	2.3	4.7	marine
	Chrysophyceae	<i>Triparma laevis</i>	Booth	1981	2.2	3.1	marine
	Chrysophyceae	<i>Triparma retinervis</i>	Booth	1981	2.7	4.5	marine
	Dictyochophyceae	<i>Florenciella parvula</i>	Eikrem	2004	3	6	marine
	Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis granulata</i>	Karlson et Potter	1996	2	4	marine
	Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis limnetica</i>	Krienitz et al.	2000	1.5	6	freshwater
	Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Suda et Miyashita	2002	3	5	marine
Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis salina</i>	(Bourrelly) Hibberd	1958	3	4	brackish	
Pelagophyceae	<i>Aureococcus anophagefferens</i>	Hagraves et Sieburth	1988	1.5	2	marine	
Pelagophyceae	<i>Aureoumbra lagunensis</i>	DeYoe et al.	1997	2.5	5	marine	
Pelagophyceae	<i>Pelagococcus subviridis</i>	Norris	1977	2.5	5	marine	
Pelagophyceae	<i>Pelagomonas calceolata</i>	Andersen et Saunders	1993	2	3	marine	
Pinguiphyceae	<i>Pinguiochrysis pyriformis</i>	Kawachi	2002	1	3	marine	
Pinguiphyceae	<i>Pinguicoccus pyrenoidosus</i>	Andersen et al.	2002	3	8	marine	

### I. 3 Taxons étudiés

Quelques études ont montré la dominance des Chlorophyta, en particulier des Prasinophyceae, dans la fraction picoplanctonique des milieux côtiers et la décroissance de leur contribution lorsqu'on s'éloigne des côtes (Not et al. 2004, 2005, 2008). En eau douce, quelques études ont montré la présence d'algues vertes parmi les picoeucaryotes de certains lacs (Krienitz et al. 2000 ; Fawley et al. 2005) mais très peu de choses sont actuellement connues concernant leur distribution et leur contribution.

Bien que des analyses pigmentaires aient montré leur dominance en milieu océanique (Andersen et al. 1996), la plupart des études réalisées sur les Haptophyta en milieu marin se focalisent sur les périodes d'efflorescence de ces organismes en milieu côtier, en particulier *Phaeocystis* (Verity et al. 2007). Peu d'information sont disponibles concernant leur distribution et leur contribution en milieu côtier en dehors des périodes d'efflorescence et en milieu océanique.

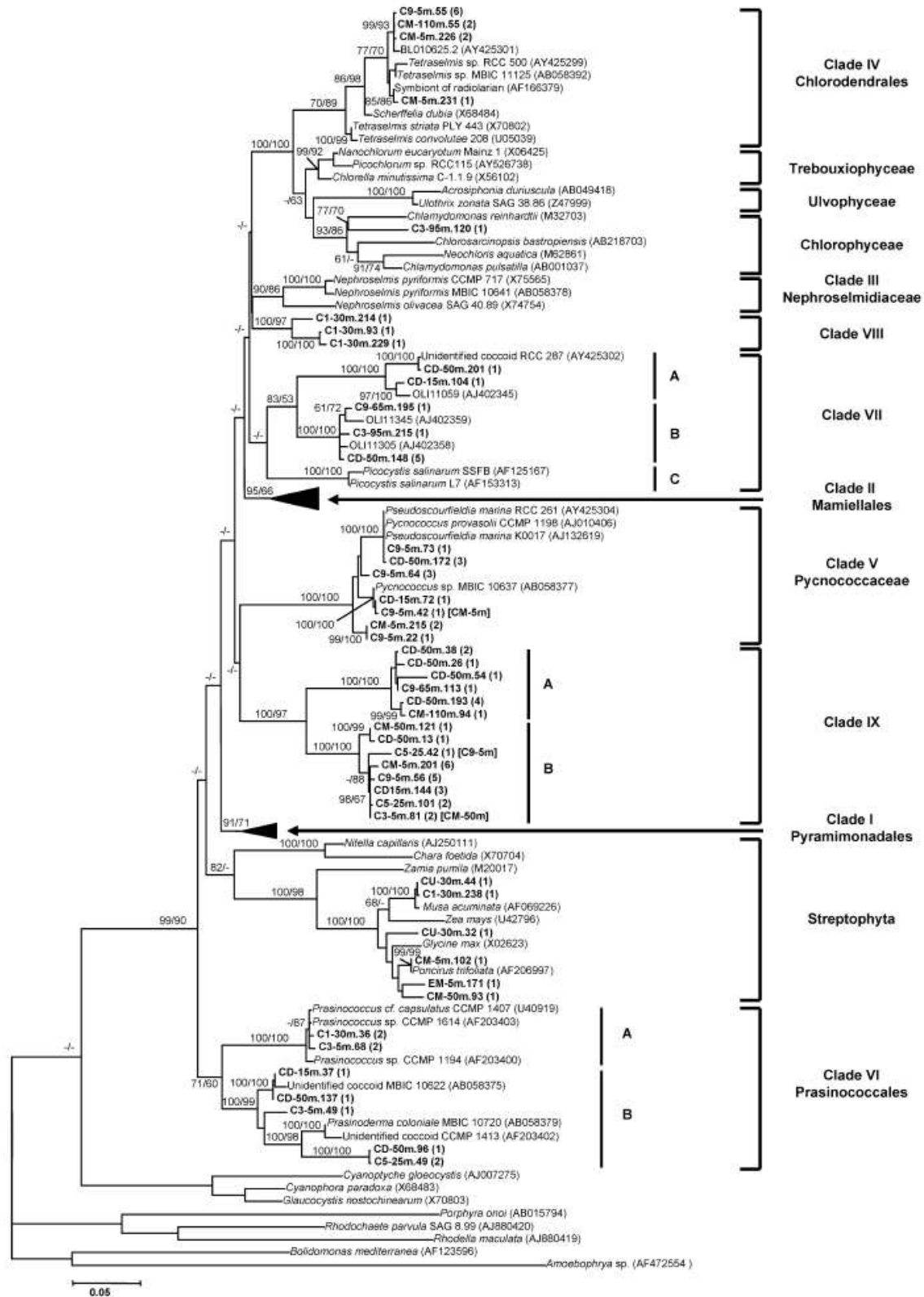
En eau douce, encore moins de choses sont connues concernant les haptophytes. Deux études mettent en évidence l'efflorescence de *Chrysochromulina* dans un lac danois et dans un lac aux USA ont été recensées (Nicholls et al. 1982 ; Hansen et al. 1994).

#### I. 3.1 Chlorophyta

L'infra-règne des Chlorophyta, signifiant étymologiquement « végétaux verts » fait partie du sous-règne des Chlorobionta, taxon monophylétique comprenant à la fois les embryophytes et les algues vertes. Les algues vertes sont quant à elles paraphylétiques et constituent un groupe gigantesque comprenant entre 550 et 570 genres et 16 000 à 17 000 espèces (de Reviers, 1993 ; Norton et al. 1996). Chez les algues vertes, on dénombre 5 classes : les Prasinophyceae, les Pedinophyceae, les Chlorophyceae *stricto sensu*, les Trebouxiophyceae et les Ulvophyceae (multicellulaires).

- ***Les Prasinophyceae***

L'étymologie du nom Prasinophyceae vient du mot grec « prasinos » qui désigne la couleur « verte poireaux » de ces algues. Les Prasinophyceae constituent le groupe dominant parmi les séquences du gène de l'ARNr 18S des eucaryotes de petite taille isolées dans le milieu



**Figure I-4 :** Arbre phylogénétique des Prasinophyceae basé sur l'analyse de séquences du gène de l'ARNr 18S. Les valeurs de bootstrap présentées correspondent aux méthodes « Neighbour joining » et « Maximum Parsimony ». Les séquences en gras correspondent à celles obtenues dans la publication dont est issue cette figure. D'après Viprey et al. (2008).

marin. C'est d'ailleurs un des groupes dans lequel ont été décrits le plus d'espèces d'eucaryotes de petite taille jusqu'à présent. La classe des Prasinophyceae est un ensemble hétérogène où sont regroupés des taxons très divers, appartenant à des lignées différentes, mais considérées comme les algues vertes ayant conservé le plus de caractères primitifs (de Reviers, 2003). Leur phylogénie a d'abord été fondée sur des caractères ultrastructuraux tels que la présence de flagelles, d'écailles organiques ou encore la position des flagelles. Des études de biologie moléculaire basées sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 18S (Nakayama et al. 1998) ou du gène chloroplastique *rbcL* (Daugbjerg et al. 1995) ont modifié cette classification en permettant l'insertion d'organismes ayant d'autres caractéristiques morphologiques comme l'absence de flagelle dans le cas de *Bathycoccus*, l'absence d'écaille dans le cas de *Micromonas*, l'absence de flagelle et d'écaille dans le cas de *Pycnococcus*. Cependant, la taxinomie de ce groupe d'algues reste confuse. Selon un consensus de la communauté scientifique et sur base des travaux de Fawley et al. (2000), Lewin et al. (2000) et Guillou et al. (2004), la classe des Prasinophyceae est composée de 8 ordres : l'ordre des Pyramimonadales (clade I), l'ordre des Pseudoscourfieldiales, l'ordre des Chlorodendrales (clade IV), le clade VII, l'ordre des Prasinococcales (clade VI), et l'ordre des Mamiellales. Deux nouveaux clades (clade VIII et IX) ont été découverts récemment à partir d'échantillons provenant de la Mer Méditerranée en utilisant des amorces Chlorophyta biaisées du gène de l'ARNr 18S (Figure I-4) (Viprey et al. 2008). Aucune culture représentative de ces clades n'est disponible pour l'instant (Vaulot et al. 2008).

L'ordre des Pyramimonadales (clade I) contient les genres *Cymbomonas*, *Halopshaera*, *Pterosperma* et *Pyramimonas*. Ce dernier est retrouvé en milieu marin et d'eau douce sous forme de flagellés unicellulaires. Il en a été décrit plus de 40 espèces dont l'espèce picoplanctonique *Pyramimonas virginica* qui a été observée sporadiquement dans plusieurs environnements côtiers à travers le monde (Thomsen 1986 ; Hori et al. 1995). Le genre *Halosphaera* est principalement constitué de flagellés unicellulaires marins.

L'ordre des Pseudoscourfieldiales est divisé en deux clades : les Pycnococcaceae (clade V) et les Nephroselmidacae (clade III). Dans la famille Pycnococcaceae dont des séquences environnementales ont pu être isolées dans les eaux côtières de Roscoff et de la mer du Nord, on retrouve les genres *Pycnococcus* (Guillard et al. 1991) décrit dans l'Atlantique Nord-Ouest et le Golfe du Mexique, et *Pseudoscourfieldia* (Thronsdén 1969 ; Manton 1975). La famille

Nephroselmidaceae se compose uniquement du genre *Nephroselmis* (Stein 1878) qui comprend cependant plusieurs espèces marines et d'eau douce.

L'ordre des Chlorodendrales (clade IV) se compose principalement d'organismes symbiontes comme *Tetraselmis convolutae* (Parke & Manton 1967) en symbiose avec le ver *Convoluta roscoffensis*. Environ 26 espèces marines et d'eau douce ont été rapportées (Sym & Pienaar 1993). Toutes les espèces sont de taille supérieure à 2  $\mu\text{m}$ .

Le clade VII se divise en trois sous-groupes (A, B, C). Le groupe A comprend des séquences environnementales du Pacifique, de Roscoff et les séquences des souches picoplanctoniques CCMP1205 et RCC287 disponibles en culture mais pas encore formellement décrites. Le groupe B se compose de séquences environnementales provenant du Pacifique Equatorial (Moon-van der Staay et al. 2001). Le groupe C comprend l'espèce picoplanctonique *Picocystis salinarium* (2-3  $\mu\text{m}$ ) décrite à partir d'échantillons issus d'un lac salé aux USA (Lewin et al. 2000).

L'ordre des Prasinococcales (clade VI) décrit récemment par Fawley et al. (2000) se compose essentiellement des genres marins *Prasinococcus* (Miyashita et al. 1993) et *Prasinoderma* (Hasegawa et al. 1996).

L'ordre des Mamiellales se compose des genres marins *Ostreococcus*, *Bathycoccus*, *Micromonas*, *Mantoniella*, *Mamiella*, *Dolichomastix* et *Crustomastix*. La plupart des séquences du gène de l'ARNr 18S trouvées dans l'environnement marin appartenant à la classe des Prasinophyceae, appartiennent à l'ordre des Mamiellales. Les trois genres picoplanctoniques *Ostreococcus*, *Bathycoccus* et *Micromonas* représentent plus de 90 % des séquences disponibles et sont particulièrement trouvées dans les eaux côtières tempérées (Massana et al. 2004 ; Romari & Vaolot 2004 ; Medlin et al. 2006 ; Worden 2006).

Les clades VIII et IX n'ont pas encore été décrits jusqu'à présent. Ils comprennent des séquences environnementales provenant de la Mer Méditerranée (Viprey et al. 2008). Le clade IX serait constitué de deux sous-clades (A et B) comprenant des séquences de plusieurs banques de clones alors que les séquences appartenant au clade VIII proviennent du même échantillon.



- **Les *Pedinophyceae***

La classe des *Pedinophyceae* est constituée de trois genres et d'environ 10 espèces marines et d'eau douce caractérisés par la présence d'un flagelle et l'absence d'écaille. Les espèces picoplanctoniques marines *Resultor micron* et *Marsupiomonas pelliculata* ont été isolées dans l'Océan Atlantique et dans un marais salant de Grande Bretagne, respectivement (Estep et al. 1984 ; Jones et al. 1994), et semblent y être limitées étant donné qu'elles n'ont pas été observées ailleurs depuis. Les deux espèces d'eau douce *Pedinomonas major* et *Pedinomonas minor* peuvent atteindre des tailles supérieures à 3  $\mu\text{m}$  mais ne dépassent jamais les 10  $\mu\text{m}$ . On les retrouve en général dans des eaux douces riches en nutriments.

- **Les *Chlorophyceae***

La classe des *Chlorophyceae*, taxon frère des *Trebouxiophyceae*, regroupe environ 350 genres et 25 000 espèces (Melkonian, 1990) principalement lacustres ou terrestres. La classification au sein de cette classe est en plein bouleversement et la conception des ordres est appelée à se modifier. Dans ce qui suit, nous nous sommes intéressés uniquement aux ordres des *Dunaliellales*, des *Chlamydomonadales* et des *Chlorococcales* d'après la classification exposée dans de Reviers (2003). En effet, les autres ordres regroupent soit des colonies de cellules supérieures à 10  $\mu\text{m}$  soit des filaments multicellulaires qui ne seront pas visibles dans nos échantillons d'eau douce suite à la préfiltration sur 5 ou 10  $\mu\text{m}$  étant donné notre intérêt dans ce travail pour les algues unicellulaires de petite taille.

L'ordre des *Dunaliellales sensu* Melkonian (1990) se compose au moins de deux genres (*Asteromonas* et *Dunaliella*) et de 35 espèces. Ce sont des unicellulaires biflagellés de taille supérieure à 2  $\mu\text{m}$ .

L'ordre des *Chlamydomonadales* se compose de 50 genres et d'environ 900 espèces. Ceux sont des unicellulaires le plus souvent biflagellés et de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$ . Parmi les genres de cet ordre, il y a notamment *Haematococcus*, *Brachiomonas* et *Chlamydomonas*. On retrouve *Chlamydomonas* dans les eaux douces de tout type, dans le sol, la neige et la glace (Graham & Wilcox 2000). Certaines espèces de *Chlamydomonas* comme par exemple, *C. reinhardtii* ont été beaucoup étudiées et sont devenues des modèles dans l'étude génétique des fonctions et structures cellulaires des eucaryotes (Pröschold et al. 2005).

La plupart des espèces de *Chlamydomonas* ont des tailles supérieures à 10 µm. Cependant, deux espèces dont la taille peut varier de 2 à 5 µm ont été décrites en eau douce : *C. grovei* et *C. dinobryonis* (West 1916 ; Smith 1920).

L'ordre des Chlorococcales est un ordre artificiel, polyphylétique regroupant 16 familles et 190 genres. Il est constitué d'unicellulaires avec ou sans flagelle, coloniaux ou multicellulaires. On y retrouve les genres *Chlorococcum* (cellules solitaires de plus de 10 µm) et *Botryococcus* (cellules coloniales de plus de 5 µm) mais également l'espèce picoplanctonique coloniale *Pseudodictyosphaerium jurisii* isolée d'un lac en Allemagne (Krienitz et al. 1999). Ces colonies pouvant se désintégrer dans la colonne d'eau, les cellules solitaires détachées sont alors considérées comme faisant partie du picoplancton.

- ***Les Trebouxiophyceae***

La classe des Trebouxiophyceae contient une quinzaine de genres qui regroupent des algues unicellulaires ou filamenteuses marines et d'eau douce, symbiotes de lichens ou parasites comme par exemple l'algue unicellulaire (~ 2 µm) *Coccomyxa parasitica* infectant la moule *Mytilus edulis* en Mer du Nord (Rodríguez et al. 2008). Jusqu'à présent, on compte plus d'espèces d'eau douce que d'espèces marines parmi les Trebouxiophyceae unicellulaires de petite taille (environ 15) dont notamment, *Nannochloris bacillaris*, *Marvania coccoïdes*, *Meyrella planktonica* qui a été récemment décrite par Fawley et al. (2005) à partir de cultures issues d'un lac aux USA, et plusieurs espèces de *Choricystis* et de *Chlorella*.

Peu d'espèces marines de Trebouxiophyceae ont été décrites jusqu'à présent. On trouve notamment les « petits » Trebouxiophyceae *Chlorella nana*, *Stichococcus bacillaris* ainsi que l'espèce halotolérante *Picochlorum oklahomensis*. Le genre nouvellement établi *Picochlorum* regroupe certaines espèces précédemment incluses dans le genre *Nannochloris* (Henley et al. 2004).

### I. 3.2 Haptophyta

La division des Haptophyta compte environ 80 genres et 300 espèces répartis dans deux classes : les Pavlovophyceae et les Prymnesiophyceae. Les Pavlovophyceae ne comptent qu'un ordre (Pavlovaceae) composé de 4 genres : *Diacronema*, *Exanthemachrysis*, *Pavlova* et *Rebecca*. Les Prymnesiophyceae sont plus diversifiés avec l'existence de 4 ordres soutenus

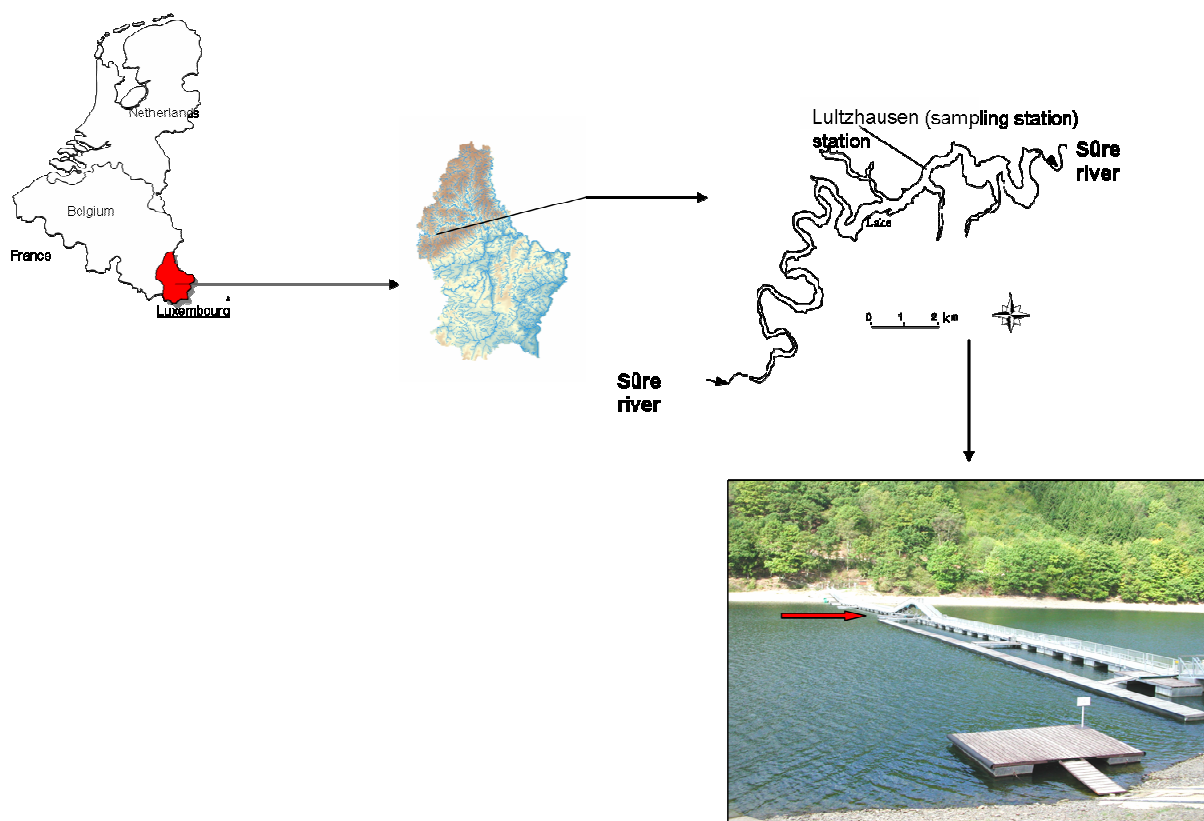
par des données morphologiques, ultrastructurales et moléculaires (Edvardsen et al. 2000) : l'ordre des Phaeocystales qui ne contient que le genre *Phaeocystis*, l'ordre des Prymnesiales, l'ordre des Isochrysidales et l'ordre des Coccolithales.

La plupart des haptophytes sont nanoplanctoniques et surtout rencontrés en milieu marin. C'est le cas par exemple du genre *Phaeocystis* et de l'espèce *Emiliania huxleyi* pouvant former des efflorescences importantes (Iglesias-Rodriguez et al. 2002 ; Baker et al. 2007 ; Verity et al. 2007). Les genres *Prymnesium* et *Chrysochromulina* sont connus pour former des efflorescences toxiques (Gjosaeter et al. 2000 ; Baker et al. 2007).

Parmi les espèces marines de taille inférieure à 3 µm, on trouve 4 espèces de *Chrysochromulina*. Ce genre peut être abondant en milieu côtier (Dahl et al. 2005). L'espèce *Phaeocystis cordata*, espèce décrite en Mer Méditerranée et ne produisant pas d'efflorescence (Zingone et al. 1999) ainsi que la forme coloniale *Phaeocystis pouchetii* qui est limitée aux eaux froides de l'hémisphère nord (Schoemann et al. 2005) peuvent aussi présenter des cellules inférieures à 3 µm. C'est le cas également pour les espèces *Imantonia rotunda*, *Dicrateria inornata*, *Trigonaspis minutissima* et *Ericiolus spiculiger* (Backe-Hansen & Thronsen 2002 ; Thomsen 1980 ; Thomsen et al. 1995).

Seulement une douzaine d'espèces d'eau douce ont été décrites jusqu'à présent dont notamment les espèces nanoplanctoniques *Diacronema vlkianum*, *Acanthoica schilleri*, *Anacanthoica ornata*, *Chrysochromulina breviturrita*, *Chrysotila lamellosa*, *Hymenomonas roseola* et *Prymnesium parvum* (John et al. 2002). L'espèce *Chrysochromulina parva* connue pour ses efflorescences toxiques, notamment dans un lac danois, peut présenter des cellules inférieures à 3 µm (Hansen et al. 1994). L'espèce *Chrysochromulina breviturrita* peut également produire des efflorescences dans certains lacs (Nicholls et al. 1982).

Des études pigmentaires ont montré que les haptophytes pouvaient contribuer entre 20 % et 50 % de la biomasse chlorophyllienne totale dans l'Océan mondial (Andersen et al. 1996). De même, des analyses pigmentaires réalisées sur la fraction picoplanctonique d'échantillons du Pacifique ont montré que les haptophytes pouvaient dominer la population picoplanctonique dans les régions oligotrophes des Océans (Moon-van der Staay et al. 2000).



**Figure I-5 :** Localisation du Luxembourg, du lac d'Esch-sur-Sûre et du point de prélèvement sur le lac (flèche rouge) à la station Lultzhausen.

**Tableau I-2 :** Caractéristiques morphométriques des lacs étudiés dans ce travail.

Caractéristiques morphométriques	Lac Pavin	Lac du Bourget	Lac d'Esch-sur-Sûre	Lac Aydat
Statut trophique	Oligo-mésotrophe	Mésotrophe	Méso-eutrophe	Eutrophe
Altitude (m)	1197	231,5	320	825
Surface (km <sup>2</sup> )	0,44	44,5	3,2	0,6
Longueur maximale (km)	0,7	18	18	1,76
Largeur moyenne (km)	0,62	3,4		0,46
Volume (km <sup>3</sup> )	0,02	3,6	0,06	0,004
Profondeur maximale (m)	98	145	46	15,5
Profondeur moyenne (m)	54,9	81	17	7,4
Surface du bassin versant (km <sup>2</sup> )	0,5	560	428	19,6
Temps moyen de renouvellement des eaux (an)	10	7	0,25	1

## I. 4 Milieux étudiés

Les caractéristiques morphométriques des lacs sont résumées dans le tableau I-2

### I. 4.1 Le lac d'Esch-sur-Sûre (Luxembourg)

Le lac d'Esch-sur-Sûre (ou réservoir de la Haute-Sûre) est localisé dans le Nord du Grand-Duché du Luxembourg (49°55' N – 5°55' E) (Figure I-5). Il est le résultat de la construction d'un barrage sur l'affluent principal (la Sûre) en 1957-1958. Depuis l'achèvement du barrage en 1959, le réservoir est utilisé notamment pour la génération d'énergie hydroélectrique mais surtout pour la production d'eau potable. Le sommet du barrage se situe à une altitude de 320 m. Le bassin versant du réservoir couvre une surface de 428 km<sup>2</sup> qui est occupée par 42 % de terres agricoles et 52 % de forêts. Le réservoir est caractérisé par une longueur d'environ 18 km et par une profondeur moyenne de 17 m. La profondeur maximale est de 46 m à proximité du barrage. Sa superficie est de 3,2 km<sup>2</sup> et son volume maximal de 0,06 km<sup>3</sup>. C'est un lac généralement monomictique (circulation libre durant l'hiver et stratification stable en été) comme ce fût le cas en 2006. Cependant certains hivers, comme en 2003, le lac peut se couvrir de glace et présenter une stratification inversée. Dans ce cas, il est défini comme étant dimictique. Son statut trophique est méso-eutrophe (Dohet & Hoffmann, 1995). Suivant les années, des efflorescences de cyanobactéries, principalement les espèces *Woronichinia naegeliana* ou *Planktothrix agardhii* sont observées à la fin de l'été et/ou début de l'automne (Willame et al. 2008).

### I. 4.2 Les lacs français Pavin, du Bourget et Aydat

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus en hybridation *in situ* fluorescente sur les échantillons du lac d'Esch-sur-sûre, des échantillons provenant de trois lacs français présentant des statuts trophiques différents de celui du lac luxembourgeois ont été analysés avec les mêmes sondes (Annexe II). Ces échantillons ont été prélevés durant l'été 2006 sur toute la colonne d'eau. Ils ont été aimablement fournis par l'équipe d'Isabelle Domaizon de l'Université de Savoie.



**Figure I-6 :** Photos des lacs français Pavin (A), du Bourget (B) et Aydat (C). Les photos proviennent du site <http://fr.wikipedia.org>

- ***Le lac Pavin***

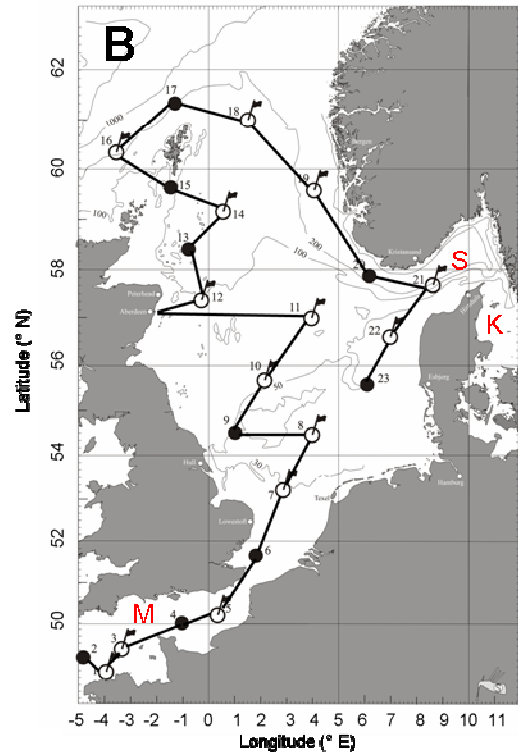
Le lac Pavin est situé dans le Massif Central français, sur le flanc Nord-Est du Puy de Montchal (Massif des Monts Dore, Puy de Dôme) à une altitude de 1197 m (Figure I-6A). Il présente une profondeur maximale de 98 m et une profondeur moyenne de 54,9 m. Le bassin versant du lac Pavin couvre une superficie de 0,5 km<sup>2</sup>. Les versants raides qui le bordent sont boisés de pins, d'épicéa et de hêtres. C'est un lac méromictique (le mélange des eaux ne s'effectue que sur les 60 premiers mètres) et dimictique. Il est considéré comme oligo-mésotrophe (Boucher et al. 2006).

- ***Le lac du Bourget***

Le lac du Bourget est situé dans les Alpes (Savoie) à une altitude de 231,5 m. Il est le plus grand lac naturel de France (44,5 km<sup>2</sup> et 3,6 milliards de m<sup>3</sup> d'eau) (Figure I-6B). Il présente une profondeur maximale de 145,4 m et une profondeur moyenne de 81 m. Le bassin versant du lac du Bourget couvre une superficie totale de 560 km<sup>2</sup>. Il est principalement constitué de terrains sédimentaires carbonatés. Il présente des régions très contrastées avec des zones totalement rurales et d'autres totalement urbaines. Ce lac a subi un processus d'eutrophisation jusqu'à la mise en place, dans les années 80, d'un programme de restauration. Son statut trophique est aujourd'hui considéré comme mésotrophe. Notons que depuis quelques années, le lac se caractérise par une prolifération d'une cyanobactérie filamenteuse toxique *Planktotrix rubescens*.

- ***Le lac Aydat***

Le lac Aydat se situe au sud ouest de Clermont-Ferrand, dans le Puy de Dôme à 825 m d'altitude (Figure I-6C). Sa surface est de 0,6 km<sup>2</sup>, sa profondeur moyenne est de 7 m et sa profondeur maximale est de 15,5 m. Le bassin versant qui présente une superficie de 19,6 km<sup>2</sup>, est essentiellement recouvert de prairies dans sa partie volcanique ancienne et de bois dans sa partie volcanique récente. Le lac Aydat est typiquement eutrophe et développe d'avril à octobre, un hypolimnion anoxique (Ogier, 1999).



**Figure I-7 :** Photo du « Pelagia », bateau océanographique du NIOZ (NIOZ, institut océanographique royal des Pays-Bas) (A). Trajet réalisé au cours de la campagne Microvir (B). Les cercles noirs correspondent aux stations courtes (moins de 6 heures) et les cercles blancs surmontés d'un drapeau correspondent aux stations longues (24 heures). Les lettres M, S et K en rouge situent la Manche, le Skagerrak et le Kattegat, respectivement. Les isobathes sont également montrées sur la carte.



Water mass	Salinity	Temperature (°C)
Atlantic water	> 35	7 – 15
Atlantic water (deep)	> 35	5.5 – 7.5
Channel water	> 35	6 – 18
Baltic water	8.5 – 10	0 – 20
Northern North Sea water	34.9 – 35.3	6 – 16
Central North Sea water	34.75 – 35.0	5 – 10
Southern North Sea water	34 – 34.75	4 – 14
Scottish coastal water	33 – 34.5	5 – 15
Continental coastal water	31 – 34	0 – 20
Norwegian coastal water	32 – 34.5	3 – 18
Skagerrak water	32 – 35	3 – 17
Skagerrak coastal water	25 – 32	0 – 20
Kattegat surface water	15 – 25	0 – 20
Kattegat deep water	32 – 35	4 – 15

**Figure I-8 :** Carte des différentes masses d'eau présentes en Mer du Nord et tableau reprenant la salinité et la température de ces masses d'eau (Reid et al. 1988). L'épaisseur des flèches est indicative du volume de transport. Les flèches rouges correspondent aux masses d'eau relativement pures d'origine Atlantique.



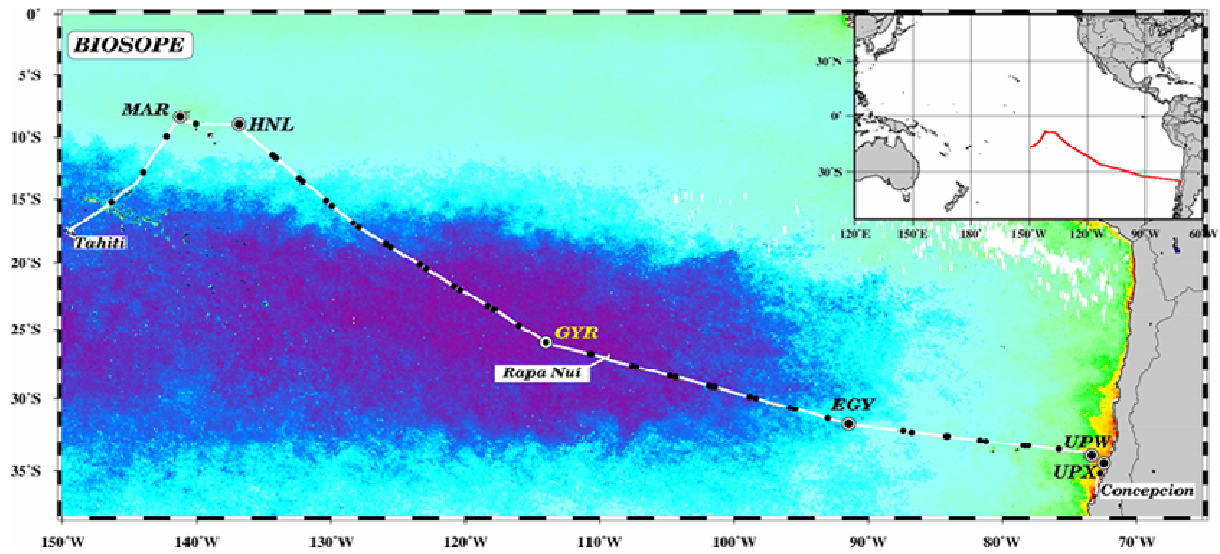
#### I. 4.3 La Manche et la Mer du Nord (Microvir 2007)

La campagne Microvir s'est déroulée du 2 juillet 2007 au 30 juillet 2007 en Mer du Nord, à bord du Pelagia (NIOZ, institut océanographique royal des Pays-Bas) (Figure I-7A).

Le trajet réalisé a débuté à Brest (France) et s'est terminé à Texel (Pays-Bas), en passant par les côtes anglaises, les eaux d'Atlantique Nord et le Skagerrak (Figure I-7B).

La mer du Nord est caractérisée par différentes masses d'eau, certaines entrant par le sud et allant vers le nord et d'autres d'origine atlantique entrant par le nord (Figure I-8) (Reid et al. 1988). Dans sa partie peu profonde (environ 30 m), notamment au niveau de la Manche, ces masses d'eau sont composées d'un mélange d'eau de mer et d'eau douce. Dans les zones plus profondes (de 200 m vers l'Océan Atlantique jusque 700 m au niveau du Skagerrak), nous retrouvons de l'eau relativement pure d'origine Atlantique. Ces différentes masses d'eau sont caractérisées par des salinités s'échelonnant entre 8,5 psu dans la Mer Baltique à plus de 35 psu notamment dans la Manche et des températures allant de 0 °C à 20 °C. Dans les eaux côtières, au-delà des estuaires et des fjords, l'intervalle de salinité varie de 32 psu à 34,5 psu, sauf dans le Kattegat et une partie du Skagerrak où l'influence de la Mer Baltique induit des salinités entre 10 psu et 25 psu, et entre 25 psu et 34 psu, respectivement. En dehors des zones côtières et surtout dans la partie occidentale de la Mer du Nord, les changements saisonniers de la salinité des eaux de surface (autour de 35 psu) sont relativement faibles. Alors qu'en hiver, l'eau de la plupart des régions de la Mer du Nord (excepté les côtes Norvégiennes, le Kattegat et le Skagerrak) est bien mélangée, la profondeur de la thermocline augmente de mai à septembre et diffère suivant les régions. En fin d'été, elle atteint typiquement 50 m dans la partie nord et 20 m dans la partie occidentale. Les zones peu profondes du sud de la Mer du Nord et de la Manche restent bien mélangées tout au long de l'année, notamment à cause des fortes marées. Le Kattegat, le Skagerrak et les côtes Norvégiennes sont fortement influencés par l'apport d'eau douce. La faible salinité de la couche supérieure empêche le mélange avec les couches inférieures et provoque une stratification stable dans ces régions tout au long de l'année (Reid et al. 1988).

La circulation et la distribution des différentes masses d'eau jouent un rôle très important dans la productivité biologique, ainsi que le transport et la concentration de la matière vivante.



**Figure I-9 :** Carte du Pacifique Sud montrant les différents sites d'échantillonnage au cours de la campagne BIOSOPE sur laquelle une carte SeaWiFS a été superposée. La couleur violet foncé indique de très faibles valeurs de chlorophylle *a* totale ( $0.018 \text{ mg m}^{-3}$ ). Les zones HNLC (HNL), du tourbillon Sud Pacifique (GYR), de la zone de transition (EGY) et de l'upwelling (Upw) sont indiquées sur la carte.

#### I. 4.4 Le Pacifique Sud-Est (BIOSOPE 2004)

La campagne BIOSOPE s'est déroulée dans le Pacifique Sud-Est entre Tahiti et les côtes du Chili, d'octobre à décembre 2004 (Figure I-9). Au cours de cette campagne, des zones océaniques très contrastées ont été échantillonnées :

- La zone de l'upwelling au large du Chili est caractérisée par des gradients de biomasse planctonique très marqués dus à la complexité des forcings physiques et à la dynamique rapide de la réponse biologique.
- La zone subéquatoriale au nord des Tuamotu est HNLC (High Nutrient, Low Chlorophyll) : bien que les éléments nutritifs azote et phosphore y soient abondants, la biomasse y reste faible à cause de la limitation par le fer. Cette limitation est cependant levée au large des Marquises où se produisent des efflorescences localisées, sans que l'on en connaisse exactement la cause.
- La zone de transition entre le tourbillon Sud Pacifique et les côtes Sud américaines. Cette zone est moins oligotrophe que le tourbillon Sud Pacifique mais reste quand même moins productive que les zones de l'upwelling et subéquatoriale.
- Le tourbillon Sud Pacifique est la zone la plus oligotrophe de l'océan mondial selon les mesures satellitaires, ce qui a été confirmé lors de la campagne BIOSOPE avec l'observation de maxima profonds de chlorophylle à plus de 200 m de profondeur et un disque de Secchi visible à 72 m (Morel et al. 2007).

## I. 5 Méthodes utilisées pour l'étude de la structure des communautés eucaryotiques de petite taille

Parmi les techniques permettant une quantification des organismes dans les milieux aquatiques la microscopie et la cytométrie en flux sont les plus utilisées.

La cytométrie en flux est principalement utilisée pour le comptage des organismes de petite taille présents dans le milieu soit à partir de l'autofluorescence naturelle des organismes due à leur contenu en pigment (par exemple, la phycoérythrine chez les cyanobactéries et la chlorophylle chez les eucaryotes autotrophes) soit par l'utilisation de colorant (bactéries, virus marqués par SYBRGreen I par exemple) (Marie et al. 1999). Cette technique ne permettant pas une identification taxinomique poussée des organismes étudiés, elle est utilisée dans le but de connaître les abondances et la distribution des grands groupes d'organismes tels que les bactéries, les cyanobactéries *Prochlorococcus* et *Synechococcus* ainsi que les pico-eucaryotes et nano-eucaryotes autotrophes (Binder et al. 1996 ; Crosbie et al. 2003).

La microscopie permet l'étude de la composition des communautés sur la base de critères morphologiques. Néanmoins, lorsqu'il s'agit d'organismes de taille inférieure à 5 µm, les distinctions morphologiques sont parfois difficiles à cause de leur petite taille. C'est pourquoi la microscopie à épifluorescence est utilisée en parallèle avec la technique d'hybridation *in situ* fluorescente couplée à l'amplification du signal (FISH-TSA) (Biegala et al. 2003). En effet, l'utilisation de sondes oligonucléotidiques spécifiques permet d'identifier et de quantifier les cellules en milieu naturel, l'identification des organismes pouvant se faire jusqu'au niveau de l'espèce. C'est par exemple le cas pour l'espèce picophytoplanctonique *Micromonas pusilla* dont la distribution dans différents milieux marins très contrastés a été étudiée ces dernières années (Not et al. 2004, 2005, 2008). Par cette technique, Foulon et al. (2008) ont par ailleurs démontré la présence et l'occupation de niches écologiques spécifiques de trois clades phylogénétiques au sein de cette espèce.

La quantification des groupes taxinomiques en milieu naturel se fait également à l'aide de l'analyse pigmentaire d'échantillons par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cependant, la technique HPLC ne permet une identification des organismes qu'au niveau de la classe. De plus, la quantification de la contribution de chaque classe à la chlorophylle *a* totale dépend du contenu pigmentaire, qui est variable suivant les espèces d'un même taxon et selon les conditions environnementales comme l'intensité d'éclairement par exemple (Jeffrey et al. 1999).

L'étude de la diversité au sein des protistes (eucaryotes unicellulaires) est réalisée principalement par l'analyse du gène codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (ARNr 18S chez les eucaryotes). Plusieurs avantages ont fait de ce gène un marqueur taxinomique de choix (Woese et al. 1987). Le ribosome traduit les ARN messagers en protéines et joue donc un rôle essentiel dans la synthèse de ces derniers. On le retrouve chez l'ensemble des eucaryotes. De plus, aucun transfert latéral de gènes entre espèces n'a été mis en évidence. Le gène de l'ARNr 18S faisant approximativement 1800 pb, il représente le meilleur compromis entre la taille et la variabilité de séquences par comparaison aux autres sous-unités de l'ARN ribosomal (5S et 28S). De ce fait, il permet une discrimination des organismes à différents niveaux taxinomiques. Il faut noter cependant que lorsque l'on désire distinguer des organismes phylogénétiques très proches, il est conseillé d'utiliser des marqueurs plus variables comme le gène codant pour la grande sous-unité ribosomale (ARNr 28S) ou les ITSr. L'un des avantages de l'ARNr 18S est la disponibilité d'importantes bases de données de séquences. Par exemple, en avril 2008, 38 313 séquences eucaryotes d'ARNr 18S étaient disponibles dans la base de données SILVA (Pruesse et al. 2007).

Parmi les techniques de biologie moléculaire utilisées pour étudier la diversité eucaryotique des milieux aquatiques, il y a les techniques d'empreintes génétiques (fingerprinting) qui permettent d'étudier la diversité des organismes mais également de comparer rapidement la structure des populations microbiennes étudiées (Head et al. 1998). Il s'agit notamment de la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) et de la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer et al. 1993 ; Liu et al. 1997).

Une autre méthode permettant l'étude de la diversité des communautés est le séquençage du gène de l'ARNr 18S après clonage. Les clones sont obtenus à partir d'ADN génomique extrait d'échantillons naturels. Cette technique permet de générer un grand nombre de séquences. De plus, cette technique permet d'accéder à la diversité d'espèces non cultivables et également de produire des bases de données qui peuvent être utilisées pour la conception de sondes oligonucléotidiques qui pourront être utilisées en hybridation *in situ* fluorescente couplée à l'amplification du signal (FISH-TSA).

Au cours de ce travail, des méthodes de biologie moléculaire, microscopie à épifluorescence et cytométrie en flux ont été utilisées afin de connaître les abondances et la diversité des groupes étudiés. Les abondances ont été obtenues par la cytométrie en flux, par la microscopie à épifluorescence et l'hybridation *in situ* fluorescente couplée à une amplification

du signal (FISH-TSA) (**Chapitres II, III et IV**). Le clonage-séquençage a été utilisé dans le but d'étudier la diversité des picoeucaryotes d'eau douce (**Chapitre II**).

Le protocole de chaque technique utilisée dans ce travail est détaillé dans l'**annexe I**.

## I. 6 Objectifs et approche du travail

Nous avons vu précédemment que les Chlorophyta et en particulier, la classe des Prasinophyceae ainsi que les Haptophyta étaient deux groupes bien représentés dans les espèces de plancton eucaryote de petite taille.

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer la contribution des Chlorophyta et Haptophyta parmi les eucaryotes de différentes classes de taille dans des milieux marins et d'eau douce présentant des statuts trophiques différents. Nous avons pu ainsi commencer à répondre à la question de la dominance de la « lignée rouge » ou de la « lignée verte » dans les plus petites fractions de taille et les différents milieux étudiés.

En milieu lacustre, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à la caractérisation et à la distribution saisonnière et verticale du plancton de petite taille du lac d'Esch-sur-Sûre (Luxembourg), avec un intérêt particulier pour la partie eucaryote. On s'est ensuite intéressé à la distribution verticale de la contribution des Chlorophyta et Haptophyta aux différentes saisons au sein de ce lac. Dans un second temps, nous avons évalué la contribution des Chlorophyta et Haptophyta le long d'un gradient trophique sur des échantillons de lacs méso-oligotrophes à eutrophes (**Chapitre II**).

La campagne Microvir nous a permis d'acquérir des échantillons répartis entre la Manche et le Skagerrak en Mer du Nord. Nous nous sommes intéressés tout d'abord à la contribution des eucaryotes hétérotrophes et autotrophes dans les différentes masses d'eau rencontrées au cours de la campagne. Nous nous sommes ensuite concentrés sur la distribution et la contribution des Chlorophyta et Haptophyta, ainsi que sur la distribution des dinoflagellés et des diatomées qui dominent la biomasse phytoplanctonique à cette période de l'année (été) (**Chapitre III**).

Les échantillons provenant de la campagne BIOSOPE nous ont permis, dans un premier temps, d'étudier la distribution des micro-organismes tels que les cyanobactéries, les ciliés, les dinoflagellés et les eucaryotes autotrophes et hétérotrophes le long d'un transect caractérisé par des masses d'eau très contrastées (eaux hyper-oligotrophes à des eaux très eutrophes). Dans un second temps, l'évaluation de la contribution des Chlorophyta et Haptophyta dans les eaux du Pacifique Sud-Est, a mis en évidence certaines limites de l'utilisation de la méthode FISH-TSA, en particulier sur des échantillons provenant d'environnements très oligotrophes (**Chapitre IV**).

# CHAPITRE II

**Communautés planctoniques de  
petite taille d'un lac méso-eutrophe  
(Esch-sur-Sûre, Luxembourg)**



## II. 1 Résumé en français

La caractérisation des communautés planctoniques de petite taille (0,2  $\mu\text{m}$  – 10  $\mu\text{m}$ ) du lac d'Esch-sur-sûre (mésotrophe) au Luxembourg a été réalisée en 2006. Les analyses en cytométrie en flux nous ont permis de déterminer la distribution des pico- et nanoeucaryotes autotrophes, ainsi que des cryptophytes et des picocyanobactéries le long de la colonne d'eau. Contrairement à la plupart des lacs, les picoeucaryotes autotrophes dominaient les communautés planctoniques et ont montré deux pics d'abondance en avril et en juillet ( $1,62 \cdot 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  et  $7,6 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$ , respectivement). Leur distribution verticale semblait être corrélée avec la température. L'abondance des picocyanobactéries était basse tout au long de l'année ( $400 \text{ cell mL}^{-1}$  maximum). Ils ont dominé les communautés planctoniques uniquement en octobre lorsque leur maximum fut observé. Leur distribution semblait être inversement corrélée aux concentrations en phosphore. Les nanoeucaryotes autotrophes et les cryptophytes ont montré deux pics d'abondance en avril et en juillet ( $1,82 \cdot 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  et  $7,9 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$  pour les nanoeucaryotes ;  $4,2 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$  et  $1,6 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$  pour les cryptophytes). Leur distribution n'a pas montré de corrélation claire avec les facteurs abiotiques. L'approche moléculaire nous a permis d'évaluer la diversité au sein des picoeucaryotes (clonage du gène de l'ARNr 18S) et d'estimer la contribution des Chlorophyta et des Haptophyta (FISH-TSA) parmi les eucaryotes de différentes tailles (inférieure à 2  $\mu\text{m}$ , entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$ , supérieure à 5  $\mu\text{m}$ ). Les deux techniques ont montré que la contribution des Chlorophyta et des Haptophyta était faible parmi les organismes pigmentés, ces derniers étant généralement dominés par les cryptophytes. La contribution des Chlorophyta était généralement plus importante dans la fraction picoplanctonique et la fraction supérieure à 5  $\mu\text{m}$ , alors que les Haptophyta ont montré des contributions plus importantes dans la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$ . Des pico-haptophytes ont été détectés en hiver, durant la phase d'eau claire et en automne. La fraction picoplanctonique a montré la diversité (gène de l'ARNr 18S) la plus élevée en février et la dominance des taxons non colorés en février et en juillet. Les séquences majeures ont été affiliées aux cryptophytes (29,8 %), Ciliophora (24,5 %), Metazoa (10,7 %) et Fungi (7,6 %). Les séquences de parasite potentiel ont été détectées dans toutes les banques de clones mais dominaient seulement en juillet, suggérant une corrélation avec une présence plus importante d'hôtes potentiels à cette période.

Draft version to be submitted to Freshwater Biology

## **Small planktonic communities in a meso-eutrophic lake (Esch-sur-Sûre, Luxemburg).**

Sylvie Masquelier\*, Daniel Vaultot\*

*\* UPMC (Paris-06) et CNRS, UMR 7144, Groupe Plancton Station Biologique de Roscoff,  
BP74, 29682 Roscoff, Cedex, France*

## SUMMARY

The characterization of the small planktonic communities (0.2  $\mu\text{m}$  – 10  $\mu\text{m}$ ) of the Esch-sur-Sûre Lake (meso-eutrophic) in Luxemburg was realized during 2006. Flow cytometry analyses allowed us to determine the distribution throughout the water column of autotrophic pico- and nanoeukaryotes, and those of cryptophytes and picocyanobacteria. We showed that contrary to most lakes, autotrophic picoeukaryotes dominated the planktonic communities in the lake and showed two peaks of abundance in April and July ( $1.62 \cdot 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  and  $7.6 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$ ). Their distribution throughout the water column seemed to be correlated with temperature. Picocyanobacteria abundance was low through the year (maximum  $400 \text{ cell mL}^{-1}$ ). They dominated the planktonic communities only in October when their maximum abundance occurred. Their distribution seemed to be inversely correlated with phosphorus concentrations. Autotrophic nanoeukaryotes and cryptophytes showed two peaks of abundance in April and July ( $1.82 \cdot 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  and  $7.9 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$  for nanoeukaryotes;  $4.2 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$  and  $1.6 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$  for cryptophytes). Their distribution did not show any clear correlation with abiotic factors. Molecular approach was used to evaluate the diversity of picoeukaryotes (cloning of 18S rRNA gene) and to estimate the contribution of Chlorophyta and Haptophyta (TSA-FISH) among eukaryotes of different size classes (smaller than 2  $\mu\text{m}$ , between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$ , and larger than 5  $\mu\text{m}$ ). Both techniques showed that Chlorophyta and Haptophyta contributions remained low among pigmented organisms, the latter being generally dominated by cryptophytes. Chlorophyta contribution was generally higher for the fractions smaller than 2  $\mu\text{m}$  and larger than 5  $\mu\text{m}$  while Haptophyta contribution was higher in the fraction between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$ . Pico-haptophytes were recorded in winter, during the clear water phase and in autumn. The pico-sized fraction showed the highest 18S rRNA gene diversity in February and the dominance of colourless taxa only in February and July. The main sequences were affiliated to cryptophytes (29.8 %), Ciliophora (24.5 %), Metazoa (10.7 %) and Fungi (7.6 %). Potential parasite sequences were recorded in all clone libraries and dominated only in July, suggesting a correlation with a higher occurrence of potential hosts at this period.

*Keywords:* meso-eutrophic lake, flow cytometry, TSA-FISH, 18S rRNA gene cloning, eukaryote, picocyanobacteria, small plankton

## Introduction

Small planktonic organisms (0.2  $\mu\text{m}$  – 10  $\mu\text{m}$ ) are found in marine and freshwater ecosystems with densities which can reach  $10^4$  cell  $\text{mL}^{-1}$  (Caron *et al.*, 1999; Sarmiento *et al.*, 2008). They constitute essential components of the microbial food web and play significant roles in the geochemical cycles (Azam *et al.*, 1983; Caron *et al.*, 1999; Stockner & Antia, 1986).

Generally, small planktonic communities of lakes are dominated by picocyanobacteria whatever the trophic status, autotrophic picoeukaryotes being often about one order of magnitude less abundant than picocyanobacteria (Stockner, Callieri & Cronberg, 2000). The latter show generally two peaks of abundance, one in spring and another one in late summer while autotrophic picoeukaryotes tend to peak only in spring or early summer (Stockner, 1991; Weisse, 1993). Most studies in lakes focused on the picophytoplanktonic concentration at only one selected depth, abundance estimates being therefore not really representative of the euphotic zone (Stockner *et al.*, 2000).

Because of their size, small planktonic organisms are difficult to characterize by optical microscopy. Molecular techniques like 18S rRNA gene cloning and sequencing allow the analysis of their diversity in several environments and showed in particular, high phylogenetic diversity among small eukaryotic population (Diez, Pedros-Alio & Massana, 2001; Richards *et al.*, 2005; Šlapeta, Moreira & Lopez Garcia, 2005). Recent studies on French lakes have reported a general dominance of heterotrophic cells within small eukaryote assemblages (Lefranc *et al.*, 2005; Lepère *et al.*, 2006).

The meso-eutrophic Esch-sur-Sûre Lake is a water drinking reservoir situated in Luxemburg. It has been the focus of many studies, in particular on bloom-forming cyanobacteria and on the dynamics of protozoan and zooplankton communities (Dohet & Hoffmann, 1995; Jacquet *et al.*, 2005; Willame *et al.*, 2008; Wille & Hoffmann, 1991). However, no one has examined small planktonic communities.

In the present study, we characterized the small planktonic communities present in the lake during a period of one year in order to evaluate the seasonal changes occurring in these communities. Flow cytometry allowed us to have the evolution of autotrophic pico and nano eukaryotes as well as those of cryptophytes and picocyanobacteria throughout the water column at different sampling dates. TSA-FISH was used to evaluate the contribution of Chlorophyta and Haptophyta among eukaryotes of different size classes (smaller than 2  $\mu\text{m}$ , between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$ , larger than 5  $\mu\text{m}$ ). Cloning approach was used to identify the main

**Table 1** Sampling dates, depth of chlorophyll maximum (DCM), chlorophyll *a* concentration at DCM and clone libraries constructed.

<b>Sampling date</b>	<b>DCM (m)</b>	<b>Chl <i>a</i> (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Clone library</b>
22 <sup>nd</sup> February	0	1.71	+
23 <sup>rd</sup> February	0	1.29	
19 <sup>th</sup> April	5	7.85	
25 <sup>th</sup> April	0	13.56	
27 <sup>th</sup> April	0	15.75	+
2 <sup>nd</sup> May	0	4.28	
4 <sup>th</sup> May	5	2.29	
23 <sup>rd</sup> May	0	2.54	
1 <sup>st</sup> June	5	4.4	
25 <sup>th</sup> July	0	7.17	
27 <sup>th</sup> July	0	7.09	+
24 <sup>th</sup> October	13	3.07	+
26 <sup>th</sup> October	13	1.83	

phylogenetic groups present at four sampling dates at the depth of chlorophyll maximum (DCM).

## Methods

### *Study site and sampling*

The meso-eutrophic lake of Esch-sur-Sûre is located in the Northern part of the G-D of Luxemburg. It is monomictic with a maximum depth of 46 m. It results from a dam constructed on the main affluent (Sûre river) in 1957-58. The lake stratifies from April to September. For the main limnological, morphometrical and geographical features of the Esch-sur-Sûre Lake, see Willame *et al.* (2008).

Samples were taken between February and October 2006 from a floating bridge at the center of the Lake (Lultzhausen station). Sampling dates are summarized in the Table 1. Water was collected with a Ruttner sampler at 6 depths (surface, 5 m, 10 m, 13 m, 17 m, 25 m).

### *Biotic variables*

The water temperature, the pH, conductivity and level of dissolved oxygen were determined with a multiparameter probe (Hydrolab DS-4). Water transparency was determined by Secchi disk. Chemical analyses, namely, ammonium (NH<sub>4</sub>-N), nitrates (NO<sub>3</sub>-N), orthophosphate (PO<sub>4</sub>-P), and total phosphorus (Tot P), were performed using standard methods as described in Willame *et al.* (2008). Chlorophyll *a* concentrations were obtained by spectrophotometry after filtration on GF/F Whatman filters (Arar, 1997).

### *Flow cytometry analyses*

Samples were run after the last sampling (October 2006) using a FACSort flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) with the standard protocol described in Marie *et al.* (1999). Four populations were discriminated on the basis of their fluorescence and size characteristics: pico- and nanoeukaryotes, picocyanobacteria, and cryptophytes.

### *Sampling and nucleic acid extraction*

One sample per season was collected in the DCM. Water samples (1 L) were prefiltered through 3 µm pore size polycarbonate filters (diameter 47 mm, Nuclepore, Whatman International, Maidstone, UK) in order to separate small organisms. Cells were

collected on 0.22 µm filters (diameter 47 mm, Gelman Sciences). The filters were covered with lysis buffer (20 mM EDTA, 400 nM NaCl, 0.75 M sucrose, 50 mM Tris pH 9), frozen in liquid nitrogen and stored at – 80°C until nucleic acid extraction.

For nucleic acid extraction, we added a lysosyme solution (final concentration, 500 µg mL<sup>-1</sup>) to the filters and incubated them at 37 °C for 20 min. Then sodium dodecyl sulfate (10%) and proteinase K (final concentration, 100 µg mL<sup>-1</sup>) were added, and the filters were incubated at 37°C for at least 60 min. A cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) solution (3 % CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2 % 2-mercaptoéthanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8) was added, and samples were incubated at 65°C for 10 min. Nucleic acids were extracted with one volume of chloroform/isoamyl alcohol (24:1); the aqueous phase containing nucleic acids was kept and precipitated by addition of isopropanol (0.6 volume). It was stored at - 20°C for 12 h. After centrifugation, the DNA pellet was ethanol rinsed (80 % ethanol solution) and resuspended in 50µl of sterilized MQ water. The DNA yield was quantified by NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) and nucleic acid extracts were stored at -20°C until analysis.

#### *Eukaryotic rRNA genetic library*

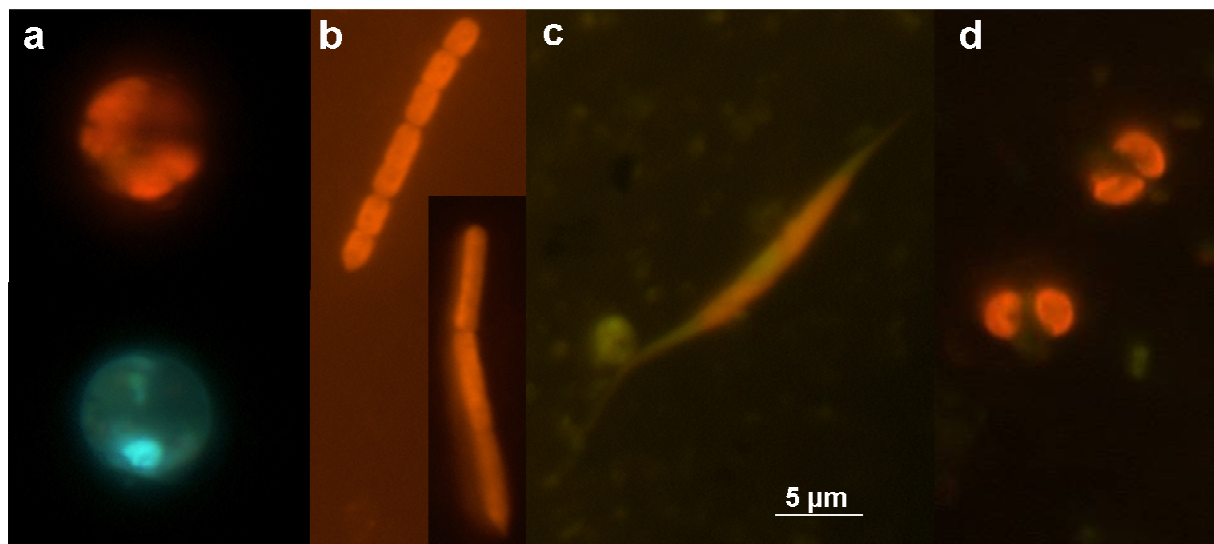
Eukaryotic 18S rRNA genes were amplified using the general eukaryotic primers Euk328f and Euk329r (Romari & Vaultot, 2004). The PCR mixture (50 µl) contained about 10 ng of environmental DNA, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol of each primer, 1.5 U of *Taq* DNA polymerase (Promega), and the PCR buffer supplied with the enzyme. Reactions were carried out in an automated thermocycler (Applied Biosystems) with the following cycle: initial denaturation at 95°C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 57°C for 45 sec, and extension at 72°C for 1 min, 30 s; and a final extension at 72°C for 10 min. Amplified products from four individual PCR reactions were pooled. These PCR products were used to construct one clone library for each investigated date (Feb, April, July, Oct) by using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations.

#### *rRNA gene sequencing*

Between 50 and 100 clones from each library were randomly picked from different plates. The presence of the 18S rRNA gene insert in positive colonies was checked by PCR amplification using flanking vector primers (M13f and M13r). Double-stranded plasmid DNAs from selected clones were extracted with Montage<sup>TM</sup> Plasmide MiniprepHTS 96 kit (Millipore).

**Table 2** Oligonucleotide probes used in the present study.

Probe name	Sequence	Target group	Reference
EUK1209	5'-GGGCATCACAGACCTG-3'	Eukaryotes	Giovannoni et al. (1988); Lim et al. (1993)
CHLO01	5'-GCTCCACGCCTGGTGGTG-3'	Most Chlorophyta/Some Non-Chlorophyta	Simon et al. (1995)
NCHLO01	5'-GCTCCACTCCTGGTGGTG-3'	Most Non-Chlorophyta/Some Chlorophyta	Simon et al. (1995)
CHLO02	5'-CTTCGAGCCCCCACTTT-3'	Chlorophyta	Simon et al. (2000)
PRYM02	5'-GGAATACGAGTGCCCCCTGAC-3'	Haptophyta	Simon et al. (2000)



**Fig. 1** Pictures of *Chlorella*-like cell taken under blue light (top) and UV light (bottom) on April 27 in surface (a), picocyanobacteria taken under green light on October 24 in surface (top) and on June 1 at 5 m depth (b), *Schroederia*-like cells taken under blue light on June 1 at 5 m depth (c), and haptophyte-like cells taken under blue light on July 27 at 5 m depth (d).



A single sequencing reaction using the primer Euk528f (Romari & Vaultot, 2004) was first performed for all clones, resulting in 300–800 bp sequences. One clone of each OTU was selected for full sequencing using vector primers and an internal primer, Euk1269r (López-García *et al.*, 2003). Fourty six OTUs were totally sequenced.

Phylotype redundancy and species richness were estimated using the program FastGroupII (Yu *et al.*, 2006). For each clone library, all partial sequences were grouped into OTUs with 80 % of sequence match similarity (somewhat equivalent to a 98 % identity threshold). Rarefaction curve as well as the non-parametric richness estimators Chao1 (Chao, 1984; Chao, 1987) and the Shannon-Wiener Index (SW index) (Shannon & Weaver, 1963) were generated by the FastgroupII program for each clone library.

### *Phylogenetic analyses*

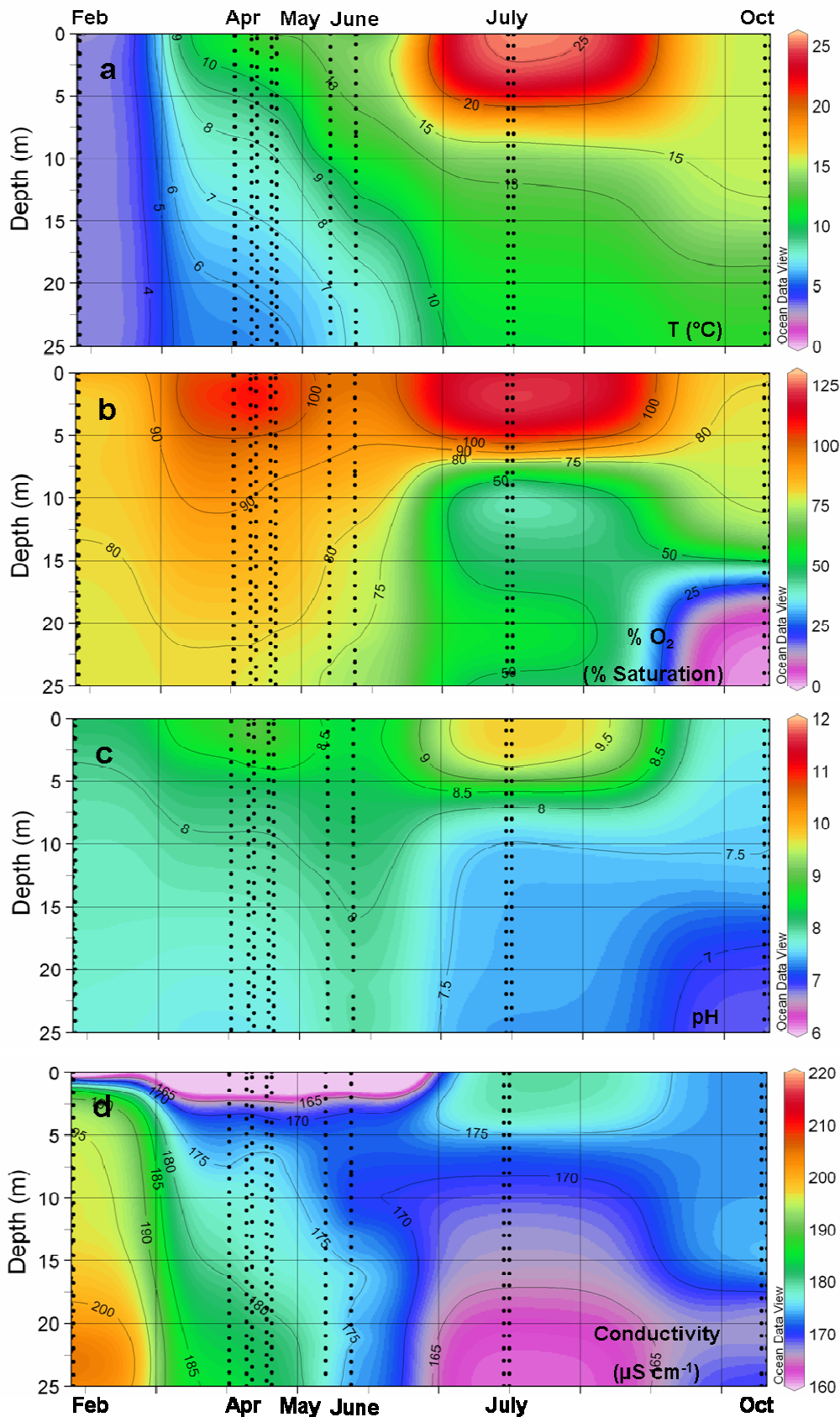
To determine the phylogenetic affiliation of each sequence, it was compared with sequences available in databases using BLAST from the National Center for Biotechnology Information (Altschul *et al.*, 1997). All sequences were screened for potential chimeric structures by using the programs Chek Chimera and KeyDNAtools (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgi/chimeras.cgi?su=SSU> and <http://www.keydnatools.com>).

### *FISH associated with tyramide signal amplification*

Water samples (45 mL) were prefiltered on 10 µm pore size filters (Millipore) in order to render easier the visualization of small plankton, fixed with 1 % paraformaldehyde (final concentration) at 4°C for 1h, and immobilized onto 0.2 µm pore size Anodisc (Whatman Int. Ltd., Maidstone, Kent, UK). The cells were then dehydrated in an ethanol series (50 %, 80 %, 100 %, 3 min each; Amann (1995)), dried, and kept at -80°C in the lab until TSA-FISH analysis.

The oligonucleotide probes Euk1209, Chlo01 and NChlo01 were used as a mix in order to target all the eukaryotes, as well as Chlo02 for Chlorophyta and Prym02 for Haptophyta (table 2). Whole cell *in situ* hybridization with TSA amplification was performed according to Masquelier *et al.* (Chapitre III).

Counts were performed with an Olympus BX51 epifluorescence microscope (Olympus Optical CO, Tokyo, Japan) equipped with a mercury light source and an x100 UVFL objective. Hybridized cells were observed under blue light (490/515 nm) to excite fluorescein. The parallel DAPI staining on TSA-FISH filters allowed us to discriminate eukaryotic from prokaryotic organisms. Under UV light (360/420 nm), eukaryotic cell



**Fig. 2** Temporal evolution of vertical profiles of temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) (a), oxygen saturation (%) (b), pH (c), and conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) (d) during the study period (2006) in Esch-sur-Sûre Lake. Black dots correspond to samples analyzed. Contour plots generated with the software Ocean Data View.

nucleus appeared as a separate blue organelle. For prokaryotes, no nucleus was visible and cells appeared uniformly stained. Cells were classified according to three diameter ranges: (1) smaller than 2 µm, (2) between 2 µm and 5 µm, (3) larger than 5 µm. For each sample, 15 to 30 fields and a minimum of 100 cells were counted.

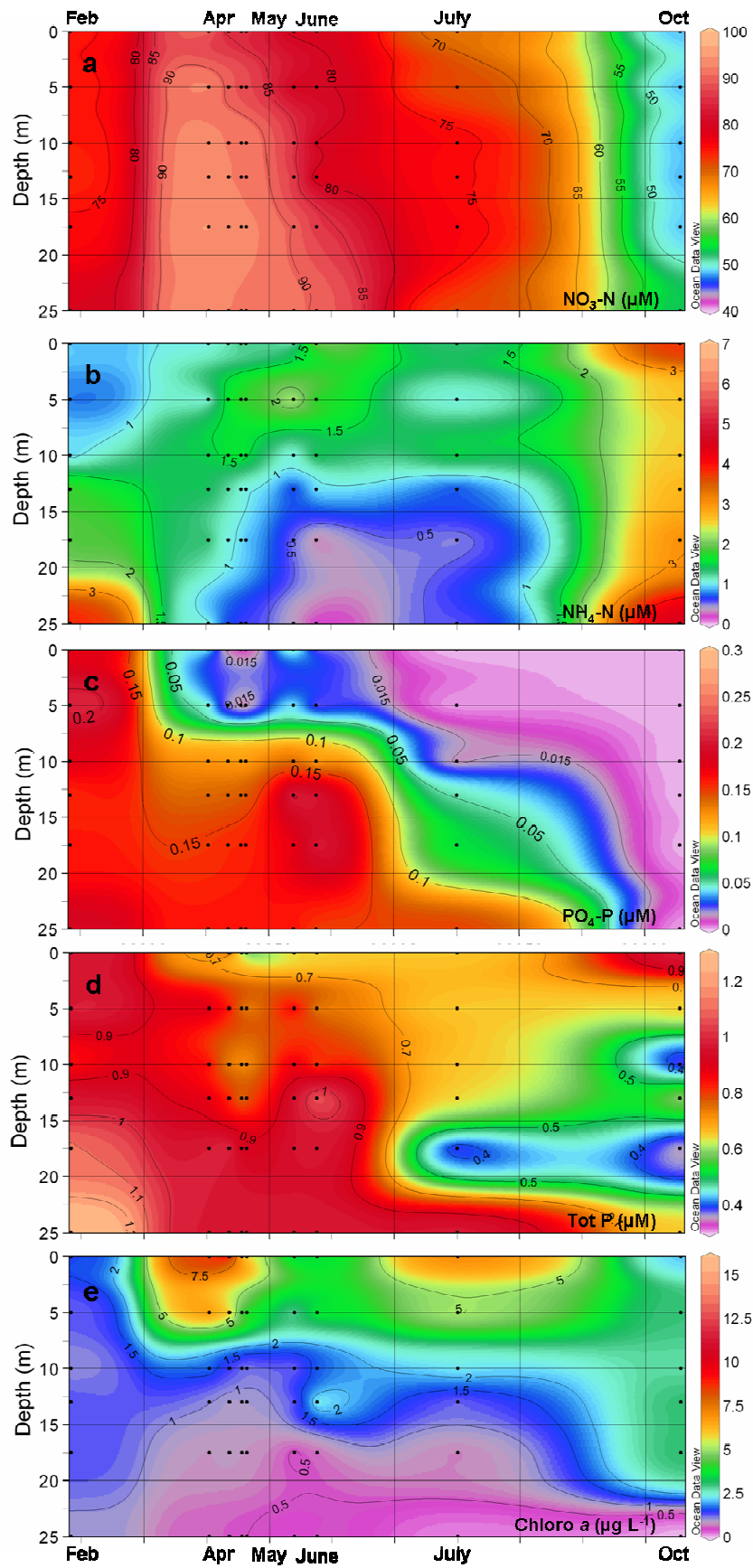
Pictures were taken with a Spot RT-slider camera (Diagnostics Instruments, Sterling Heights, MI) on samples (50 mL) fixed with glutaraldehyde (0.25 % final concentration), filtered through 0.8 µm pore size black filters, stained with 50 µL of 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 5 µg mL<sup>-1</sup> final concentration) and stored at -20 °C until observations on the BX51 Olympus microscope (Fig. 1).

In order to validate our microscopy counts, we compared them to counts of eukaryotes done by flow cytometry. There was a relatively good correlation between the two methods, such that global distribution trends were identical. However, slope was significantly larger than one ( $y = 1.82x$  ;  $R^2=0.73$ ;  $n=52$ ) indicating that microscopy was underestimating actual concentrations as observed in the other environments investigated. This could be due to poor filter conservation. Tests made on environmental samples showed that eukaryote cells counted on filters stained with DAPI were 2 times lower after one month of storage at -20 °C than initially and then stabilized (data not shown). In contrast, tests made on cytometry samples showed no discrepancy between counts realized within one year (data not shown). However, despite the discrepancies obtained between cytometry and microscopy counts, distribution patterns were similar with both methods.

## Results

### *Physical and chemical environments*

The temperature fluctuated between 2.4 °C and 26 °C throughout the study period (Fig. 2a). Thermal stratification appeared in April with a thermocline around 3 m depth. The percentage of oxygen saturation exhibited a vertical distribution closely related to temperature pattern (Fig. 2b). The water column was saturated from February to June. On July 27, saturation decreased in the epilimnion to less than 50 % at 10 m depth. On October 24, saturation decreased from 80 % in the upper layer (15 m-layer) to practically zero at the bottom. The pH did not vary importantly in winter and autumn, whereas from April to July, higher values were observed in the surface layer, pH maxima (9.56 on April 27 and 9.76 on July 27) coinciding with those of the chlorophyll *a* concentration (Fig. 2c and 3e).



**Fig. 3** Temporal evolution of vertical profiles of concentrations of nitrates ( $\mu\text{M}$ ) (a), ammonium ( $\mu\text{M}$ ) (b), orthophosphate ( $\mu\text{M}$ ) (c), total phosphorus ( $\mu\text{M}$ ) (d), and chlorophyll *a* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) during the study period (2006) in Esch-sur-Sûre Lake. Legend as in Fig. 2.

The conductivity fluctuated between  $161 \mu\text{S cm}^{-1}$  on July 27 and  $210 \mu\text{S cm}^{-1}$  on February 22 with only minor vertical variations (Fig. 2d). It was slightly greater next to the lake bottom from February to June while the opposite pattern was observed in July.

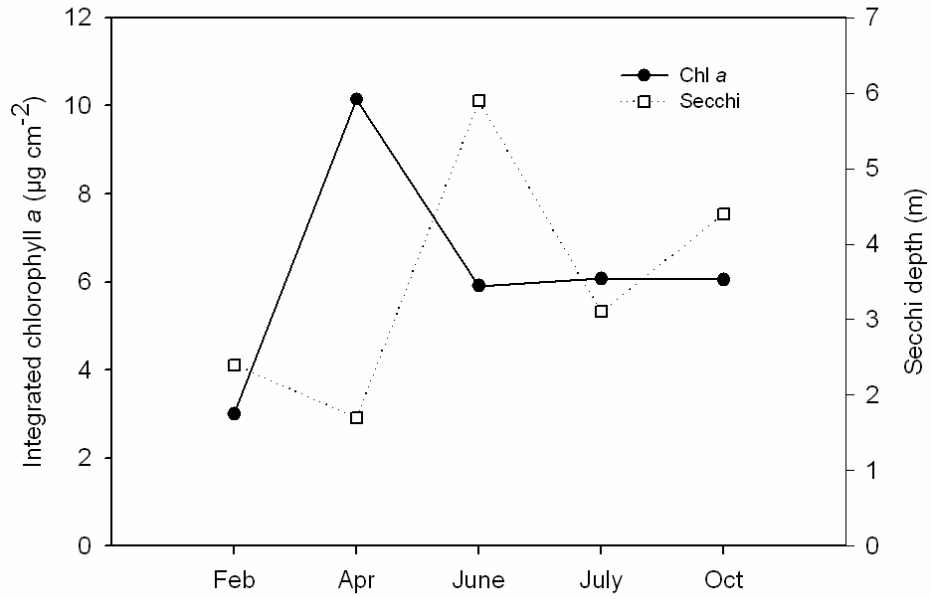
Ammonium concentrations fluctuated between  $0.044 \mu\text{M}$  and  $6.43 \mu\text{M}$ , whereas nitrates ranged from  $46.77 \mu\text{M}$  to  $97.09 \mu\text{M}$  (Fig. 3a and 3b). Maximum concentration of orthophosphate and total phosphorus was  $0.28 \mu\text{M}$  on February 23 and  $1.61 \mu\text{M}$  on February 22, respectively (Fig. 3c and 3d). Nutrient concentrations revealed distinct vertical gradients from early stratification to the end of summer. Concentrations of nitrates did not vary drastically between surface and bottom during the study period, whereas orthophosphate and total phosphorus concentrations were lower in the epilimnion from April. In contrast, ammonium concentrations were higher in the upper layer from April to the end of summer.

Chlorophyll *a* was maximum on April 27 ( $15.753 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Fig. 3e). A subsequent decrease was observed until the end of May, and a gradual increase followed during summer, with a second peak observed on July 27 ( $7.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The lowest value for water transparency was observed on April 27 (1.7 m) whereas the clear water phase appeared at the beginning of June with a maximum transparency of 5.9 m (Fig. 4). During the study period, transparency showed an opposite trend to chlorophyll *a* with minimum when chlorophyll *a* was maximum (Fig. 4).

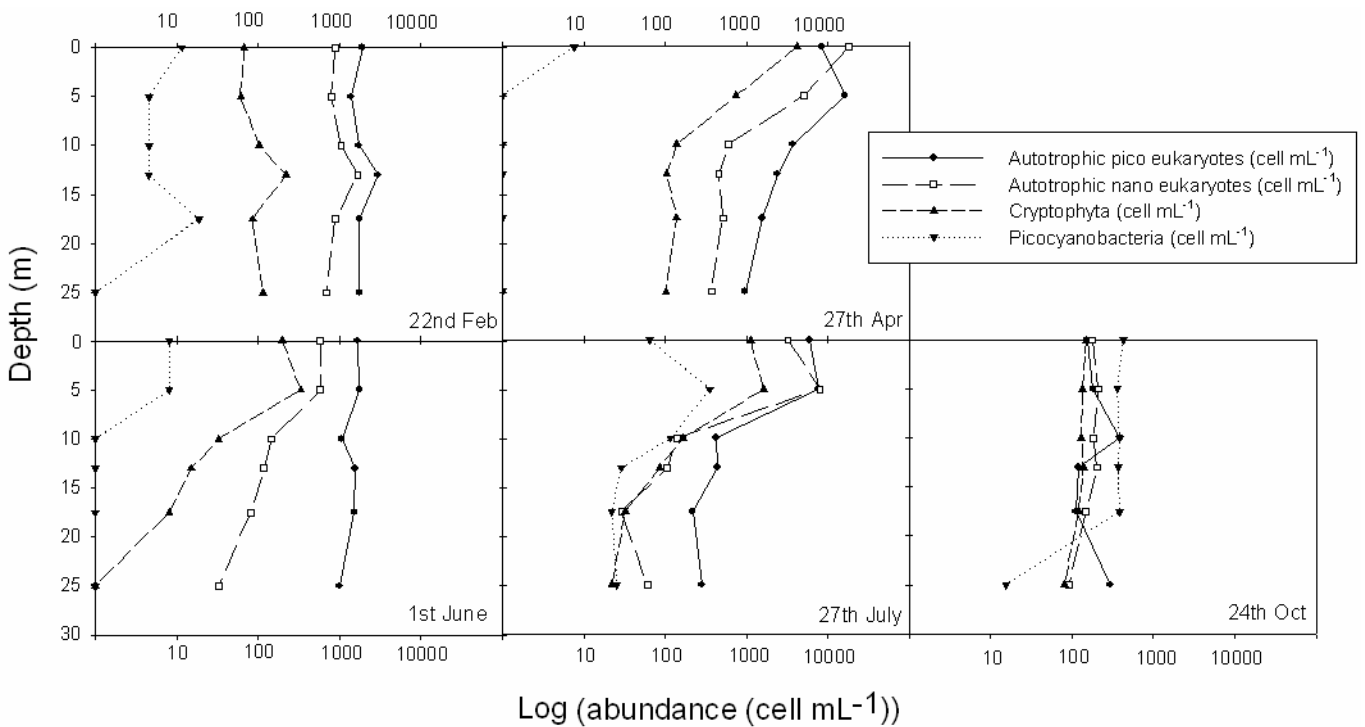
For the rest of the paper, we focus on 5 sampling dates characterizing the different patterns of physical and chemical factors occurred during the study period: (1) 22<sup>nd</sup> February with homogenous vertical distribution for all physical and chemical factors, (2) 27<sup>th</sup> April with stratification and chlorophyll *a* maximum, (3) 1<sup>st</sup> June when the clear water phase occurred, (4) 27<sup>th</sup> July with a second peak of chlorophyll *a* and a stronger stratification than in spring, (5) 24<sup>th</sup> October which showed homogenous vertical distribution except for oxygen saturation with an anoxic zone occurring between 20 m and 25 m.

### ***Dynamics of the autotrophic planktonic communities***

Picophytoplanktonic cells were dominated by autotrophic picoeukaryotes from February to July. They were dominated by picocyanobacteria only in October (Fig. 5). Autotrophic picoeukaryote abundance ranged from  $1.12 \cdot 10^2 \text{ cell mL}^{-1}$  on October to  $1.62 \cdot 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  on April. Two peaks of abundance were recorded for picoeukaryotes, one in April (5 m) and another one in July ( $7.6 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$  at 5 m). Picocyanobacteria abundance was very low from February to June with less than  $20 \text{ cell mL}^{-1}$ . In July, a peak of picocyanobacteria



**Fig. 4** Temporal evolution of Secchi disc transparency versus chlorophyll *a* (integrated values in  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) in four dates of 2006.



**Fig. 5** Vertical distribution of concentrations (logarithm) of autotrophic pico eukaryotes ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) ( $\bullet$ ), autotrophic nano eukaryotes ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) ( $\square$ ), Cryptophyta ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) ( $\blacktriangle$ ), and picocyanobacteria ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) ( $\blacktriangledown$ ) on February 22, April 27, June 1, July 27 and October 24.

(350 cell mL<sup>-1</sup>) was observed at 5 m while in October, its concentration remained constant from the surface to 20 m with values around 400 cell mL<sup>-1</sup>, and then decreased to less than 20 cell mL<sup>-1</sup> at 25 m. Picocyanobacteria cytogram (orange vs red fluorescence) seemed to be similar to the one of *Synechococcus* cells from marine environments. However, microscopy observations on DAPI staining filters showed the occurrence in the most of samples of orange fluorescing picocyanobacteria with slightly rod shape and diameter between 0.5 µm and 1.5 µm with division in one plane (Fig. 1b on top), suggesting that the picocyanobacteria belonged to the genus *Cyanobium* as previously shown by Willame *et al.* (2006). In June samples, picocyanobacteria of larger size (Fig. 1b on the bottom) which could belong to the *Synechococcus* group (Komárek, 1996), were observed, suggesting that two picocyanobacteria populations could occur during the study period.

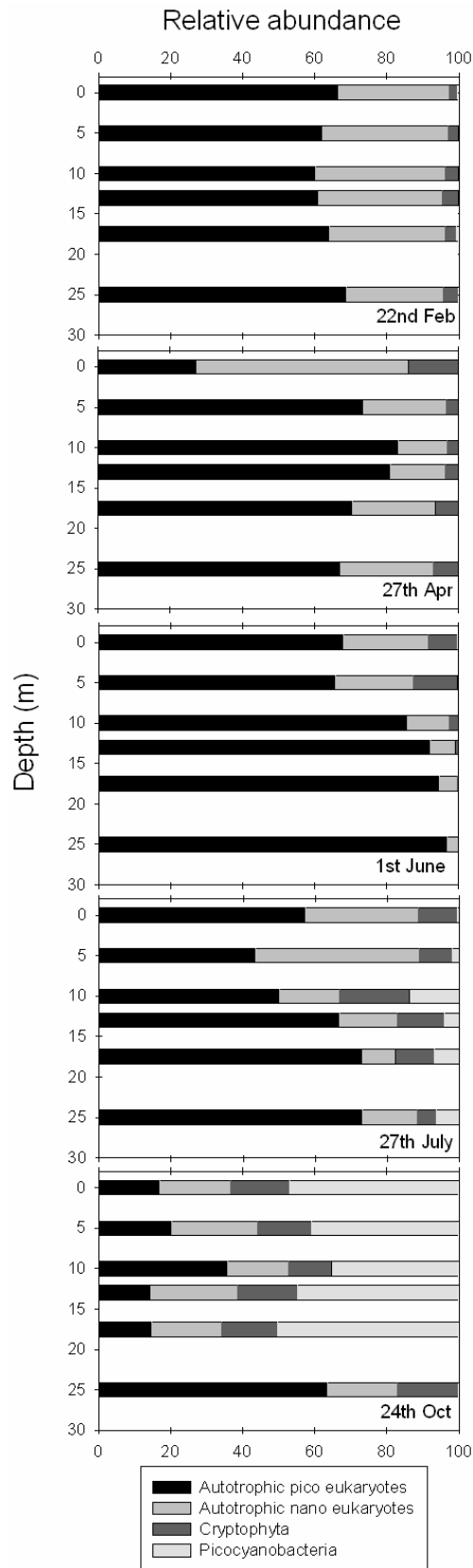
Autotrophic nanoeukaryotes abundance ranged from 28 cell mL<sup>-1</sup> in July to 1.82 10<sup>4</sup> cell mL<sup>-1</sup> in April. Two peaks of abundance were also recorded, one in April (surface) and another one in July (7.9 10<sup>3</sup> cell mL<sup>-1</sup> at 5 m). Among autotrophic nanoeukaryotes, we observed diatoms as *Cyclotella* which seemed to be more abundant in spring, *Schroederia*-like cells and *Chlorella*-like cells which seemed to be more abundant in June and July, respectively (Fig. 1a and 1c) and haptophyte-like cells which seemed to be more abundant also in July (Fig. 1d)

Cryptophyta abundance showed two peaks in April (4.2 10<sup>3</sup> cell mL<sup>-1</sup> in the surface) and July (1.6 10<sup>3</sup> cell mL<sup>-1</sup> at 5m). Lowest concentrations were recorded in June during the clear water phase.

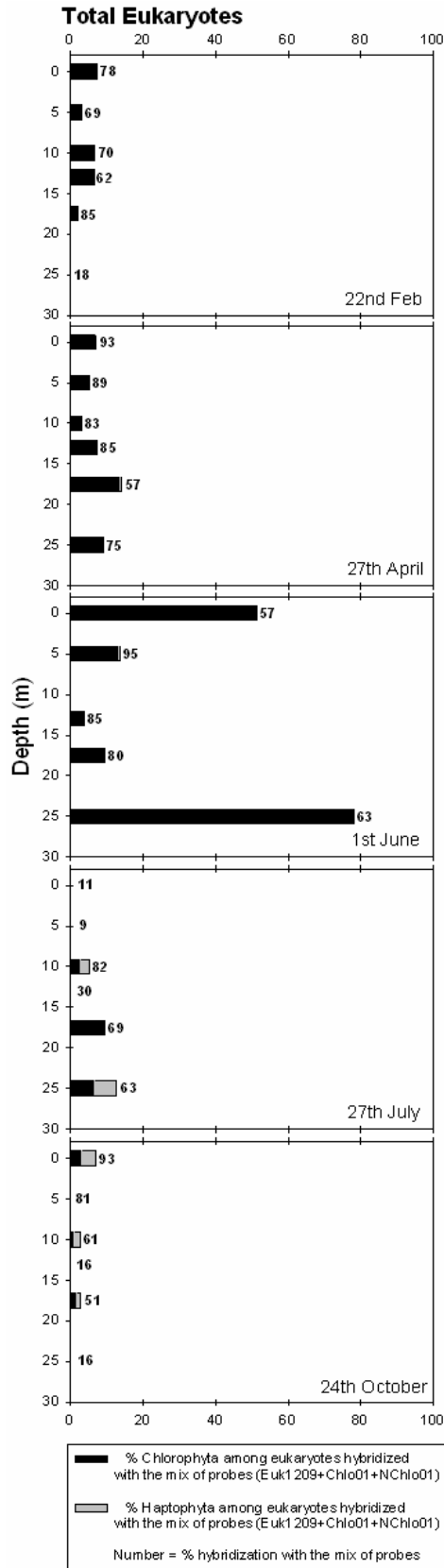
The relative abundance of different groups investigated by flow cytometry showed that picoeukaryotes accounted for more than 60 % of the population from February to June throughout the water column, except in April, in surface where nanoeukaryotes dominated with 60 % of relative abundance (Fig. 6). In July, contribution of picoeukaryotes decreased in the 10 m-layer benefiting nanoeukaryotes and cryptophytes but reached more than 60 % at the lake bottom. Picocyanobacteria accounted for less than 1 % from February to June. Their relative contribution was higher in July with 13.75 % at 10 m depth and reached 50 % in October. In anoxic zone below 20 m in October, picocyanobacteria contribution fell to 3 % and picoeukaryotes dominated again the population (Fig. 2b and 6). Cryptophyte contribution was lower in February (from 2 % to 4.5 %) and began to increase in April and June with 14 % in surface and 13 % at 5 m, respectively.







**Fig. 6** Vertical distribution of relative abundance of autotrophic pico eukaryotes (black), autotrophic nano eukaryotes (light grey), Cryptophyta (grey), and picocyanobacteria (very light grey) on February 22, April 27, June 1, July 27 and October 24.



**Fig. 7** Vertical distribution of contributions (%) of Chlorophyta (black) and Haptophyta (grey) among total eukaryotes hybridized with the mix of probes (Euk1209+Chlo01+NChlo01) on February 22, April 27, June 1, July 27 and October 24. Each number corresponds to the percentage of hybridization obtained with the mix of probes (Euk1209+Chlo01+NChlo01). Chlorophyta and Haptophyta contributions were shown only for samples which present at least 50 % of hybridization with the mix of probes.

In July its contribution increased from the surface to 10 m (from 10 % to 20 %) and then decreased progressively to the bottom (from 13 % to 15 %). In October, cryptophytes accounted for 15 % of all autotrophic populations throughout the water column.

### ***Composition of the small eukaryote community***

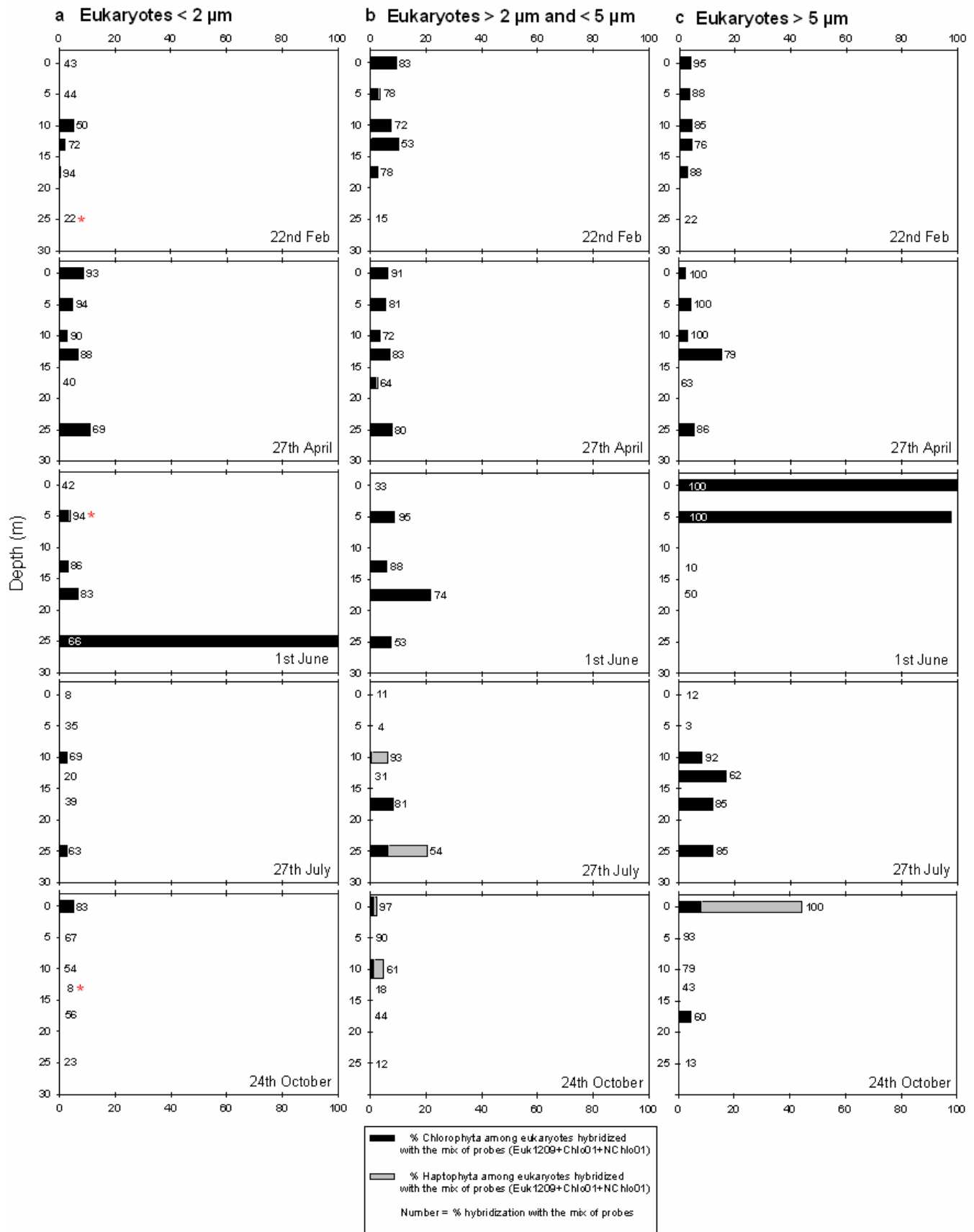
#### *TSA-FISH analyses*

TSA-FISH realized with the mix of 18S rRNA probes (Euk1209+Chlo01+NChlo01) yielded percentage of hybridization (ratio between eukaryotes hybridized with the mix of 18S rRNA probes and eukaryotes stained with DAPI counted under UV light) ranging from 9 % (in July) to 95 % (in June) with an average value of 63 %. For the rest of the paper, we took into account contribution of Chlorophyta and Haptophyta for samples which present a percentage of hybridization of 50 % in minimum. On average, 10.8 % and 0.7 % of total eukaryotes were hybridized with Chlorophyta and Haptophyta probes, respectively. The maximum value was observed in June for the Chlorophyta (78 %), and in July (6 %) for the Haptophyta (Fig. 7).

For eukaryotes smaller than 2  $\mu\text{m}$ , the percentage of hybridization varied from 8 % (in July and October) to 94 % (in February, April and June) with an average value of 58 % (Fig. 8a). On average, 9.1 % of picoeukaryote cells belonged to Chlorophyta, and 0.03 % belonged to Haptophyta. Maximum contribution was observed in June for both groups with 100 % for chlorophytes, and 0.67 % for haptophytes. Pico haptophytes were observed in June but also in February and October (samples with less than 50 % of hybridization with the mix of probes).

For eukaryotes between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$ , the percentage of hybridization ranged from 4 % (In July) to 97 % (in October) with an average value of 62 % (Fig. 8b). On average, chlorophytes and haptophytes accounted for 6 % and 1.16 % of hybridized eukaryotes, respectively. Maximum contribution was observed in June for chlorophytes (21.6 %) and in July for haptophytes (13.8 %).

Eukaryotes larger than 5  $\mu\text{m}$  showed hybridizations from 3 % (in July) to 100 % (in April, June and October) with an average value of 68 % (Fig. 8c). On average, chlorophytes and haptophytes contributed for 14 % and 1.5 % of eukaryotes larger than 5  $\mu\text{m}$ , respectively. Maximum contribution was observed in June for chlorophytes (100 %) and in October for haptophytes (36 %).

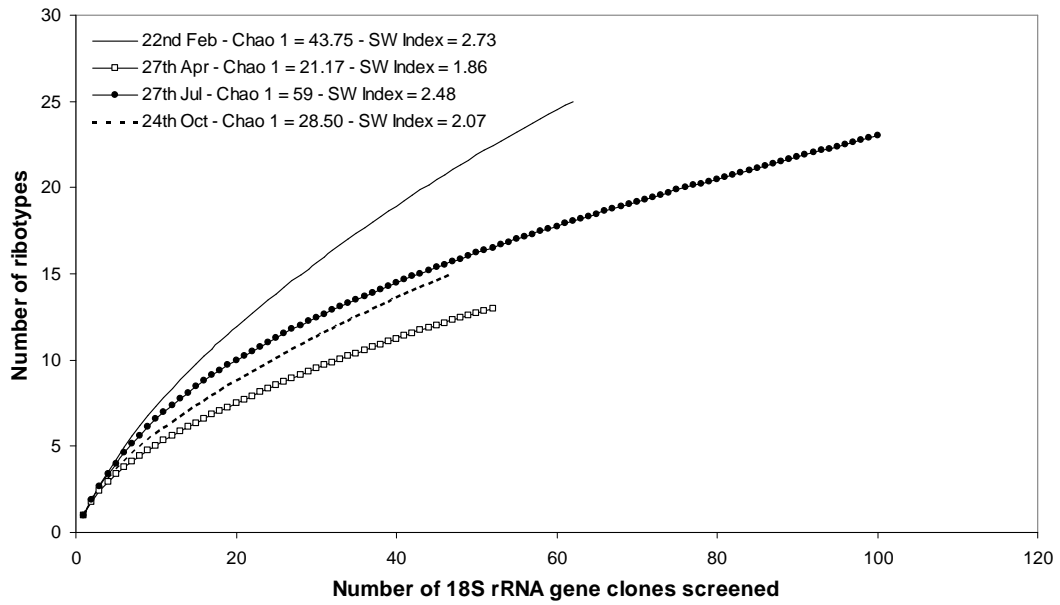


**Fig. 8** Vertical distribution of contributions of Chlorophyta (black) and Haptophyta (grey) among eukaryotes smaller than 2  $\mu\text{m}$  (a), eukaryotes between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$  (b), eukaryotes larger than 5  $\mu\text{m}$  (c) hybridized with the mix of probes (Euk1209+Chlo01+NChlo01). The symbol \* corresponds to samples where pico haptophytes were detected. Legend as in Fig. 7.

The larger differences observed between total eukaryotes counted and eukaryotes hybridized with the mix of probes in some samples could be due to (1) the presence of a larger part of cells refractory to the permeabilization, and to (2) a low quantity of ribosomal RNA for some cells. Tests realized on different cultures from the Roscoff Culture collection (RCC) did not show any hybridization on Trebouxiophyceae cells despite several procedures of permeabilization tested (Pernthaler, Pernthaler & Amann, 2004) (data not shown). The wall of some Trebouxiophyceae like *Chlorella* is composed of layered microfibrils of amino sugar (glucosamine) (Nemcova & Kalina, 2000). This resistant wall could therefore stop the penetration of probes inside the cell. Trebouxiophyceae are encountered in most lakes (Fawley, Fawley & Buchheim, 2004; Hepperle & Schlegel, 2002). The presence of Trebouxiophyceae cells could explain in part, the low efficiency of hybridization obtained for some samples. For July samples, microscopy observations showed a higher abundance of *Chlorella*-like cells in the 5 m-layer while cloning approach showed only one sequence of Trebouxiophyceae in February. However, less than 15 % of hybridization with the mix of probes (Euk1209+Chlo01+NChlo01) was obtained for July samples in surface and at 5 m depth. That suggests that *Chlorella*-like cells observed by microscopy could be real Trebouxiophyceae cells also refractory to the extraction step for cloning approach. Lower hybridization efficiency for some samples could also be due to a lower quantity of ribosomal RNA inside of cells, leading to a weaker and not visible fluorescence. That could be the case in October in the anoxic zone, for example.

#### *18S rRNA libraries*

Rarefaction curves provide an estimate of phylotype diversity relative to sampling effort. The highest diversity was observed on February. It decreased from July to April (Fig. 9). The groups present in all clone libraries were Cryptophyta, Ciliophora, and Chlorophyta (Table 3). Ciliophora represented from 8 % (in July) to 46.8 % (in February) of clones. Cryptophyta represented 6.5 % of clones in February and reached 65.4 % in April. Chlorophyta reached 12 % of clones in July but represented less than 10 % of clones at the other dates. Chrysophyceae sequences were recorded in February (19.35 %) and in April (3.8 %). Fungi, Cercozoa and Metazoa represented 16 %, 13 % and 27 % of clones in July, respectively. Sequences of Cercozoa have been found only in July while Fungi and Metazoa sequences were also found in February (6.45 %) and in April (1.9 %), respectively.



**Fig. 9** Rarefaction curves determined for the different 18S rRNA clone libraries. The number of ribotypes (defined as sequences that are grouped together because they are above the user-specified threshold for similarity), Chao1 factors and SW index were determined using the FastGroupII software.



**Table 3** Number of clones belonging to each OTU in genetic libraries and phylogenetic affiliations of the representative clones sequenced.

Division	Class	OTU	Closest relative	Similarity (%)	No. Of clones in library			
					22 February	27 April	27 July	24 October
<b>Chlorophyta</b>	Chlorophyceae	220206.042	<i>Chlamydomonas noctigama</i>	98	2			
		270406.032	<i>Chlamydomonas noctigama</i>	96		1		
		270706.096	<i>Ankyra lanceolata</i>	99			10	
		270706.092	<i>Neochlorosarcina pseudominor</i>	92			1	
		270706.026	<i>Chlamydomonas rienhardtii</i>	93			1	
		241006.007	<i>Chlamydomonas rienhardtii</i>	91				1
		220206.032	<i>Crustomastix</i> sp.	94	1			
<b>Cryptophyta</b>	Trebouxiophyceae	220206.010	<i>Choricystis</i> sp.	99	2			
		220206.047	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	98	1			
<b>Cryptophyta</b>	Cryptophyceae	220206.018	<i>Cryptomonas curvata</i>	98	1			
		220206.005	<i>Chroomonas</i> sp.	88	2			
		270406.046	uncultured cryptophyte clone PFF1AU2004	98		1		
		270406.007	uncultured cryptophyte clone 05M82r.07	97		1		
		270406.013	<i>Cryptomonas paramecium</i>	99		1		
		270406.029	<i>Cryptomonas</i> sp.	99		18		
		270406.048	<i>Geminigera cryophila</i>	98		16		
		270706.023	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	96			1	
		270706.067	<i>Cryptomonas</i> sp.	99			13	
		270706.101	<i>Geminigera</i> sp.	99			1	
		241006.003	<i>Geminigera</i> sp.	99				5
		241006.004	<i>Plagioselmis</i> sp.	95				1
		241006.040	<i>Cryptomonas curvata</i>	99				17
		241006.028	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	94				2
		<b>Stramenopiles</b>	Bacillariophyta	220206.051	<i>Encyonema caespitosum</i>	99	1	
Chrysophyceae	220206.020		<i>Spumella</i> sp.	99	11			
	270406.049		<i>Ochromonas tuberculata</i>	96		2		
	220206.052		<i>Mallomonas</i> sp.	96	1			
<b>Alveolata</b>	Dictyochophyceae	241006.039	uncultured eukaryote clone CD8.07	96			1	
	Dinophyceae	220206.046	<i>Woloszynskia pascheri</i>	99	1			
		241006.016	uncultured alveolate clone PAB12AU2004	98			1	
		270706.061	<i>Gymnodinium beii</i>	95			4	
		270706.070	<i>Pentapharsodinium tyrrhenicum</i>	95			1	
<b>Haptophyta</b>	Prymnesiophyceae	220206.003	<i>Chrysochromulina parva</i>	99	1			
		220206.050	<i>Isochrysis</i> sp.	93	1			
		270406.050	<i>Chrysochromulina parva</i>	99		1		
		270706.022	<i>Chrysochromulina parva</i>	99			2	



**Table 3 (continuation)** Number of clones belonging to each OTU in genetic libraries and phylogenetic affiliations of the representative clones sequenced.

Division	Class	OTU	Closest relative	Similarity (%)	No. Of clones in library			
					22 February	27 April	27 July	24 October
<b>Fungi</b>		220206.054	uncultured eukaryote clone BSR1LE07	95	1			
		270706.019	<i>Cryptococcus aquaticus</i>	83			1	
		270706.083	uncultured fungus	85			3	
		270706.024	<i>Hyaloraphidium curvatum</i>	88			1	
		270706.089	Uncultured fungus	90			5	
		Chytridiomycota	220206.038	uncultured fungus	93	2		
			220206.048	<i>Chytridium</i> sp.	88	1		
			270706.017	uncultured fungus	91			4
			270706.032	<i>Rozella allomyces</i>	95			2
<b>Stamenopiles</b>	Oomycetes	270706.057	<i>Lagenidium gigantum</i>	98			1	
<b>Katablepharidophyta</b>	Katablepharidaceae	220206.043	uncultured katablepharid clone CH1_5A_4	98	1			
		270406.038	uncultured katablepharid clone CH1_5A_4	99		1		
		241006.012	uncultured eukaryotic picoplankton clone P34.10	99			1	
<b>Metazoa</b>	Arthropoda	270406.002	<i>Eudiatomus gracilis</i>	99		1		
		270706.054	<i>Eudiatomus gracilis</i>	99			27	
<b>Choanoflagellida</b>	Choanoflagellida	220206.015	<i>Sphaeroeca volvox</i>	96	1			
<b>Alveolata</b>	Apicomplexa	270706.033	<i>Colpodella edax</i>	98			1	
		Ciliophora	220206.011	<i>Askenasia</i> sp.	92	1		
		220206.062	<i>Rimostrombidium lacustris</i>	98	1			
		220206.022	uncultured alveolate clone PAA9AU2004	96	1			
		220206.017	uncultured eukaryote clone LG17-12	98	2			
		220206.014	uncultured alveolate clone PAC12AU2004	98	7			
		220206.040	<i>Rimostrombidium lacustris</i>	98	12			
		220206.008	uncultured eukaryote clone LG01-11	98	5			
		270406.035	uncultured alveolate clone PAB8AU2004	98		2		
		270406.010	<i>Strombidium caudatum</i>	94		2		
		270406.034	<i>Askenasia</i> sp.	99		5		
		270706.080	<i>Askenasia</i> sp.	99			1	
		270706.072	<i>Halteria grandinella</i>	98			5	
		270706.082	<i>Strombidium</i> sp.	97			1	
		270706.039	uncultured alveolate clone PAB10AU2004	98			1	
		241006.014	<i>Dileptus</i> sp.	98				10
		241006.024	<i>Rimostrombidium</i> sp.	96				2
		241006.010	<i>Gonostomum namibiense</i>	93				1
		241006.020	<i>Strombidium</i> sp.	98				1
		241006.002	<i>Varistrombidium</i> sp.	99				1
		241006.001	<i>Halteria grandinella</i>	96				1
		241006.037	uncultured alveolate clone PAA9AU2004	98				2
		Perkinsea	220206.024	uncultured alveolate clone PAB5AU2004	99	2		
	<b>Cercozoa</b>		270706.028	uncultured cercozoan clone PCA3SP2005	91			13



Haptophyta, Dinophyceae, Bacillariophyta, Dictyochophyceae, Oomycetes, Apicomplexa, Perkinsea, Choanoflagellida and Katablepharidaceae represented less than 5 % of clones when they were recorded. Some of them were found only in one library like Bacillariophyta (February), Dictyochophyceae (October), Oomycetes (July), Apicomplexa (July), Perkinsea (February), and Choanoflagellida (February). Haptophyta, Dinophyceae and Katablepharidaceae sequences were found in three libraries.

We classified clones in three categories: pigmented (autotrophic or mixotrophic), colourless (heterotrophic), and undeterminate based on their closest relative (Table 4). In February and July, less than 50 % of clones were affiliated to pigmented lineages (22.6 % and 34 %, respectively) while in October and April, 57.4 % and 73 % of clones were considered to be pigmented, respectively.

## Discussion

### *Dynamics of the autotrophic planktonic communities*

While in most eutrophic lakes investigated to date, picocyanobacteria generally dominated the picoplanktonic community (Hepperle & Krienitz, 2001; Malinsky-Rushansky, Berman & Dubinsky, 1997), in Esch-sur-Sûre Lake, we observed a dominance of picoeukaryotes, except in autumn. Burns & Stockner (1991) already showed the same trend for one eutrophic and one mesotrophic lakes in New Zealand. Generally, picoeukaryotes tend to show a single population peak in spring or early summer (Fahnenstiel *et al.*, 1991; Stockner, 1991). In the present study, the dynamics of eukaryotic picoplankton showed two peaks of abundance, one in spring and a lower one in summer.

In the same way, picocyanobacteria show generally two peaks of abundance in temperate lakes, one in spring and another one in late summer (Weisse, 1993). However, some studies in 7 Danish lakes and several Canadian lakes showed only one peak of abundance in summer or autumn (Pick & Agbeti, 1991; Søndergaard, 1991). In our case, a higher abundance was observed in autumn but concentrations remained very low (maximum 400 cell mL<sup>-1</sup>). Counts by cytometry realized on samples from May also showed very low concentrations (less than 30 cell mL<sup>-1</sup>) (data not shown). Very few colonies of picocyanobacteria were observed by microscopy (data not shown). Colonial picocyanobacteria tend to be more abundant in meso-eutrophic lakes, in particular in summer (Stockner *et al.*, 2000).

**Table 4** Diversity of pigmented and colourless small eukaryotes in clone libraries from Esch-sur-Sûre Lake.

Division	No. Of OTUs (clones) in library			
	22 February	27 April	27 July	24 October
<b>Overall total</b>	<b>25 (62)</b>	<b>13 (52)</b>	<b>23 (100)</b>	<b>15 (47)</b>
<b>Pigmented</b>				
Alveolata	1 (1)		2 (5)	
Chlorophyta	3 (5)	1 (1)	3 (12)	1 (1)
Cryptophyta	3 (4)	2 (34)	3 (15)	4 (25)
Haptophyta	2 (2)	1 (1)	1 (2)	
Stramenopiles	2 (2)	1 (2)		1 (1)
<b>Total</b>	<b>11 (14)</b>	<b>5 (38)</b>	<b>9 (34)</b>	<b>6 (27)</b>
<b>Colourless</b>				
Alveolata	8 (31)	3 (9)	5 (9)	7 (18)
Cercozoa			1 (13)	
Choanoflagellida	1 (1)			
Cryptophyta		1 (1)		
Fungi	3 (4)		6 (16)	
Katablepharidophyta	1 (1)	1 (1)		1 (1)
Metazoa		1 (1)	1 (27)	
Stramenopiles	1 (11)		1 (1)	
<b>Total</b>	<b>14 (48)</b>	<b>6 (12)</b>	<b>14 (66)</b>	<b>8 (19)</b>
<b>Undeterminate</b>				
Alveolata				1 (1)
Cryptophyta		2 (2)		
<b>Total</b>		<b>2 (2)</b>		<b>1 (1)</b>

However, most colonial picocyanobacteria being embedded in diffuse mucilage with size generally larger than 20  $\mu\text{m}$ , the lack of colonial picocyanobacteria could be due to the prefiltration on 10  $\mu\text{m}$  filter realized on our microscopy samples.

In the present study, picoeukaryotes and picocyanobacteria showed opposite pattern than those generally observed in temperate lakes. Different factors influence the distribution of picoplankton: (1) pH, (2) light, (3) temperature, (4) nutrients, (5) grazing. Picocyanobacteria are not common in lakes with a pH < 6, where their replacement by picoeukaryotes occurs generally (Søndergaard, 1991; Stockner & Shortreed, 1991). The pH of Esch-sur-Sûre Lake was always neutral or alkaline during the study period. Therefore, the pH can not explain the distribution patterns observed for picoplankton. Picoeukaryotes increased with temperature, their highest abundance occurring in the epilimnion. Vertical distribution of orthophosphate and picocyanobacteria concentrations showed opposite patterns. The highest abundance of picocyanobacteria occurred when the lowest concentration of orthophosphate was observed, confirming the preferential growth of picocyanobacteria in environments with higher N:P ratios (Stockner *et al.*, 2000). However, grazing could also play an important role in the distribution of picoplankton. Jacquet *et al.* (2005) showed the occurrence of three main periods of ciliate development in Esch-sur-Sûre Lake during the year 1999: in April, in May, and in July. The ciliate community was characterised by the predominance of small cells (< 20  $\mu\text{m}$  and between 20  $\mu\text{m}$  and 35  $\mu\text{m}$ ) which can be important picoplanktivores in lakes (Callieri, 2001; Simek *et al.*, 1995). That suggests that the dynamics of picoplankton could not be explained by one factor in particular but by a mix of all these factors.

Autotrophic nanoeukaryotes and cryptophytes showed two peaks of abundance like picoeukaryotes. Their vertical distribution did not show clear correlation with abiotic factors. Relative abundance showed that nanoeukaryotes dominated the algal population in the surface in April, producing the maximum of chlorophyll *a* observed during the study period.

### ***Composition of the small eukaryote community***

The highest 18S sequence richness was recorded in February (Fig. 9). This agrees with the SW index but not with the Chao1 factor which was higher for July library. The SW index combines estimates of richness (the total number of ribotypes) and evenness (the relative abundance of each ribotype) (Yu *et al.*, 2006). Therefore, it is usually used as an overall indicator of the level of diversity in a sample. The Chao1 factor is based on the number of rare ribotypes (singletons and doublets) within a sample (Yu *et al.*, 2006).

In July library, the ratio singletons/doublets being higher (12/2) than in February (15/6), that explains the higher value of Chao1 factor (59) obtained for July while the number of ribotypes was slightly higher in February (25 ribotypes in February vs 23 ribotypes in July).

Dodson *et al.* (2000) showed that the highest biodiversity tended to occur in lakes with relatively low productivity. In the Esch-sur-Sûre Lake, the highest richness occurred in winter while periods known to be more productive as spring and summer showed lower richness. April library showed the lowest richness, corresponding to the spring phytoplankton bloom in Esch-sur-Sûre Lake characterized by the dominance of Cryptophyta and diatoms and considered as the most productive period (Dohet & Hoffmann, 1995).

Among pigmented eukaryotes, some taxa were encountered in all clone libraries: Chlorophyta and cryptophytes. Chlorophyta sequences dominated the pigmented organisms only in February (35.7 %). The cloning and the FISH methods showed that Chlorophytes were always present during the study period (Fig. 7 and Table 4). TSA-FISH results showed very low chlorophyte contributions whatever the depth considered, except in June in the surface and at 25 m depth where 51 % and 78 % of chlorophytes were observed, respectively (Fig. 7). In June, picochlorophytes dominated at 25 m depth. Ammonium concentration being less than 0.5  $\mu\text{M}$  at this depth, picoplanktonic cells could be more advantaged to growth at this depth because of their surface/volume ratio in comparison with larger chlorophytes which were found in the upper layer and principally represented by *Schroederia*-like cells (Fig 8). The low proportion of Chlorophyta encountered in most samples is in agreement with results obtained by our molecular approach and with previous studies in lacustrine systems (Lefranc *et al.*, 2005; Lepère, Domaizon & Debroas, 2008). Except in April, TSA-FISH results at the DCM for the fraction smaller than 2  $\mu\text{m}$  showed that chlorophyte contributions were underestimated by cloning approach. Previous studies already suggested an underestimation of plastidic forms in samples by using molecular method based on PCR with 18S primers of eukaryotes (Lepère *et al.*, 2008; Savin *et al.*, 2004). Their lower contribution could be explained by significant differences in 18S rRNA gene copy number occurring in microalgae, ranging from 1 copy in *Nannochloropsis* to over 1000 copies in some nanoplanktonic dinoflagellates (Zhu *et al.*, 2005).

The presence of *Schroederia*-like cells was observed in our samples with higher abundance in summer. Although one *Schroederia* sequence is available in Genbank, July library showed 10 sequences of Chlorophyta affiliated to *Ankyra lanceolata* with higher similarity (99 %) than with the *Schroederia setigera* sequence (89 %). It could be due to a wrong affiliation of sequences from Genbank or to a wrong identification by microscopy. *Ankyra* and *Schroederia* are closely related and characterized by asexual reproduction by zoospore emission. The shape of these organisms is very similar. However, *Ankyra* cells are characterized by a curved bifid extension which can be not detected on some species (John, Whitton & Brook, 2002). Therefore, the affiliation of sequences to *Ankyra lanceolata* could suggest that *Schroederia*-like cells observed by microscopy could be *Ankyra* cells. Although it is well known that the prefiltration process allows the passage of cells larger than nominal pore sizes (Díez *et al.*, 2001; Malinsky-Rushansky *et al.*, 1997), the presence of sequences of this organism which can make between 35 µm and 150 µm long in clone sample obtained after prefiltration on 3 µm could be due to the presence of zoospores.

Cryptophyte sequences dominated from April to October (from 44.1 % to 92.6 %). The presence of cryptophytes in the small planktonic fraction and its dominance of the pigmented organisms agree with previous studies from lacustrine systems (Lefranc *et al.*, 2005; Lepère *et al.*, 2008). Cytometry results showed cryptophyte contributions to eukaryote population ranging from less than 1 % in June to 31.4 % in October. Only contributions found in October are in agreement with contributions estimated in other lacustrine systems by microscopy (Lepère *et al.*, 2008; Samuelsson & Andersson, 2003). Our cloning analysis showed that pigmented Cryptophyta represented 6.45 % of sequences in February, 65.4 % of sequences in April, 15 % of sequences in July and 53.2 % in October, suggesting a higher contribution of pigmented Cryptophyta in April and October than previously shown by cytometry.

Other pigmented taxa (Haptophyta and Bacillariophyceae) contributed to less than 5 % of the clone libraries. One sequence was affiliated to the nanoplanktonic diatom *Encyonema caespitosum*. TSA-FISH method showed the presence of haptophytes at each sampling date but they occurred in low proportion (Fig. 8). This is in agreement with results obtained by our molecular approach and with previous studies in lacustrine systems (Lefranc *et al.*, 2005; Lepère *et al.*, 2008).

Some haptophytes were observed in February, June and October in the smaller than 2  $\mu\text{m}$  fraction (Fig. 8a), but most of time they were found in the size fraction between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$  (Fig. 8b). Only a dozen of haptophytes species are known from freshwater or terrestrial habitats (John *et al.*, 2002). Their size ranges generally between 2  $\mu\text{m}$  and 10  $\mu\text{m}$  and sometimes reaches 50  $\mu\text{m}$  (*Hymenomonas roseola*). Only one species, *Chrysochromulina parva* which was recorded in three libraries, can present a size smaller than 2  $\mu\text{m}$ . In October, the haptophyte population was dominated by cells larger than 5  $\mu\text{m}$  and that they accounted for 36 % of large eukaryotes in surface (Fig. 8c). Haptophyte blooms have been previously recorded in different lacustrine systems (Hansen, Kristiansen & Rasmussen, 1994; Nicholls, Beaver & Estabrook, 1982). However, the present study suggests that they are always a minor contributor of phytoplankton population in Esch-sur-Sûre Lake. One sequence of Haptophyta affiliated to the marine species *Isochrysis* sp. was recorded in February, but with a low percentage of similarity (93 %), suggesting the possible occurrence of a new species not yet described in freshwater.

Other groups besides cryptophytes contain both pigmented and colourless organisms such as Dinophyceae or Chrysophyceae. Dinophyceae were recorded in February, July and October. The highest contribution of Dinophyceae sequence was recorded in July which is in agreement with a previous study in Esch-sur-Sûre Lake showing the dominance of Dinophyceae in summer (Wille & Hoffmann, 1991). Dinophyceae have previously been found in the small eukaryote fraction in marine and freshwater environments (Lepère, Domaizon & Debroas, 2007; Moon-van der Staay, De Wachter & Vaultot, 2001). The detection of dinophyceae in this planktonic fraction could be the result of filtration problems (Díez *et al.*, 2001; Malinsky-Rushansky *et al.*, 1997). However, one sequence of Dinophyceae was affiliated to an uncultured alveolate clone which could correspond to an unidentified small Dinophyceae (Lefranc *et al.*, 2005; Lepère *et al.*, 2007; Moon-van der Staay *et al.*, 2001).

Chrysophyceae were recorded in February and April and only three OTUs were identified (*Spumella* sp., *Ochromonas tuberculata*, *Mallomonas* sp.). In February, 11 sequences of the typical colourless Chrysophyceae *Spumella* sp. have been recorded. This taxon has been reported to be generally common in freshwater (Boenigk *et al.*, 2005). Although the cloning approach showed that Chrysophyceae were present in Esch-sur-Sûre Lake, they did not dominate the small eukaryote population.



Several studies previously identified this group within small eukaryote communities as recurrent but not dominant (Lepère *et al.*, 2006; Richards *et al.*, 2005; Šlapeta *et al.*, 2005).

Colourless taxa were principally constituted of Ciliophora and potential parasite sequences. Ciliophora sequences were found in all libraries. They dominated the colourless taxa in February (60.4 %), April (75 %) and in particular in October (94.7 %).

The presence of Ciliophora sequences in the four libraries is in agreement with a previous study showing the presence of nano ciliates during all the year in the Esch-sur-Sûre Lake (Jacquet *et al.*, 2005). However, while Jacquet *et al.* (2005) showed that the abundance of ciliates was low in winter and highest in spring, cloning approach showed the opposite pattern with contribution of 46.8 % and 17.3 % of Ciliophora sequences in February and April, respectively. Most of the sequences affiliated to Ciliophora in the present study were previously recorded in Jacquet *et al.* (2005) by microscopy as *Strobilidium* sp., *Askenia* sp., *Halteria grandinella* and *Strombidium* sp.. However, some species as *Rimostrombidium lacustris*, *Dileptus* sp., and *Varistrombidium* sp. were detected only by the cloning approach in the present study. The detection of Ciliophora in the fraction smaller than 2 µm could be due to filtration problems, or could correspond to undetermined small ciliates (Lefranc *et al.*, 2005; Lepère *et al.*, 2008).

As previously shown in other lacustrine systems (Lefranc *et al.*, 2005; Lepère *et al.*, 2006; Lepère *et al.*, 2008), sequences belonging to potential parasite taxa were recorded in the 4 libraries of Esch-sur-Sûre Lake. However, these taxa only accounted for a large fraction of heterotrophic organisms in July, suggesting a regulation by parasitism in summer. In the present study, potential parasite taxa were affiliated in majority to Fungi and Cercozoa while in previous studies in mesotrophic and eutrophic lakes, they were affiliated in majority to Fungi and Perkinsea (Lefranc *et al.*, 2005; Lepère *et al.*, 2008). Fungi were identified in February and July. Chytridiomycota contributed for 45 % of Fungi sequences. Chytrids are characterized by free swimming zoospores (2-5 µm) in their reproductive stage (Kagami & Urabe, 2002). They are known to be parasites in lacustrine systems, in particular, of Chlorophyceae, Chrysophyceae and diatoms (Ibelings *et al.*, 2004). Therefore, as previously suggested by Lefranc *et al.* (2005), Chytrids could participate in regulating planktonic populations by parasitism.

The Cercozoa are a complex group of eukaryotes, constituted of a wide variety of organisms and including some of the most abundant nonphotosynthetic amoebae, flagellates and plasmodiophorid plant pathogens known. Contrary to Lepère *et al.* (2006) who showed the dominance of small eukaryote population of Lake Pavin (oligomesotrophic) by Cercozoa all year-long, they were recorded only in July in Esch-sur-Sûre Lake and contributed for 13 % of the July clone sequences. It is equivalent to the Cercozoa sequences contribution found by Lefranc *et al.* (2005) in the eutrophic Lake Aydat in August 2002 (10 %).

Katablepharidaceae sequences were recorded in three libraries (February, April and October). Katablepharids are predatory heterotrophic flagellates which are significant component of freshwater and coastal food webs (Arndt *et al.*, 2000). Their relationship to other eukaryotic groups remained uncertain, although most authors suggested an affinity with cryptophytes (for a review see Okamoto & Inouye, 2005). A recent study based on available sequences of cultured and environmental Katablepharids showed three distinct lineages (Šlapeta, Lopez-Garcia & Moreira, 2006). The first and second lineages regrouped marine species while the third one comprised only phylotypes from freshwater environments, with no related sequences from morphologically described taxa. The three sequences of Katablepharids detected in the present study were affiliated with the latter.

Perkinsea are composed of parasitic protists affiliated to the alveolates and could play a role in controlling algal populations. Sequences affiliated to Perkinsea were detected only in February and contributed only for 3.2 % of February clone library. A previous study on lacustrine systems differing by their trophic status observed Perkinsea sequences only in the eutrophic system with a higher contribution (59.5 %) than in Esch-sur-Sûre Lake (Lefranc *et al.*, 2005). A recent study in Lake Bourget (mesotrophic) showed contributions of Perkinsea of 2.5 % in May and 30 % in August (Lepère *et al.*, 2008).

One sequence of Oomycetes affiliated to *Lagenidium giganteum*, a parasite of mosquito larva has been found in July. Such sequences have already been detected in lacustrine systems (Richards *et al.*, 2005; Šlapeta *et al.*, 2005). Oomycetes also known as water moulds are a group of filamentous, unicellular Heterokonts, physically resembling fungi. They produce free swimming spores and some of them could be parasites of plant. However, the impact of parasitic Oomycetes on phytoplankton has been found to be much less than that of chytrids (Ibelings *et al.*, 2004).

One sequence of Apicomplexa has been identified in July. It was affiliated to *Colpodella edax* which is a free living phagotrophic biflagellate (Leander *et al.*, 2003). Species of the genus *Colpodella* are bacterivores or predator of other free living protists.

Other colourless taxa sequences not affiliated to potential parasite organisms were recorded in three libraries. Choanflagellida are free living cells characterized by an ovoid or spherical cell body between 3  $\mu\text{m}$  and 10  $\mu\text{m}$  and by a single apical flagellum surrounded by a collar of 30-40 microvilli (King, 2005). They are known to be ubiquitous in aquatic environments. In Lake Pavin, Choanflagellida has been detected from April to September 2002 (Lepère *et al.*, 2006). They were recorded also in May and August 2005 in Lake Bourget (Lepère *et al.*, 2008). In Esch-sur-Sûre Lake, only one Choanoflagellida sequence affiliated to the species *Sphaeroeca volvox* has been detected in February.

Metazoa sequences were found in April and July with an important contribution in July (27 % of sequences from July library). Metazoan clones were highly abundant in libraries previously obtained from freshwater sediment (Šlapeta *et al.*, 2005) but other cloning studies realized on the pico-sized fraction from the water column did not show any Metazoa sequence (Lefranc *et al.*, 2005; Lepère *et al.*, 2006; Lepère *et al.*, 2008), suggesting a filtration problem. All the sequences were affiliated to *Eudiaptomus gracilis* (size > 50  $\mu\text{m}$ ) which is a copepod abundantly and frequently found in Esch-sur-Sûre Lake throughout the year without particular peak of abundance in a given period (Dohet & Hoffmann, 1995). The occurrence of *Eudiaptomus gracilis* sequences in April and July could be due to the presence of eggs in the water column and therefore explain their presence in the pico-sized fraction.

A comparison with the seasonal study on Lake Pavin (Lepère *et al.*, 2006) showed important differences in terms of dominance and dynamics of taxa. In the present study, pigmented taxa dominated in April and October while in Lake Pavin, colourless taxa dominated all year long. However, pigmented taxa were also dominated by cryptophyte sequences, except in February when Chlorophyta dominated. The occurrence of the phytoplanktonic bloom in April could be the explanation of the dominance of pigmented taxa in the April library. In Lake Pavin, Cercozoa was the most abundant group while in the present study, it was recorded only in July. In Esch-sur-Sûre Lake, the heterotrophic organisms were dominated by Ciliophora and Metazoa. However, the highest contribution of Fungi and other potential parasites occurred in both studies in summer, suggesting a correlation with a higher occurrence of potential hosts at this period. That could be the case for example, for Chytrids which showed their highest contribution in July when the highest contribution of Chlorophyta and Chrysophyceae occurred in Esch-sur-Sûre Lake and in Lake Pavin, respectively.

The dynamics of taxa seemed to vary in a more important way in Esch-sur-Sûre Lake between investigated seasons, in particular in terms of dominance of pigmented and colourless taxa. This dynamics is probably influenced by physical parameters of light, temperature and wind which control biota via nutrient and primary production. However, other factors as availability of inorganic resources and prey (bottom-up effects) as well as zooplankton predation and fish predation play certainly an important role on the dynamics of small eukaryote communities. Therefore, further investigations should be made on all these different factors to evaluate their specific role on the seasonal dynamics of the small eukaryote communities.

### Acknowledgments

We wish to thank N. Bonjean, D. Collard and J. Mathus from EVA team of the CRP Gabriel Lippmann in Luxembourg for helping during sampling. We are grateful to F. Barnich for chemical analyses and M. Perennou and S. Romac for help with sequencing. S. Masquelier was supported by a doctoral fellowship (BFR05/027) from the Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of Luxembourg.

### References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, **25**, 3389-3402.
- Amann, R. (1995) *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbiology Ecology*, **3**, 1-15.
- Arar, E. (1997) Method 446.0 *In vitro* Determination of Chlorophylls *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> + *c*<sub>2</sub> and pheopigments in Marine and Freshwater Algae by Visible Spectrophotometry. *U.S. Environmental Protection Agency, Ohio USA*.
- Arndt, H., Dietrich, D., Auer, B., Cleven, E.-J., Grafenhan, T., Weitere, M. & Mylnikov, A.P. (2000) Functional Diversity of Heterotrophic Flagellates in Aquatic Ecosystems. In: *The Flagellates: Unity, Diversity and Evolution*. (Eds Leadbeater Bsc & J.C. Green), pp. 240-268. Taylor & Francis, London.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. & Thingstad, F. (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Marine Ecology - Progress Series*, **10**, 257-263.
- Boenigk, J., Pfandl, K., Stadler, P. & Chatzinotas, A. (2005) High diversity of the 'Spumella-like' flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environmental Microbiology*, **7**, 685-697.
- Burns, C.W. & Stockner, J.G. (1991) Picoplankton in six New Zealand lakes : abundance in relation to season and trophic state. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, **76**, 523-536.

- Callieri, C. (2001) Carbon flux from picocyanobacteria to ciliates in a subalpine lake. *International Association of Theoretical and Applied Limnology*, **27**, 2840-2844.
- Caron, D.A., Peele, E.R., Lim, E.L. & Dennett, M.R. (1999) Picoplankton and nanoplankton and their trophic coupling in surface waters of the Sargasso Sea south of Bermuda. *Limnology and Oceanography*, **44**, 259-272.
- Chao, A. (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistic*, **11**, 783-791.
- Chao, A. (1987) Estimating the population size for capture-recapture data and unequal catchability. *Biometrics*, **43**, 783-791.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T.L. & Massana, R. (2001) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2942-2951.
- Diez, B., Pedros-Alio, C. & Massana, R. (2001) Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2932-2941.
- Dodson, S.I., Arnott, S.E. & Cottingham, K.L. (2000) The relationship in lake communities between primary productivity and species richness. *Ecology*, **81**, 2662-2679.
- Dohet, A. & Hoffmann, L. (1995) Seasonal succession and spatial distribution of the zooplankton community in the reservoir of the Haute-Sûre (Luxembourg). *Belgian Journal of Zoology*, **125**, 109-123.
- Fahnenstiel, G.L., Garrick, H.J., Rogers, C.E. & Sicko-Goad, L. (1991) Red fluorescing phototrophic picoplankton in the Laurentian Great Lakes: what are they and what are they doing? *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, **76**, 603-616.
- Fawley, M.W., Fawley, K.P. & Buchheim, M.A. (2004) Molecular diversity among communities of freshwater microchlorophytes. *Microbial Ecology*, **48**, 489-499.
- Giovannoni, S.J., Delong, E.F., Olsen, G.J. & Pace, N.R. (1988) Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells [published erratum appears in *J. Bacteriol.* **170**, 2418 (1988)]. *Journal of Bacteriology*, **170**, 720-726.
- Hansen, L.R., Kristiansen, J. & Rasmussen, J.V. (1994) Potential toxicity of the freshwater *Chrysochromulina* species *C. parva* (Prymnesiophyceae). *Hydrobiologia*, **287**, 157-159.
- Hepperle, D. & Krienitz, L. (2001) Systematics and ecology of chlorophyte picoplankton in German inland waters along a nutrient gradient. *International Review of Hydrobiology*, **86**, 269-284.
- Hepperle, D. & Schlegel, I. (2002) Molecular diversity of eucaryotic picoalgae from three lakes in Switzerland. *International Review of Hydrobiology*, **87**, 1-10.
- Ibelings, B.W., De Bruin, A., Kagami, M., Rijkeboer, M., Brehm, G.M. & Van Donk, E. (2004) Review Host parasite interactions between freshwater phytoplankton and chytrid fungi (*Chytridiomycota*). *Journal of Phycology*, **40**, 437-453.
- Jacquet, V., Lair, N., Hoffmann, L. & Cauchie, H.M. (2005) Spatio-temporal patterns of protozoan communities in a meso-eutrophic reservoir (Esch-sur-Sure, Luxembourg). Ecology and disturbances of aquatic systems. *Hydrobiologia The Hague*, **551**, 49-60.
- John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. (2002) *The Freshwater Algal Flora of the British Isles - An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*, Press syndicate of the University of Cambridge, Cambridge.
- Kagami, M. & Urabe, J. (2002) Mortality of the planktonic desmid, *Staurastrum dorsidentiferum*, due to interplay of fungal parasitism and low light conditions. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, **28**, 1001-1005.

- King, N. (2005) Choanoflagellates. *Current Biology*, **15**, 113-114.
- Komárek, J. (1996) Towards a combined approach for the taxonomy and species delimitation of picoplanktic cyanoprokaryotes. Cyanobacteria: morphology, taxonomy, ecology. *Archiv fur Hydrobiologie Supplement and Algological studies*, **117**, 377-401.
- Leander, B.S., Kuvardina, O.N., Aleshin, V.V., Mylnikov, A.P. & Keeling, P.J. (2003) Molecular phylogeny and surface morphology of *Colpodella edax* (Alveolata): Insights into the phagotrophic ancestry of apicomplexans. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**, 334-340.
- Lefranc, M., Thenot, A., Lepere, U. & Debroas, D. (2005) Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5935-5942.
- Lepère, C., Boucher, D., Jardillier, L., Domaizon, I. & Debroas, D. (2006) Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem (Lake Pavin). *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 2971-2981.
- Lepère, C., Domaizon, I. & Debroas, D. (2007) Community composition of lacustrine small eukaryotes in hyper-eutrophic conditions in relation to top-down and bottom-up factors. *FEMS Microbiology Ecology*, **61**, 483-495.
- Lepère, C., Domaizon, I. & Debroas, D. (2008) Unexpected importance of potential parasites in the composition of freshwater small-eukaryotes community. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 2940-2949.
- Lim, E.L., Amaral, L.A., Caron, D.A. & Delong, E.F. (1993) Application of rRNA-based probes for observing nanoplanktonic protists. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 1647-1655.
- López-García, P., Philippe, H., Gail, F. & Moreira, D. (2003) Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *PNAS Microbiology*, **100**, 697-702.
- Malinsky-Rushansky, N., Berman, T. & Dubinsky, Z. (1997) Seasonal photosynthetic activity of autotrophic picoplankton in Lake Kinneret, Israel. *Journal of Plankton Research*, **19**, 979-993.
- Marie, D., Brussaard, C.P.D., Partensky, F. & Vaultot, D. (1999) Flow cytometric analysis of phytoplankton, bacteria and viruses. In: *Current Protocols in Cytometry*. (Ed^Eds J.P. Robinson), pp. 1-15. John Wiley & Sons, New York.
- Moon-Van Der Staay, S.Y., De Wachter, R. & Vaultot, D. (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, **409**, 607-610.
- Nemcova, Y. & Kalina, T. (2000) Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Archiv fur Hydrobiologie Supplement and Algological studies*, **136**, 95-105.
- Nicholls, K.H., Beaver, J.L. & Estabrook, R.H. (1982) Lakewide odours in Ontario and New Hampshire caused by *Chrysochromulina breviturrita* Nich. (Prymnesiophyceae). *Hydrobiologia*, **96**, 91-95.
- Okamoto, N. & Inouye, I. (2005) The katablepharids are a distant sister group of the Cryptophyta: a proposal for Katablepharidophyta Divisio Nova/Katablepharida Phylum Novum based on SSU rDNA and Beta-tubulin phylogeny. *Protist*, 163-179.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. (2004) Sensitive multi-color fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental microorganisms. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. (Ed^Eds, pp. 711-726. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

- Pick, F.R. & Agbeti, D.M. (1991) The seasonal dynamics and composition of photosynthetic picoplankton communities in temperate lakes in Ontario, Canada. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, **76**, 565-580.
- Richards, T.A., Vepritskiy, A.A., Gouliamova, D.E. & Nierzwicki Bauer, S.A. (2005) The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages. *Environmental Microbiology*, **7**, 1413-1425.
- Romari, K. & Vaultot, D. (2004) Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. *Limnology and Oceanography*, **49**, 784-798.
- Samuelsson, K. & Andersson, A. (2003) Predation limitation in the pelagic microbial food web in an oligotrophic aquatic system. *Aquatic Microbial Ecology*, **30**, 239-250.
- Sarmiento, H., Unrein, F., Isumbiso, M., Stenuite, S., Gasol, J.M. & Descy, J.P. (2008) Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshwater Biology*, **53**, 756-771.
- Savin, M.C., Martin, J.L., Legresley, M., Giewat, M. & Rooney-Varga, J. (2004) Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *Microbial Ecology*, **48**, 51-65.
- Shannon, C.E. & Weaver, W. (1963) The mathematical theory of communication. *Urbana, University of Illinois Press*.
- Simek, K., Bobkova, J., Macek, M., Nedoma, J. & Psenner, R. (1995) Ciliate grazing on picoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum : a study at the species and community level. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1077-1090.
- Simon, N., Campbell, L., Ornlöf, E., Groben, R., Guillou, L., Lange, M. & Medlin, L.K. (2000) Oligonucleotide probes for the identification of three algal groups by dot blot and fluorescent whole-cell hybridization. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **47**, 76-84.
- Simon, N., Lebot, N., Marie, D., Partensky, F. & Vaultot, D. (1995) Fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 2506-2513.
- Šlapeta, J., Lopez-Garcia, P. & Moreira, D. (2006) Present Status of the Molecular Ecology of Kathablepharids. *Protist*, **157**, 7-11.
- Šlapeta, J., Moreira, D. & Lopez Garcia, P. (2005) The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, **272**, 2073-2081.
- Søndergaard, M. (1991) Phototrophic picoplankton in temperate lakes: seasonal abundance and importance along a trophic gradient. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, **76**, 505-522.
- Stockner, J., Callieri, C. & Cronberg, G. (2000) Picoplankton and other non-bloom forming cyanobacteria in lakes. In: *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. (Eds B. Whitton & M. Potts), pp. 195-238. Kluwer Academic Publishers.
- Stockner, J.G. (1991) Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems : the view from the summit. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, **76**, 483-492.
- Stockner, J.G. & Antia, N.J. (1986) Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **43**, 2472-2503.

- Stockner, J.G. & Shortreed, K.S. (1991) Autotrophic picoplankton : community composition, abundance and distribution across a gradient of oligotrophic British Columbia and Yukon Territory lakes. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, **76**, 581-601.
- Weisse, T. (1993) Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. In: *Advances in Microbial Ecology*. (Ed^Eds J.G. Jones), pp. 327-370. Plenum Press, New York.
- Willame, R., Boutte, C., Grubisic, S., Wilmotte, A., Komarek, J. & Hoffmann, L. (2006) Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *Journal of Phycology*, **42**, 1312-1332.
- Willame, R., Thys, I., Jacquet, V., Verbank, M., Cauchie, H. & Hoffmann, L. (2008) Environmental variables involved in the development of bloom-forming cyanobacteria in a mesoeutrophic reservoir. *Algological Studies*, **126**, 227-247.
- Wille, E. & Hoffmann, L. (1991) Population dynamics of the dinoflagellate *Gymnodinium helveticum* Penard in the reservoir of Esch-sur-Sure (G.-D. of Luxembourg). *Belgian Journal of Botany*, **124**, 109-114.
- Yu, Y., Breitbart, M., Mcnairnie, P. & Rohwer, F. (2006) FastGroupII: a web-based bioinformatics platform for analyses of large 16S rDNA libraries. *BMC Bioinformatics*, **7**, 57-65.
- Zhu, F., Massana, R., Not, F., Marie, D. & Vaultot, D. (2005) Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiology Ecology*, **52**, 79-92.



# CHAPITRE III

**Distribution du plancton eucaryote  
en Manche et en Mer du Nord en été**

### III. 1 Résumé en français

L'abondance et la biomasse du plancton eucaryote ont été étudiées dans la Manche et la Mer du Nord durant la campagne Microvir en été 2007. L'identification taxinomique du microphytoplancton a été réalisée à partir d'échantillons prélevés au filet à plancton (10 µm). L'abondance et la biomasse des picocyanobactéries contenant de la phycoérythrine, des eucaryotes autotrophes et hétérotrophes (distribués dans différentes classes de tailles) ont été déterminées par microscopie à épifluorescence après coloration au DAPI. En parallèle, des sondes spécifiques des Chlorophyta et Haptophyta ont permis de déterminer la distribution de ces deux groupes importants par FISH-TSA. Nous avons également estimé la distribution de la Prasinophyceae picoplanctonique *Micromonas pusilla* en utilisant la sonde spécifique Micro01. En termes d'abondances, les eucaryotes inférieurs à 2 µm dominaient sur les eucaryotes de taille supérieure (sauf à la station 16). Inversement, les eucaryotes supérieurs à 5 µm (diatomées dans la Manche et dinoflagellés en Mer du Nord) dominaient en termes de biomasse, en particulier à la station 22 où une efflorescence de *Ceratium* a été observée. Les chlorophytes dominaient généralement la fraction picoplanctonique avec une dominance de *M. pusilla* dans la Manche. La contribution de cette espèce diminuait à partir des stations de transition jusqu'au Skagerrak et a même disparu à certaines stations (11, 18, 19 et 21). Les Haptophyta n'ont pas été détectés dans la fraction picoplanctonique durant la campagne. Leur contribution dans la fraction entre 2 µm et 5 µm augmentait à partir des côtes jusqu'aux stations du large, avec une efflorescence d'haptophytes observée à la station 16. Les Chlorophyta et Haptophyta contribuaient en moyenne pour moins de 30 % de la fraction supérieure à 5 µm. En conclusion, *M. pusilla* est dominant uniquement dans la Manche en été, alors que les haptophytes sont plus importants au large.

Draft version to be submitted to Journal of Sea Research

**Distribution of eukaryotic plankton in the English Channel and the North  
Sea in summer**

Sylvie Masquelier<sup>a</sup>, Elodie Foulon<sup>a</sup>, Fabien Jouenne<sup>a</sup>, Joaquin Martinez<sup>b</sup>, Corina Brussaard<sup>b</sup>,  
Daniel Vaultot<sup>a</sup>

<sup>a</sup> UPMC (Paris-06) et CNRS, UMR 7144, Groupe Plancton Station Biologique de Roscoff,  
BP74, 29682 Roscoff, Cedex, France

<sup>b</sup> Royal Netherlands Institute for Sea Research, P.O. Box 59, 1790 AB Den Burg, The  
Netherlands

## Abstract

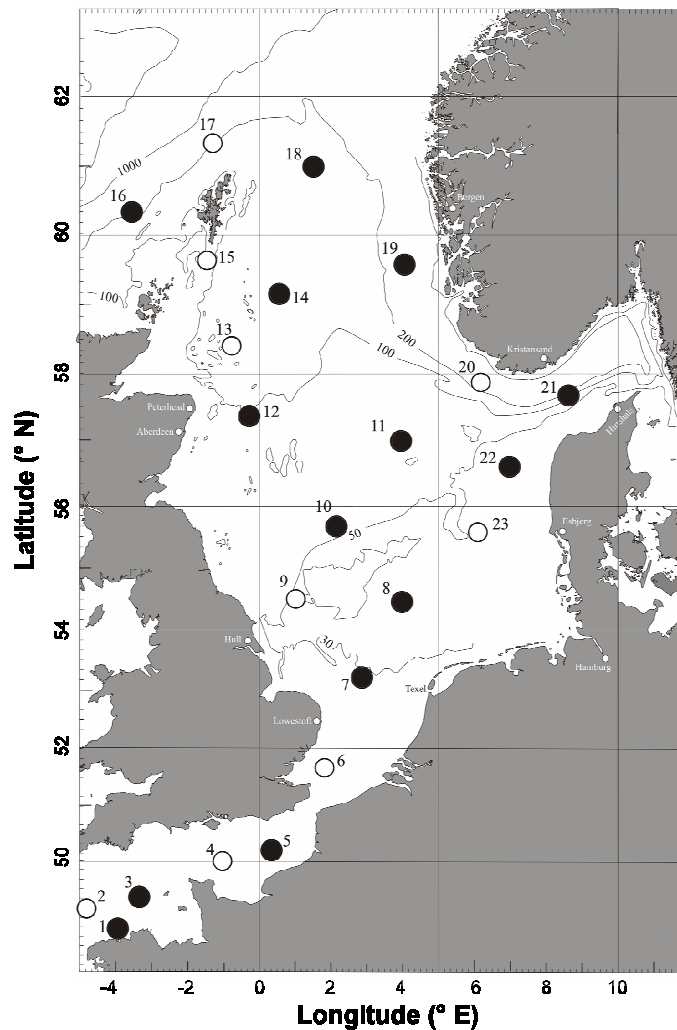
The abundance and the biomass of eukaryotic plankton were investigated in the English Channel and the North Sea during the Microvir cruise in summer 2007. The taxonomic identification of microphytoplankton was realized from plankton net samples. The abundance and biomass of phycoerythrin-containing picocyanobacteria, autotrophic and heterotrophic eukaryotes (classified into different size ranges) were determined by epifluorescence microscopy after DAPI staining. In parallel, specific probes for Chlorophyta and Haptophyta were detected by TSA-FISH to determine the distribution of these two important groups. We also estimated the distribution of the picoplanktonic Prasinophyceae *Micromonas pusilla* using the specific probe Micro01. In terms of abundance, eukaryotes below 2  $\mu\text{m}$  dominated over the larger eukaryotes (except at station 16). In contrast, eukaryotes larger than 5  $\mu\text{m}$  (diatoms in the English Channel and dinoflagellates in the North Sea) dominated in terms of biomass, in particular at station 22 where a bloom of *Ceratium* occurred. Chlorophytes generally dominated the picoplanktonic fraction with a dominance of *M. pusilla* in the English Channel. The contribution of this species decreased from the transition stations to the Skagerrak and even disappeared at some stations (11, 18, 19 and 21). Haptophyta were not detected in the picoplanktonic fraction during the cruise. Its contribution to the fraction between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$  increased from the coastal to the central stations and a haptophyte bloom occurred at station 16. Chlorophyta and Haptophyta contributed on average for less than 30 % of the fraction larger than 5  $\mu\text{m}$ . In conclusion, *M. pusilla* is dominant only in the English Channel in summer, whereas haptophytes are more important in open seawaters.

*Keywords:* phytoplankton, Chlorophyta, *M. pusilla*, Haptophyta, North Sea, English Channel, TSA-FISH

## 1. Introduction

The North Sea is a complicated marine environment characterized by different water masses. At its shallowest point, it consists of a mixture of North Sea water and freshwater run-off. In deeper areas, relatively pure water of Atlantic origin is found. The circulation and distribution of these water masses is important in supporting biological productivity (Reid et al., 1988). Nano- and microphytoplankton (plankton of size between 2  $\mu\text{m}$  and 20  $\mu\text{m}$ , and larger than 20  $\mu\text{m}$ , respectively, Sieburth et al., 1978) are the major contributors to algal biomass and primary production of the North Sea. Furthermore, more than 30 taxa have been described as occurring in bloom proportions in the North Sea and adjacent waters (Reid et al., 1990). This is the case, in particular, for *Phaeocystis* sp. and *Ceratium* sp. with blooms occurring principally in spring and summer, respectively (Reid et al., 1990; Gieskes et al., 2007). Other studies on the North Sea have focused on the composition and dynamics of the nano-size fraction of the plankton and have been often restricted to specific areas of the North Sea (Van Duyl et al., 1990; Druzhkov and Druzhkova, 2000). The Continuous Plankton Recorder (CPR) survey has provided qualitative and quantitative information on the distribution of phytoplankton in the different areas of the North Sea and in the North Atlantic since 1958 but mostly for the micro- size fractions (Beaugrand-Gregory et al., 2004).

Picophytoplankton can contribute to more than 30 % of the chlorophyll biomass in the English Channel and it plays a role in the primary production (Not et al., 2004), but little is known about picophytoplankton in terms of diversity, abundance and biomass in the North Sea. Pigment analyses showed that the smaller than 5  $\mu\text{m}$  fraction in the English Channel is composed mainly of green algae, prymnesiophytes and chrysophytes (Brunet and Lizon, 2003). Analyses of the 18S rRNA gene on natural picoplankton communities from Helgoland and English Channel waters have revealed a high diversity among picoeukaryotes (Romari and Vaultot, 2004; Medlin et al., 2006). One study realized in 1994 in the Skagerrak analyzed and quantified the pico size fraction by epifluorescence microscopy (Kuylenstierna and Karlson, 1994). They showed that the species *Micromonas pusilla* could be abundant. Not et al. (2004) showed with molecular probes that this species could dominate the autotrophic picoeukaryotic population in the English Channel. However, these studies were restricted to coastal environments and the distribution of this species elsewhere in the North Sea is still unknown.



**Fig. 1.** Stations investigated during the Microvir cruise. Numbers in the bottom and in the left of the map correspond to longitudes and latitudes, respectively. Black circles correspond to the stations analyzed in this study. Isobaths are also shown on the map.

**Table 1**

Coordinates of stations analyzed in this study and sampling depths for countings in TSA-FISH and DAPI staining.

Station	Latitude (°N)	Longitude (°E)	Sampling depths (m)	Maximum depth (m)
1	48.77	-3.95	10-25-50	65
3	49.33	-3.33	10-25-50	76
5	50.20	0.33	10 and 25	39
7	53.17	2.87	10 and 20	32
8	54.41	4.05	10-20-25-30	46
10	55.68	2.28	10-20-30-40-60	83
11	56.99	3.99	10-30-40	61
12	57.33	-0.33	10-20-35-50	77
14	59.17	0.67	10-20-35-50-75	124
16	60.33	-3.49	10-20-40-50	139
18	61.00	1.99	10-20-25-35-50	133
19	59.33	4.33	10-20-30-40-50	267
21	57.67	8.67	10-20-35-55-80	142
22	56.50	7.17	10-20-25	36

Very few studies investigated the heterotrophic eukaryotic pico- and nanoplankton in the North Sea (Brandt and Sleigh, 2000). Although heterotrophic protists play a pivotal role in mediating organic flux to higher trophic levels in pelagic ecosystems (Fenchel et al., 1982; Azam et al., 1983; Hagström et al., 1988). Heterotrophic picoflagellates are important grazers in oceanic waters (Reckermann and Veldhuis, 1997; Caron et al., 1999) while Christaki et al. (2002) and Nejstgaard et al. (2007) showed that ciliates and dinoflagellates are important grazers of picoplankton and single cells of Haptophyta.

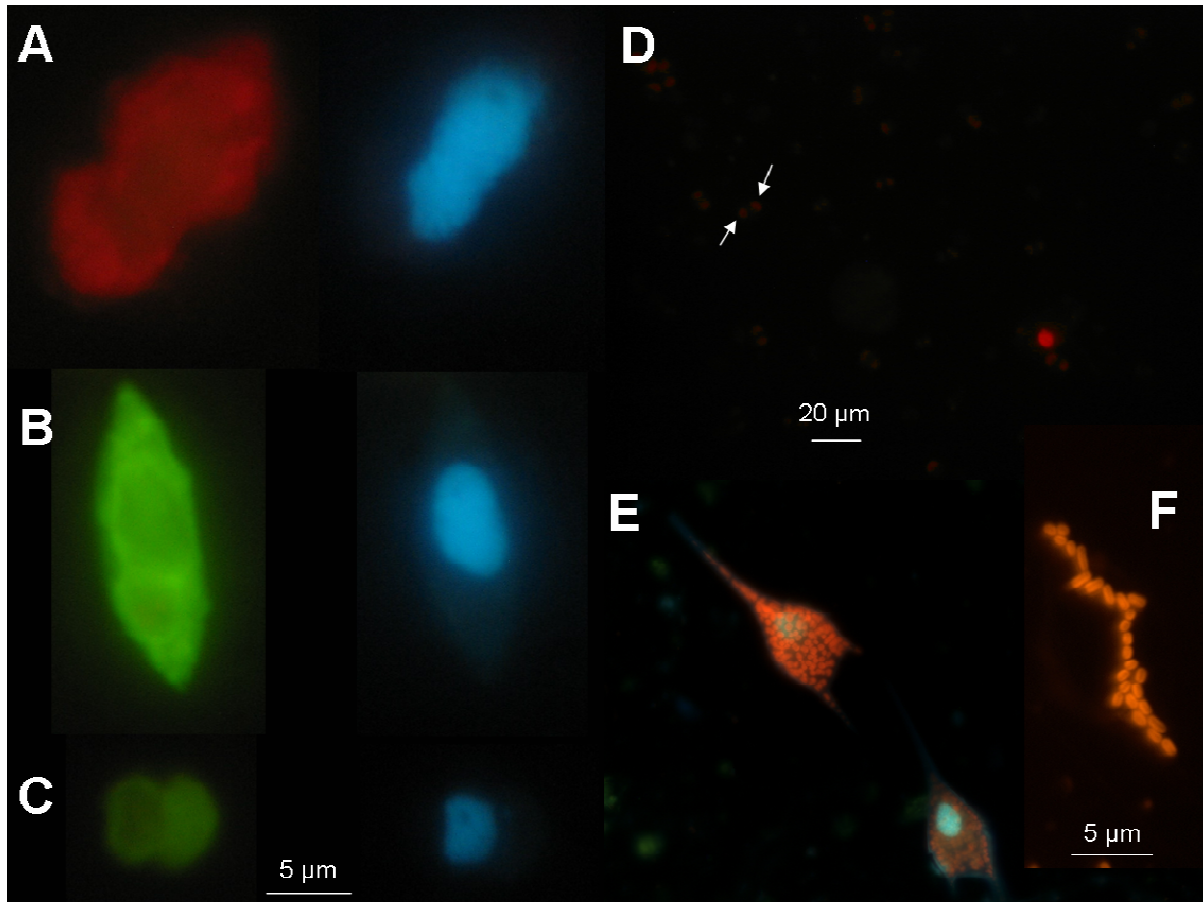
In the present study, epifluorescence microscopy was combined with TSA-FISH analysis of probes targeting 18S rRNA to assess the distribution and biomass of major groups of eukaryotic plankton along a transect between the English Channel and the North Sea. Epifluorescence microscopy allowed us (1) to discriminate specific groups of organisms such as dinoflagellates and diatoms, (2) to distinguish and enumerate heterotrophic and autotrophic cells, (3) to regroup organisms into size classes. TSA-FISH allowed us to estimate the contribution of Chlorophyta and Haptophyta to the different size ranges of autotrophic eukaryotes. The distribution of the different types of organisms were related to oceanographic conditions.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Sampling and oceanographic context*

The MICROVIR cruise took place on board the Dutch R/V Pelagia in the North Sea from 2<sup>nd</sup> July to 30<sup>th</sup> July 2007 from Brest (France) to Texel (Netherlands), through the English Channel and the North Sea (Fig. 1). Stations were characteristic from North Atlantic waters coming from the English Channel and via the northern part of the North Sea, French and English coastal waters, water from the Skagerrak, and different combinations of these waters.

Among the 23 stations occupied during the cruise, 14 were selected for analysis (Table 1). These stations were sampled at different depths (from 2 to 5 depths depending on stations) with a conductivity-temperature-depth (CTD) rosette system equipped with 12 L Niskin bottles. In general, one sample was collected at 10 m depth, one above the chlorophyll maximum, one at the chlorophyll maximum, and two below. Water was pre-filtered through a 200 µm mesh to remove zooplankton, large phytoplankton, and particles before further filtrations in order to render easier the visualization of smaller organisms.



**Fig. 2.** Pictures of autotrophic (A), green fluorescing (B) and heterotrophic dinoflagellates (C) observed under blue light excitation (left) and UV light excitation (right); pictures taken at stations 16 (10 m), 12 (35 m) and 18 (10 m), respectively; scale bar 5  $\mu\text{m}$  for A, B and C. Picture of haptophyte cells at station 16 (10 m) (D); white arrows show the two chloroplasts of a haptophyte cell. Pictures of *Ceratium* sp. (E) and picocyanobacteria (F) at station 22 (20m). Pictures of *Ceratium* sp. were obtained by merging pictures taken under blue light and UV light in order to visualize nuclei (in blue) and chloroplasts (in red) on the same picture. Scale bar 20  $\mu\text{m}$  for D and E.



## 2.2. Filters stained with DAPI

Water samples (100 mL) were fixed with glutaraldehyde (0.25 % final concentration) and filtered through 0.8  $\mu\text{m}$  pore size black filters. This porosity was selected to avoid high densities of bacteria on the filter which would have rendered visualisation of the larger and less dense eukaryotes more difficult. Samples were stained with 50  $\mu\text{L}$  of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  final concentration) and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The samples were stored at this temperature for 6 months before counting using an Olympus BX51 epifluorescence microscope (Olympus Optical CO, Tokyo, Japan) equipped with a mercury light source and an x100 UVFL objective. Pictures of dinoflagellates and haptophyte cells (Fig. 2A, B, C and D) were taken on board the ship on the freshly prepared slides using a BH2 Olympus microscope with an x40 objective and a Canon G5 digital camera. Pictures of *Ceratium* and picocyanobacteria (Fig. 2E and 2F) were taken in the laboratory on the BX51 Olympus microscope with a Spot RT-slider camera (Diagnostics Instruments, Sterling Heights, MI).

We distinguished autotrophic from heterotrophic eukaryotes under blue light (490/515 nm), autotrophic eukaryotes appearing in red because of the autofluorescence of chlorophyll while heterotrophic eukaryotes appeared in green (Fig. 2A and 2C). However, it was not possible to distinguish truly autotrophic organisms from organisms that had ingested chlorophyll-containing cells. Eukaryotes were classified according to three diameter ranges: (1) smaller than 2  $\mu\text{m}$ , (2) between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$ , (3) larger than 5  $\mu\text{m}$ . Among eukaryotes larger than 5  $\mu\text{m}$ , dinoflagellates and diatoms were counted separately. Dinoflagellates were discriminated by their shape, their size (between 5  $\mu\text{m}$  and 250  $\mu\text{m}$ ), and the presence of a nucleus with condensed chromatin. Autotrophic and heterotrophic dinoflagellates were discriminated according to the red fluorescence of chlorophyll under blue light of the former (Fig. 2A and 2C). Out of the heterotrophic dinoflagellates, some were characterized by an intense green fluorescence under blue light, as reported previously (Shapiro et al., 1989; Masquelier and Vaulot, 2008), and counted separately (Fig. 2B). Diatoms were discriminated by their shape and their size (generally  $> 20\text{ }\mu\text{m}$ ). Phycoerythrin-containing picocyanobacteria (PE picocyanobacteria) were counted based on the orange fluorescence of phycoerythrin excited under green light (530/550 nm) (Fig. 2F). Because of their small size and rapidly fading fluorescence, *Prochlorococcus* cannot be counted reliably by epifluorescence microscopy. Therefore, the term picocyanobacteria used in the present study will refer only to PE picocyanobacteria. For each sample, 15 fields and a minimum of 100 cells were counted.

**Table 2**  
Oligonucleotide probes used in the present study

Probe name	Sequence	Target group	Reference
EUK1209	5'-GGGCATCACAGACCTG-3'	Eukaryotes	Giovannoni et al. (1988); Lim et al. (1993)
CHLO01	5'-GCTCCACGCCTGGTGGTG-3'	Most Chlorophyta/Some Non-Chlorophyta	Simon et al. (1995)
NCHLO01	5'-GCTCCACTCCTGGTGGTG-3'	Most Non-Chlorophyta/Some Chlorophyta	Simon et al. (1995)
CHLO02	5'-CTTCGAGCCCCCACTTT-3'	Chlorophyta	Simon et al. (2000)
PRYM02	5'-GGAATACGAGTGCCCTGAC-3'	Haptophyta	Simon et al. (2000)
PRAS04	5'-CGTAAGCCCGCTTTGAAC-3'	Mamiellales (except the genus <i>Dolichomastix</i> )	Not et al. (2004)
MICRO01	5'-AATGGAACACCGCCGGCG-3'	<i>Micromonas pusilla</i>	Not et al. (2004)

### 2.3. FISH associated with tyramide signal amplification

Water samples (90 mL) were fixed with 1 % paraformaldehyde (final concentration) at 4°C for 1h, and immobilized onto 0.2 µm pore size Anodisc filters (Whatman Int. Ltd., Maidstone, Kent, UK). The cells were then dehydrated in an ethanol series (50 %, 80 %, 100 %, 3 min each; Amann (1995)), dried, and kept at room temperature in the dark during the cruise and at -80°C in the lab until TSA-FISH analysis.

The oligonucleotide probes Euk1209, Chlo01 and NChlo01 were used as a mix in order to target all eukaryotes. Chlo02 targetted Chlorophyta, Prym02, Haptophyta, Pras04, Mamiellales (Prasinophyceae order) and Micro01, *Micromonas pusilla* (Mamiellales) (Table 2).

Whole cell *in situ* hybridization with TSA amplification was performed according to Not et al. (2002), except for additional steps of permeabilisation before hybridization. To avoid cell loss during cell wall permeabilization, filters were dipped into low melting-point agarose (0.2% [wt/vol] in MQ water), dried face up on glass slides at 35°C, and subsequently dehydrated in 96 % (vol/vol) ethanol for 1 min. For permeabilization, 100 µl of 15mg mL<sup>-1</sup> cellulase (5.1 unit mg<sup>-1</sup>, Sigma) were added to each filter and left to incubate 10 min at 37°C. Then, filters were washed twice in sterile distilled water for 10 min at room temperature, dehydrated in 96 % (vol/vol) ethanol for 1 min, dried, and cut into pieces with a razor blade. To avoid background, before hybridization, 10 µl of formamide hybridization buffer (40% deionized formamide, 0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.01 % sodium dodecyl sulfate [SDS], 10 % (w:v) blocking reagent [Roche Diagnostic Boehringer]) were added to each piece of filter and incubated 30 min at 35°C. In order to visualize the nuclei, cells were counterstained with DAPI (5 µg mL<sup>-1</sup> final concentration).

Counts were performed with an Olympus BX51 epifluorescence microscope (Olympus Optical CO, Tokyo, Japan) equipped with a mercury light source and an x100 UVFL objective. Hybridized cells were observed under blue light (490/515 nm) to excite fluorescein which emits an intense green fluorescence. The parallel DAPI staining on TSA-FISH filters allowed us to discriminate eukaryotic from prokaryotic organisms. Under UV light (360/420 nm), eukaryotic cell nucleus appeared as a separate blue organelle. For prokaryotes, no nucleus was visible and cells appeared uniformly stained. For each sample, 15 to 30 fields and a minimum of 100 cells were counted.

**Table 3**

Mean cell volume ( $\mu\text{m}^3$ ) of eukaryotes investigated in the present study. Eukaryotes  $> 5 \mu\text{m}$  exclud diatoms and dinoflagellates. - corresponds to diatoms not observed.

Station	Eukaryotes			Diatoms ( $\mu\text{m}^3$ )	Dinoflagellates ( $\mu\text{m}^3$ )
	Eukaryotes < 2 $\mu\text{m}$ ( $\mu\text{m}^3$ )	> 2 $\mu\text{m}$ and < 5 $\mu\text{m}$ ( $\mu\text{m}^3$ )	Eukaryotes > 5 $\mu\text{m}$ ( $\mu\text{m}^3$ )		
1	0.85	12	107	218	368
3	0.84	11	93	-	306
5	0.81	15	114	850	357
7	0.60	33	153	9581	497
8	0.65	14	146	1234	274
10	0.98	13	153	504	300
11	0.27	14	170	33	400
12	0.45	11	192	-	444
14	0.45	12	219	-	299
16	0.71	9	159	338	379
18	0.65	11	185	702	348
19	0.67	12	183	3076	456
21	0.57	9	182	726	355
22	1.53	13	171	6970	1648

**Table 4**

Mean cell volume ( $\mu\text{m}^3$ ) and whole water column-integrated concentrations ( $\times 10^6 \text{ cell cm}^{-2}$ ) of picocyanobacteria obtained by microscopy. Absent means that no colony was observed; present means that less than  $20 \times 10^3 \text{ colonies cm}^{-2}$  (or  $10 \text{ colonies mL}^{-1}$ ) were observed; abundant means that more than  $20 \times 10^3 \text{ colonies cm}^{-2}$  (or  $10 \text{ colonies mL}^{-1}$ ) were observed.

Station	Picocyanobacteria biovolume ( $\mu\text{m}^3$ )	Picocyanobacteria integrated concentrations ( $\times 10^6 \text{ cell cm}^{-2}$ )	
			Colonies
1	0.26	13.9	absent
3	0.26	21.4	present
5	0.26	4.8	absent
7	0.26	16.9	absent
8	0.31	26.9	present
10	0.31	33	absent
11	0.26	21.7	present
12	0.31	38.4	absent
14	0.31	98.1	absent
16	0.31	6.2	absent
18	0.31	33.8	absent
19	0.26	70.5	abundant
21	0.36	65.8	abundant
22	0.36	31.9	abundant

#### 2.4. Biomass estimates

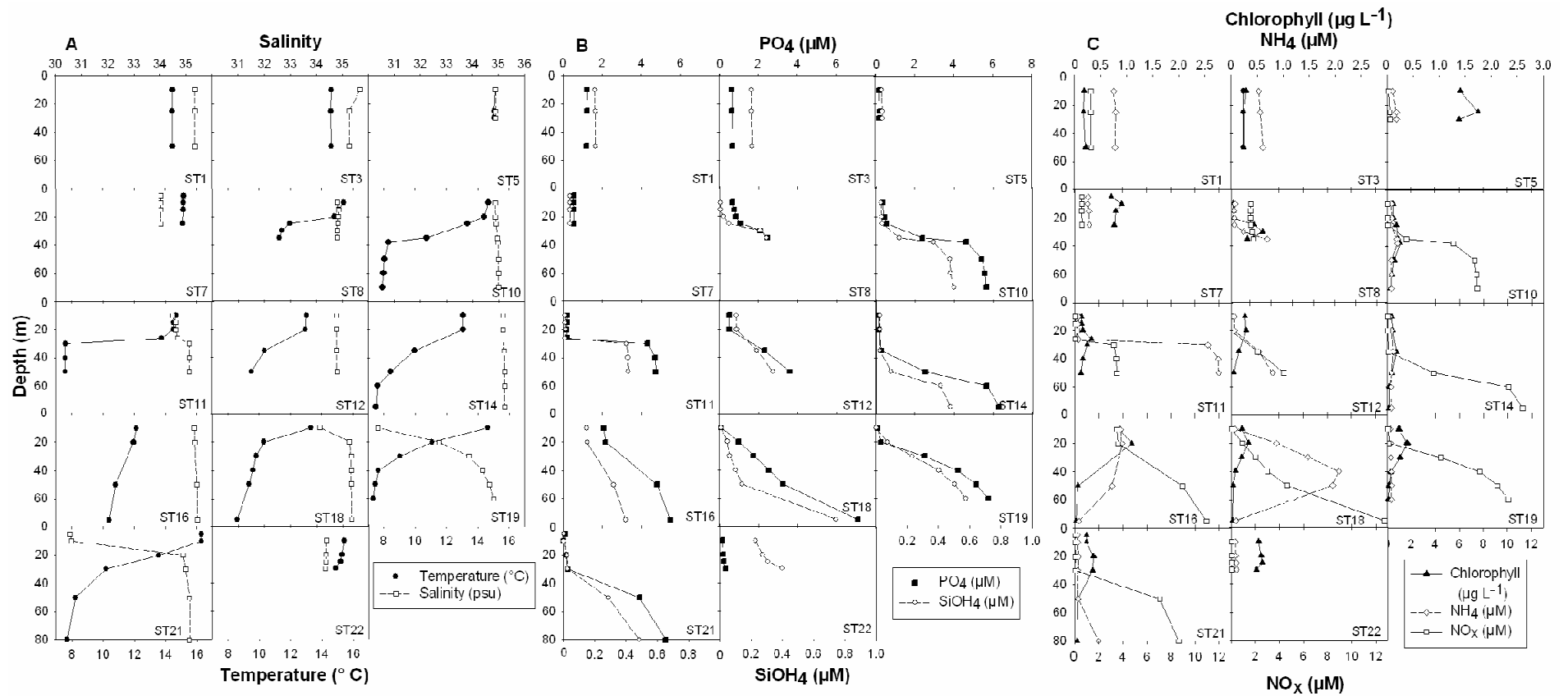
Cell volumes were determined by microscopic measurements on DAPI staining filters (Tables 3 and 4). For most of organisms, spherical or prolate shape was estimated using the formula of Hillebrand et al. (1999). For diatoms and *Ceratium*, the shapes “cylinder + 2 half spheres” and “prolate + 3 cylinders” were used, respectively. At least 100 randomly selected cells were examined for each sample.

Individual cell carbon (C) biomass was estimated from cell volume ( $V$  in  $\mu\text{m}^3$ ), according to empirical volume-to-carbon conversion factors. For picophytoplankton (phycoerythrin-containing picocyanobacteria and picoeukaryotes), we used the equation:  $\text{pg C cell}^{-1} = 0.433V^{0.863}$  (Verity et al., 1992). For nano- and microphytoplankton, C estimates were obtained using the following equations:  $\text{pg C cell}^{-1} = 0.288V^{0.863}$  for protist plankton smaller than  $3,000 \mu\text{m}^3$ ,  $\text{pg C cell}^{-1} = 0.117V^{0.881}$  for diatoms larger than  $3,000 \mu\text{m}^3$  and  $\text{pg C cell}^{-1} = 0.444V^{0.864}$  for dinoflagellates larger than  $3,000 \mu\text{m}^3$  (Menden-Deuer and Lessard, 2000). Different equations were used for dinoflagellates and diatoms larger than  $3,000 \mu\text{m}^3$  because Menden-Deuer and Lessard (2000) found that dinoflagellates are significantly denser than diatoms only for cells larger than  $3,000 \mu\text{m}^3$ . We restricted the use of Menden-Deuer and Lessard’s conversion factors to the nano- and microplankton size ranges, because when applied to picoplankton it consistently yielded lower cell carbon biomass in comparison with other studies (Campbell et al., 1997; Millan Nunez et al., 2004).

Finally, C biomass for each size category was calculated by multiplying cell concentration by cell C.

#### 2.5. Taxonomic identification of microphytoplankton

At each station, plankton was collected with a net of  $10 \mu\text{m}$  mesh drawn at the surface during 10 minutes. Samples (50 mL) were fixed with 570  $\mu\text{L}$  of acetic formol and kept at room temperature in the dark. Observations were performed during the cruise and in the laboratory with an Olympus BH-2 epifluorescence microscope and an Olympus BX51 epifluorescence microscope (Olympus Optical CO, Tokyo, Japan), respectively. These qualitative observations allowed us to have a floristic list of the major species of nano- and microplankton present in each sample. Representative images are available from the Plankton\*Net web site (<http://planktonnet.awi.de>).



**Fig. 3.** Vertical profiles of temperature (°C) (●) and salinity (psu) (□) (A), concentrations of PO<sub>4</sub> (μM) (■) and SiOH<sub>4</sub> (μM) (○) (B), chlorophyll (μg L<sup>-1</sup>) (▲), concentrations of NH<sub>4</sub> (μM) (◇) and concentrations of nitrogen oxides (□) for the stations analyzed.

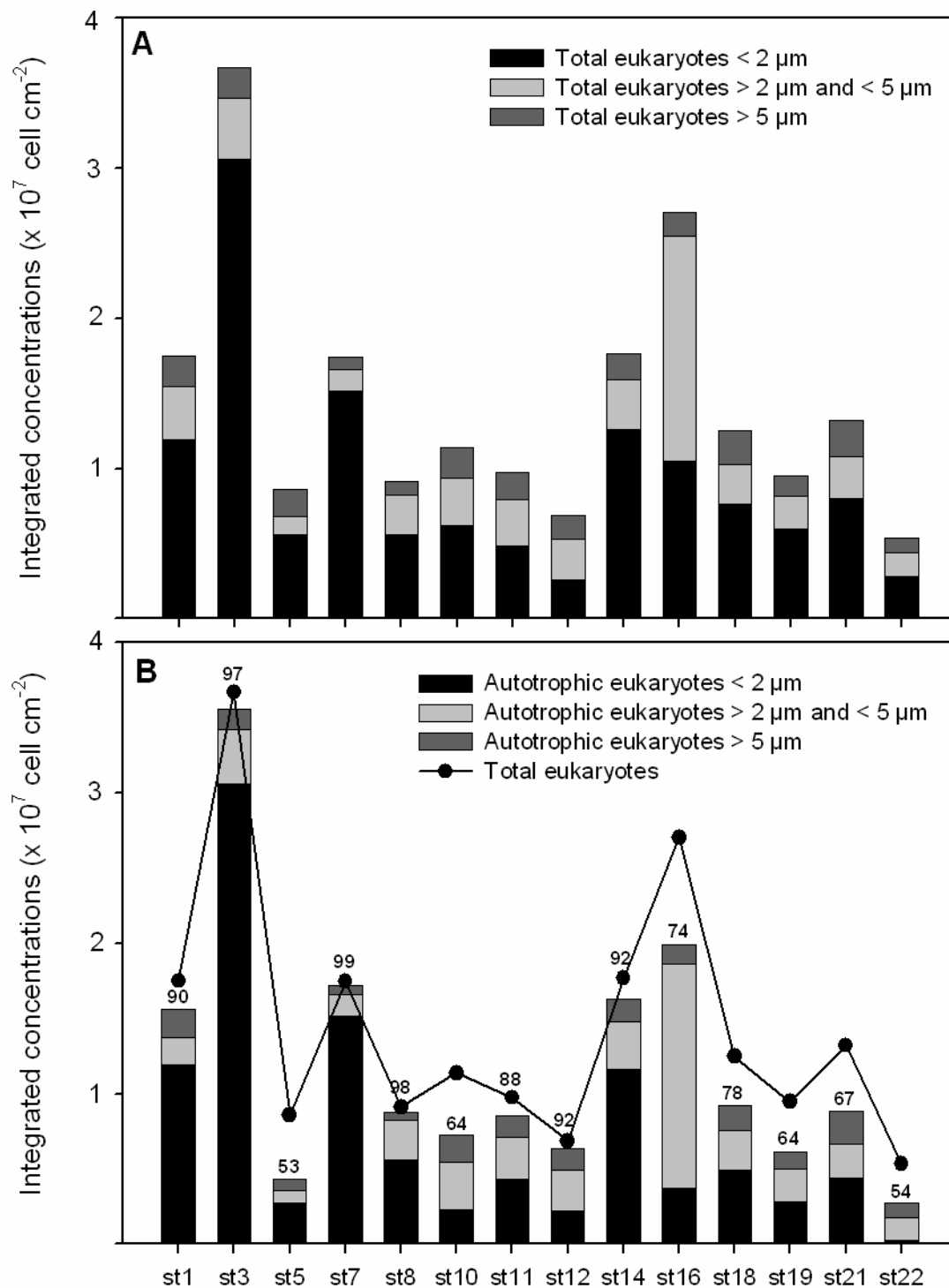
### 3. Results

#### 3.1. Hydrographic data

In summer, as expected, the southern stations were well mixed whereas the other stations showed clear stratification with a thermocline occurring between 15 m and 30 m depending on station (Fig. 3A). While in general, salinity remained constant between 34 and 35.5, at stations 19 and 21, salinity was lower in surface (30.2) due to the influence of freshwater input. At these stations, stratification is stable all year round (Reid et al., 1988). Globally, the distribution of nutrients in the water column followed a pattern opposite to that of temperature (Fig. 3B and 3C). However, at station 16, we observed higher nutrient concentrations (from 2 to 20 times) in the surface layer, in comparison with other stations. Nitrogen oxides and phosphate reached their maximum concentration at station 18 at 75 m depth (12.77  $\mu\text{M}$  for nitrogen oxides and 0.88  $\mu\text{M}$  for phosphate). Their minimum concentration was observed at station 22 at 20 m for nitrogen oxides (0.012  $\mu\text{M}$ ) and at station 5 at 10 m for phosphate (0.024  $\mu\text{M}$ ). Nitrogen oxides and phosphate followed both the same pattern with constant concentrations through the water column at stations 1, 3, 5, 7 and 22. They showed stratification between stations 8 and 21 with lower concentrations in the upper layer and higher concentrations observed in the bottom. Ammonium which can be used as an indicator of remineralisation showed concentrations ranging from 0.056  $\mu\text{M}$  (station 21 at 5 m) to 2.76  $\mu\text{M}$  (station 11 at 50 m) (Fig. 3C). Its concentration was generally constant through the water column, except at stations 11 and 18 where higher concentration was observed at 50 m and 40 m, respectively. The depth of chlorophyll maximum (DCM) was generally observed between 15 m and 30 m depth, near the thermocline (Fig. 3C).

#### 3.2. Comparison between microscopy and flow cytometry for total eukaryotes and picocyanobacteria counts

Counts of total eukaryotes were realized by microscopy on TSA-FISH filters and DAPI staining filters. A very good correlation was observed between data from TSA-FISH filters and DAPI filters ( $y = 0.98 x$ ;  $R^2 = 0.99$ ;  $n = 52$ ). Therefore, for clarity, we only took into account values of total eukaryotes abundance obtained on TSA-FISH filters for the rest of the paper. Autotrophic eukaryotes were estimated on DAPI filters because of the dehydration of



**Fig. 4.** Whole water column-integrated concentrations ( $\times 10^7$  cell  $\text{cm}^{-2}$ ) of total (A) and autotrophic (B) eukaryotes with the contribution of the different size ranges for the stations analyzed. Numbers in the top of the vertical bars correspond to the contribution (in percentage) of autotrophic eukaryotes to the total eukaryotes.

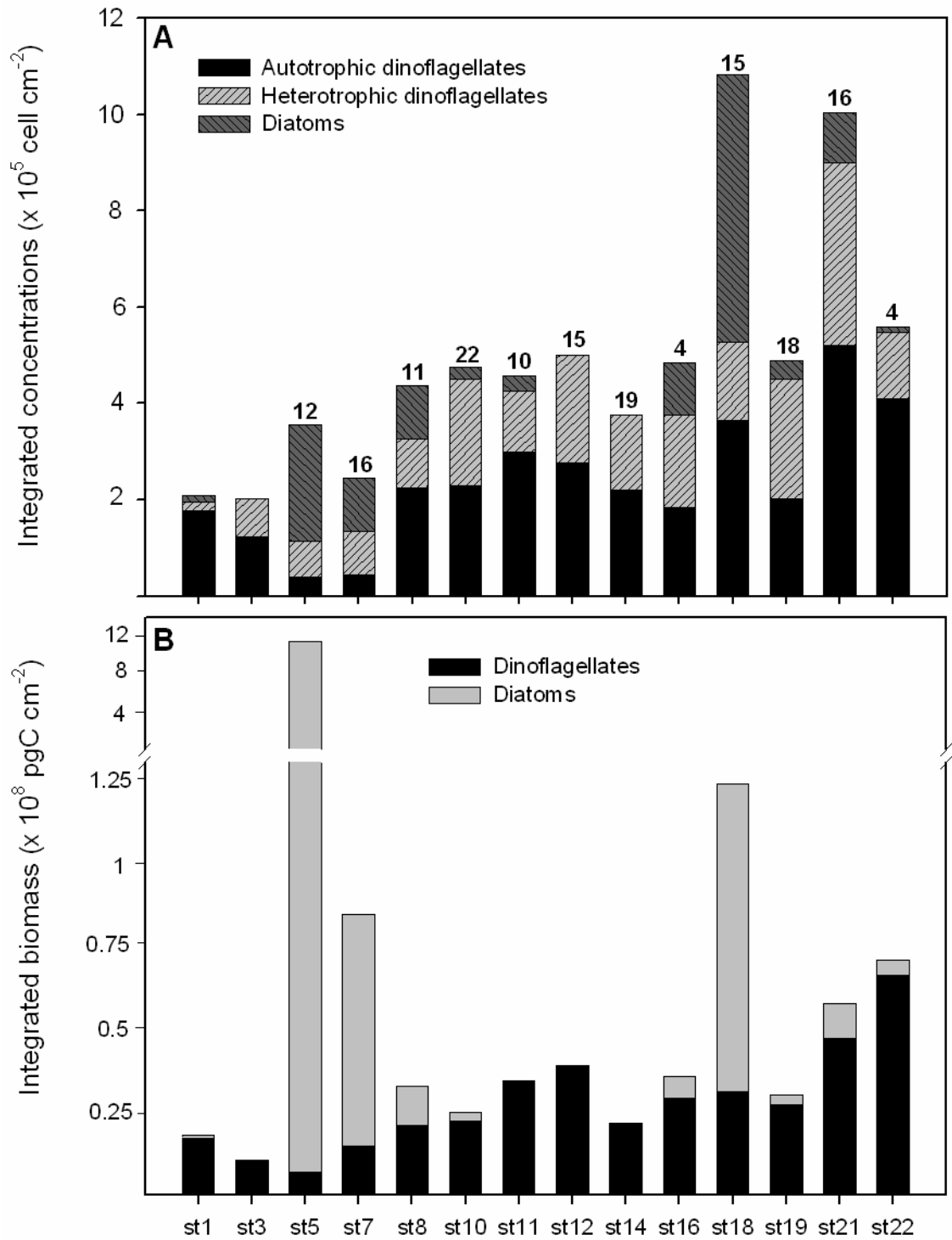


TSA-FISH filters in an ethanol series dissolves the chlorophyll of the autotrophic cells. Counts for picocyanobacteria were obtained on DAPI filters only (Table 4).

In order to validate our microscopy counts, we compared them to counts of picocyanobacteria and autotrophic pico- and nanoeukaryotes done by flow cytometry at the same stations (Martinez et al., in prep). There was a relatively good correlation between the two methods, such that global distribution trends were identical. However, slopes were significantly larger than one indicating that microscopy was underestimating actual concentrations. For picocyanobacteria ( $y = 3.6x$ ;  $R^2=0.61$ ;  $n=52$ ) and autotrophic picoeukaryotes ( $y = 3.7x$ ;  $R^2=0.69$ ;  $n=52$ ), abundance found by microscopy was almost 4 times lower than measured by flow cytometry. For autotrophic nanoeukaryotes ( $y = 2x$ ;  $R^2=0.86$ ;  $n=52$ ), the correlation was better and abundance found by microscopy was 2 times lower than measured by flow cytometry.

### 3.3. Abundance of eukaryotes

Total eukaryote abundance ranged from 345 cell mL<sup>-1</sup> at station 19 (50 m) to 9,176 cell mL<sup>-1</sup> at station 7 (10 m) (Fig. S1). Eukaryotes smaller than 2 µm dominated at each station, except at station 16 (10 m) where eukaryotes between 2 µm and 5 µm dominated (Fig. S2). Concentrations of picoeukaryotes ranged from 126 cell mL<sup>-1</sup> at station 12 (35 m) to 8,033 cell mL<sup>-1</sup> at station 7 (10m) while eukaryotes between 2 µm and 5 µm, and eukaryotes larger than 5 µm concentrations ranged from 64 cell mL<sup>-1</sup> at station 19 (50 m) to 5,740 cell mL<sup>-1</sup> at station 16 (10 m), and 64 cell mL<sup>-1</sup> at station 14 (75 m) to 724 cell mL<sup>-1</sup> at station 5 (25 m), respectively (Fig. S2). Because of differences in maximum depth between investigated stations, whole water column integration provided minima and maxima at different stations (Figure 4A) than for vertical profiles. Total eukaryote abundance ranged from 0.53 10<sup>7</sup> cell cm<sup>-2</sup> at station 22 to 3.7 10<sup>7</sup> cell cm<sup>-2</sup> at station 3. Concentrations of picoeukaryotes ranged from 2.5 10<sup>6</sup> cell cm<sup>-2</sup> at station 12 to 30.6 10<sup>6</sup> cell cm<sup>-2</sup> at station 3 while eukaryotes between 2 µm and 5 µm, and eukaryotes larger than 5 µm concentrations ranged from 1.2 10<sup>6</sup> cell cm<sup>-2</sup> at station 5 to 14.5 10<sup>6</sup> cell cm<sup>-2</sup> at station 16, and 0.85 10<sup>6</sup> cell cm<sup>-2</sup> at station 7 to 2.4 10<sup>6</sup> cell cm<sup>-2</sup> at station 21, respectively. However, the dominance of picoeukaryotes at each station except at station 16 where eukaryotes between 2 µm and 5 µm dominated, was observed for both vertical profiles and integrated data.



**Fig. 5.** Whole water column-integrated concentrations ( $\times 10^5 \text{ cell cm}^{-2}$ ) of diatoms (hatched lines in grey), and dinoflagellates with contributions of autotrophic (in black) and heterotrophic (hatched lines light grey) dinoflagellates. Numbers in the top of the vertical bars correspond to percentage of green dinoflagellates among heterotrophic dinoflagellates. None number corresponds to no green dinoflagellate counted (A); whole water column-integrated biomass ( $\times 10^8 \text{ pgC cm}^{-2}$ ) of diatoms (in grey) and dinoflagellates (in black) for the stations analyzed (B).

Globally, autotrophic eukaryotes accounted for half or more of total eukaryotes. That was also what we observed for the different size classes, except at stations 5, 10, 16, 19, 21 and 22 where autotrophic picoeukaryotes accounted for less than 50 % (from 10 % to 48 %) of total picoeukaryotes (Fig. 4B). At station 5, autotrophic eukaryotes larger than 5  $\mu\text{m}$  accounted for 44 % of total eukaryotes larger than 5  $\mu\text{m}$  while elsewhere along the transect, they accounted for from 60 % to more than 90 % of total eukaryotes larger than 5  $\mu\text{m}$ .

Diatom abundance ranged from  $0.1 \cdot 10^5 \text{ cell cm}^{-2}$  at station 22 ( $5 \text{ cell mL}^{-1}$  at 25 m) to  $5.5 \cdot 10^5 \text{ cell cm}^{-2}$  at station 18 ( $325 \text{ cell mL}^{-1}$  at 25 m). Two peaks were observed at station 5 ( $2.4 \cdot 10^5 \text{ cell cm}^{-2}$ ;  $99 \text{ cell mL}^{-1}$  at 10 m) and at station 18 (Fig. 5A).

Dinoflagellate concentrations were generally higher than those of diatoms and increased progressively from the English Channel ( $2 \cdot 10^5 \text{ cell cm}^{-2}$ ;  $29 \text{ cell mL}^{-1}$ ) to the Skagerrak ( $9 \cdot 10^5 \text{ cell cm}^{-2}$ ;  $238 \text{ cell mL}^{-1}$ ). On average, 58 % of dinoflagellates were autotrophic, with a minimum value of 32 % at station 7, and a maximum value of 90 % at station 1 (Fig. 5A). Among heterotrophic dinoflagellates, we observed in maximum, 22 % of green fluorescing dinoflagellates at station 10. At some stations, they were absent while at the other stations, less than 20 % of green fluorescing dinoflagellates were observed.

The absence of diatoms at certain stations was principally due to the prefiltration on 200  $\mu\text{m}$  during sampling. Indeed, observations of samples from plankton net showed the presence of diatoms at almost each station while epifluorescence microscopy on prefiltered samples did not allow us to count diatoms at stations 3, 12 and 14 (Table 5). Plankton net sample observations allowed us to highlight a succession pattern along the transect between diatoms and dinoflagellates. The two stations sampled in the English Channel were dominated by large chains-forming diatoms (*Guinardia flaccida*, *G. delicatula*, *G. striata*) with only a few dinoflagellates (e.g. *Prorocentrum* spp). At the boundary between English Channel and North Sea waters (stations 7 and 8), large diatoms were still observed but dinoflagellates started to appear, in particular some species of *Ceratium* in station 8. The next four stations were dominated mostly by dinoflagellates, especially *Ceratium* and *Scrippsiella trochoidea*, whereas just a few diatoms were observed sporadically. Diatoms were more abundant at station 16 along with large *Ceratium* species (e.g. *C. fusus*, *C. trichoceros*). Station 18, situated at the extreme north of transect, was dominated by small dinoflagellates and small chains-forming diatoms. Larger dinoflagellates reappeared in the next three stations: *Ceratium* spp and heterotrophic species (e.g. *Protoperdinium* spp at station 21).

**Table 5**

Floristic list of microplankton observed on plankton net samples for each investigated station. Nutrition mode: A for autotrophy, M for mixotrophy, H for heterotrophy. Estimated dimensions mostly from Tomas (1997) and iconographic data (Plankton\*Net).

Species	Station			3	5	7	8	10	11	12	14	16	18	19	21	22
	Nutrition mode	Shape	Estimated Dimensions (µm)	English Channel	North Sea											
<b>Bacillariophyceae</b>																
<i>Chaetoceros decipiens</i>	A	Chains	Apical axis 9-84				•									
<i>Chaetoceros densus</i>	A	Chains	Apical axis 10-55	•												
<i>Chaetoceros didymus</i>	A	Chains	Apical axis 10-40												•	
<i>Chaetoceros spp.</i>	A	Chains	-		•	•							•	•	•	
<i>Corethron hystrix</i>	A	Single	Pervalvar axis 20-200						•			•				
<i>Coscinodiscus radiatus</i>	A	Single	Diameter 30-180	•												
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i>	A	Chains	Pervalvar axis 42-300		•											
<i>Diploneis bombus</i>	A	Single	Apical axis 70-80	•												
<i>Diploneis littoralis</i>	A	Single	nd	•												
<i>Eucampia zodiacus</i>	A	Chains	Apical axis 8-80			•										
<i>Guinardia delicatula</i>	A	Chains	Apical axis 30-60		•	•										
<i>Guinardia flaccida</i>	A	Chains	Apical axis 50-200	•	•	•						•			•	
<i>Guinardia striata</i>	A	Chains	Apical axis 100-250		•	•										
<i>Leptocylindrus danicus</i>	A	Chains	Diameter 5-16				•									
<i>Meuniera membranacea</i>	A	Chains	Apical axis 50-90	•												
<i>Paralia sulcata</i>	A	Chains	Diameter 8-130	•	•	•								•		•
<i>Pleurosigma normanii</i>	A	Single	Apical axis 90-220	•												
<i>Podosira stelliger</i>	A	Single	Apical axis 30-50		•											
<i>Proboscia alata</i>	A	Chains	Diameter 2.5-13				•		•		•	•	•	•	•	
<i>Pseudo-nitzschia sp.</i>	A	Chains	-		•							•				
<i>Rhizosolenia imbricata</i>	A	Chains	Apical axis 2.5-57		•	•	•							•		•
<i>Rhizosolenia setigera</i>	A	Single	Apical axis 150-200	•		•	•									
<i>Rhizosolenia styliformis</i>	A	Single	Diameter 23-90				•					•				
<i>Thalassiosira spp.</i>	A	Chains	-			•										
<b>Dinophyceae</b>																
<i>Ceratium furca</i>	M	Single	Length 200-300				•		•			•		•	•	•
<i>Ceratium fusus</i>	M	Single	Length 200-600						•	•	•	•		•	•	•
<i>Ceratium horridum</i>	M	Single	Length 200-300				•		•		•			•	•	
<i>Ceratium lineatum</i>	M	Single	Length 80-120								•					•
<i>Ceratium longipes</i>	M	Single	Length 250-350						•		•			•	•	
<i>Ceratium macroceros</i>	M	Single	Length 300-400				•							•	•	
<i>Ceratium massiliense</i>	M	Single	Length 500-600				•		•							
<i>Ceratium spp.</i>	M	Single	-							•						
<i>Ceratium trichoceros</i>	M	Single	Length 500-700								•	•				
<i>Ceratium tripos</i>	M	Single	Length 200-300									•		•		
<i>Dinophysis acuminata</i>	H	Single	Length 30-50			•			•		•	•			•	•
<i>Pyrocystis lunula</i>	M	Single	Length 150-200			•										
<i>Gonyaulax digitale</i>	M	Single	Length 30-50			•										
<i>Gonyaulax spinifera</i>	M	Single	Length 30-50				•									
<i>Gonyaulax spp.</i>	M	Single	-							•						
<i>Phalacroma rotundata</i>	H	Single	Length 30-50												•	•
<i>Prorocentrum gracile</i>	M	Single	Length 20-30	•											•	
<i>Prorocentrum micans</i>	M	Single	Length 30-50	•			•			•				•	•	•
<i>Protoperidinium bipes</i>	H	Single	Length 20-30				•		•			•				
<i>Protoperidinium claudicans</i>	H	Single	Length 40-70												•	
<i>Protoperidinium depressum</i>	H	Single	Length 150-200						•		•				•	
<i>Protoperidinium steinii</i>	H	Single	Length 30-50												•	•
<i>Protoperidinium pellucidum</i>	H	Single	Length 30-50		•											
<i>Protoperidinium spp.</i>	H	Single	-			•				•	•					
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	M	Single	Length 20-30				•	•	•	•	•	•			•	
<b>Dictyochophyceae</b>																
<i>Dictyocha sp.</i>	A	Single	-				•									
<i>Dictyocha fibula</i>	A	Single	Length 10-45													•
<i>Dictyocha speculum</i>	A	Single	Length 19-34	•	•									•		

At station 22, a bloom of *Ceratium* was observed with concentrations reaching 90 cell mL<sup>-1</sup> through the water column.

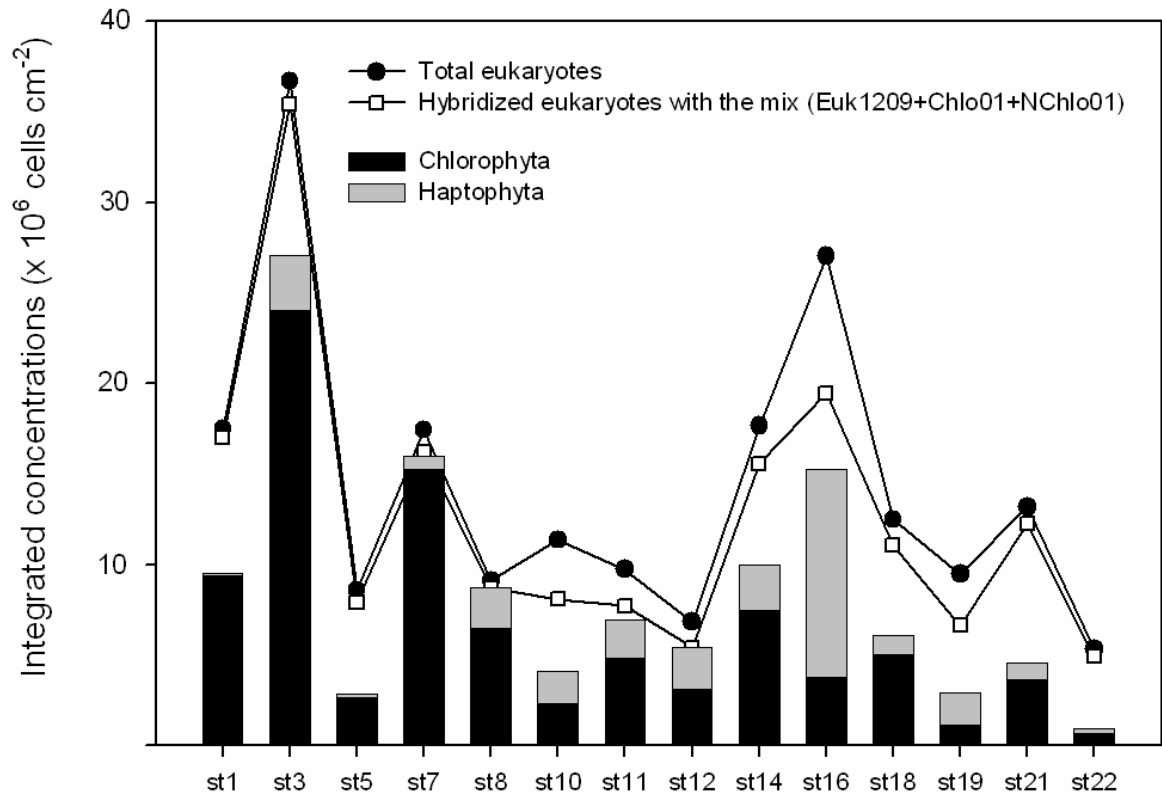
### 3.4. Distribution of Chlorophyta and Haptophyta

The yielded ratio between eukaryotes hybridized with the mix of 18S rRNA probes (Euk1209+Chlo01+NChlo01) and eukaryotes stained with DAPI counted under UV light ranged from 70 % (for station 19) to 97 % (for station 1) with an average value of 86 %. On average, 47 % and 19 % of total eukaryotes were hybridized with Chlorophyta and Haptophyta probes, respectively. The maximum value was observed in the English Channel and at station 7 for the Chlorophyta (92 %), and at station 16 for the Haptophyta (62 %) (Fig. 6).

For eukaryotes smaller than 2 µm, the percentage of hybridization varied from 71 % (for station 19) to 100 % (for stations 1, 7 and 8) with an average value of 93 % (Fig. 7A). Nineteen (stations 22) to 100 % (stations 1, 7, 12) were chlorophytes, while no haptophytes was detected. Among chlorophytes, we observed an average of 55 % of Mamiellales with minima and maxima observed at station 19 (less than 20 %), and at station 5 (more than 90 %), respectively. Counts with the probe Micro01 showed an average of 39 % of *Micromonas pusilla* among Mamiellales smaller than 2 µm. Maxima (100 %) were observed at stations 1, 7 and 12. *Micromonas pusilla* was not detected at stations 11, 18, 19 and 21.

For eukaryotes between 2 µm and 5 µm, lower values of hybridization were observed: from 51 % (for stations 14 and 16) to 93 % (for station 21) with an average value of 68 % (Fig. 7B). Outside of the English Channel, a majority of Haptophyta were observed (from 60 % to 96 %), except at station 8 where 71 % of eukaryotes were chlorophytes. Among eukaryotes between 2 µm and 5 µm belonging to the Chlorophyta, we observed less than 30 % of Mamiellales at each station, except at station 3 where the totality of Chlorophyta belonged to the Mamiellales order.

Eukaryotes larger than 5 µm showed hybridizations from 59 % (for station 7) to 97 % (for station 1) with an average value of 82 % (Fig. 7C). Chlorophytes and haptophytes contributed from less than 5 % up to 37 % of eukaryotes. Generally, haptophyte contribution dominated over the one of chlorophytes, except at stations 1, 5 and 8. Mamiellales were not observed, except at stations 3, 8, 14, 16 and 21 where less than 15 % of chlorophytes belonged to the order of Mamiellales.



**Fig. 6.** Whole water column-integrated concentrations ( $\times 10^6$  cell  $\text{cm}^{-2}$ ) of total eukaryotes counted by DAPI staining ( $\bullet$ ) and total eukaryotes hybridized with the mix of probes (Euk1209+Chlo01+NChlo01) ( $\square$ ) with the contributions of Chlorophyta (in black) and Haptophyta (in grey).

### 3.5. Biomass and chlorophyll

Biomass of total eukaryotes ranged from  $0.5 \cdot 10^8$  pgC cm<sup>-2</sup> at station 8 to  $12.2 \cdot 10^8$  pgC cm<sup>-2</sup> at station 5 (Fig. 8). For total eukaryotes and autotrophic eukaryotes (data not shown), organisms larger than 5 µm dominated everywhere while organisms smaller than 2 µm accounted for less than 10 % of the total eukaryotic biomass. Diatom biomass dominated at stations 5, 7 and 18 where their abundance was maximum (Fig. 5B). In the other stations, either no diatom was counted, or dinoflagellate biomass dominated especially because of larger concentrations.

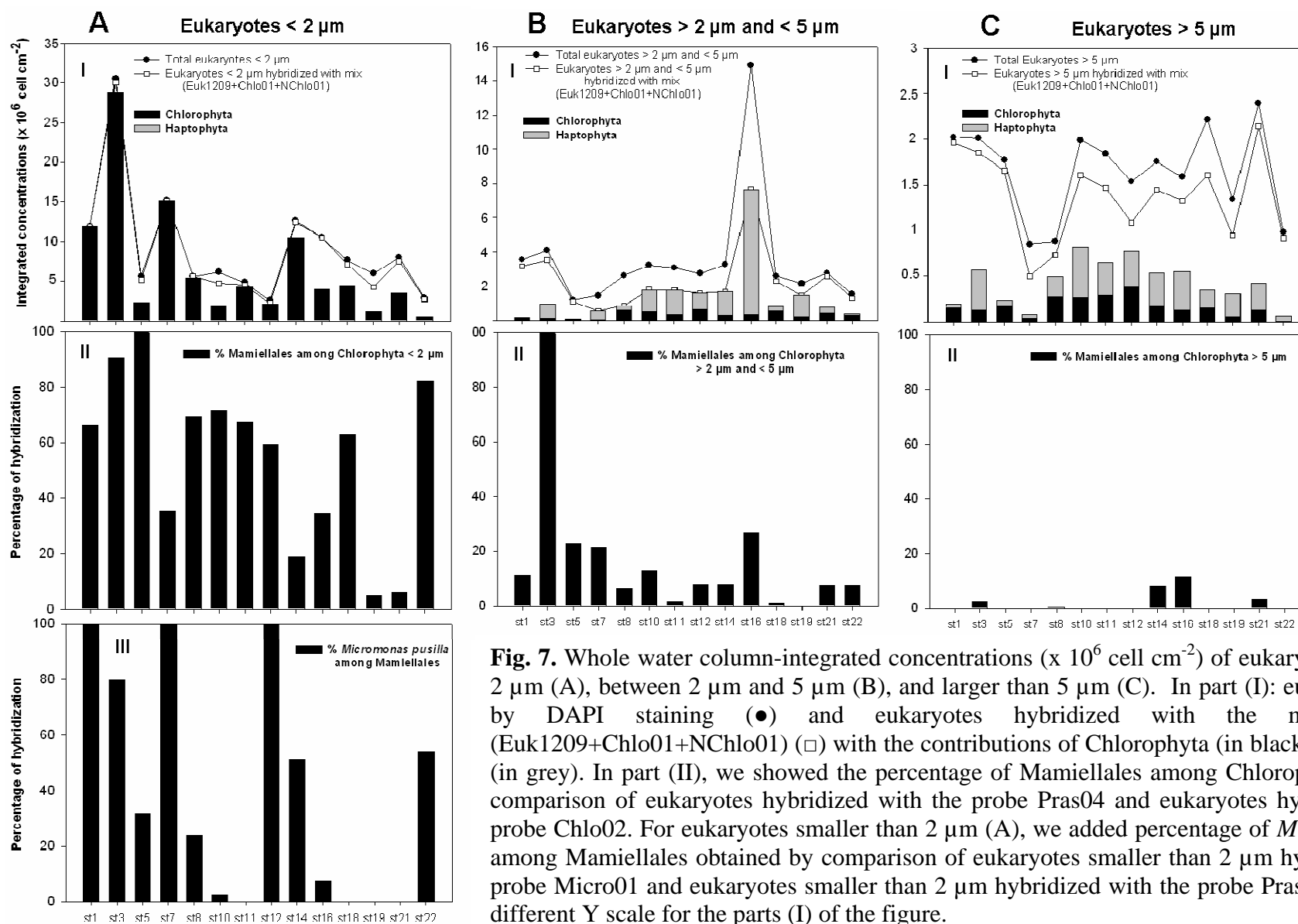
The integrated chlorophyll reached  $4.56 \cdot 10^6$  µg cm<sup>-2</sup> at station 5 and showed a lower peak at station 16 with  $3.57 \cdot 10^6$  µg cm<sup>-2</sup> (Fig. 9). Autotrophic biomass from biovolumes and concentrations showed only one peak at station 5 ( $12 \cdot 10^8$  pgC cm<sup>-2</sup>) (Fig. 9).

## 4. Discussion

### 4.1. Methodological considerations

The differences between abundance estimated by microscopy versus flow cytometry could be due to several reasons as previously discussed in Masquelier and Vaultot (2008). Test on cultures and natural samples showed that after one month of storage at -20 °C, cells fixed with glutaraldehyde and stained with DAPI were 2 times (for eukaryotes) to 3 times (for picocyanobacteria) lower than initially (data not shown). While this difference kept increasing for cultures after 2 months of storage, it seemed not be the case for natural samples (data not shown). Therefore, in future studies, time storage of microscopy samples should be as short as possible, nor exceeding a few days to avoid an underestimation of cell abundance.

In silico analysis of the mix of probes (Euk1209+Chlo01+NChlo01) with the 18S rRNA gene SILVA database (38,313 eukaryote sequences; April 2008; Pruesse et al., 2007) showed that more than 99 % of eukaryotes could be hybridized with at least one of the 3 probes. However, we observed that for eukaryotes between 2 µm and 5 µm, and for those larger than 5 µm, hybridization efficiency decreased down to 50 % at some stations (from stations 7 to 16). This could be due to the presence of a larger fraction of cells refractory to the permeabilization, or to a low amount of ribosomal RNA for some cells, e.g. for Haptophyta cells at the end of a bloom.



**Fig. 7.** Whole water column-integrated concentrations ( $\times 10^6$  cell  $\text{cm}^{-2}$ ) of eukaryotes smaller than 2  $\mu\text{m}$  (A), between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$  (B), and larger than 5  $\mu\text{m}$  (C). In part (I): eukaryotes counted by DAPI staining (●) and eukaryotes hybridized with the mix of probes (Euk1209+Chlo01+NChlo01) (□) with the contributions of Chlorophyta (in black) and Haptophyta (in grey). In part (II), we showed the percentage of Mamiellales among Chlorophyta obtained by comparison of eukaryotes hybridized with the probe Pras04 and eukaryotes hybridized with the probe Chlo02. For eukaryotes smaller than 2  $\mu\text{m}$  (A), we added percentage of *Micromonas pusilla* among Mamiellales obtained by comparison of eukaryotes smaller than 2  $\mu\text{m}$  hybridized with the probe Micro01 and eukaryotes smaller than 2  $\mu\text{m}$  hybridized with the probe Pras04 (III). Note the different Y scale for the parts (I) of the figure.



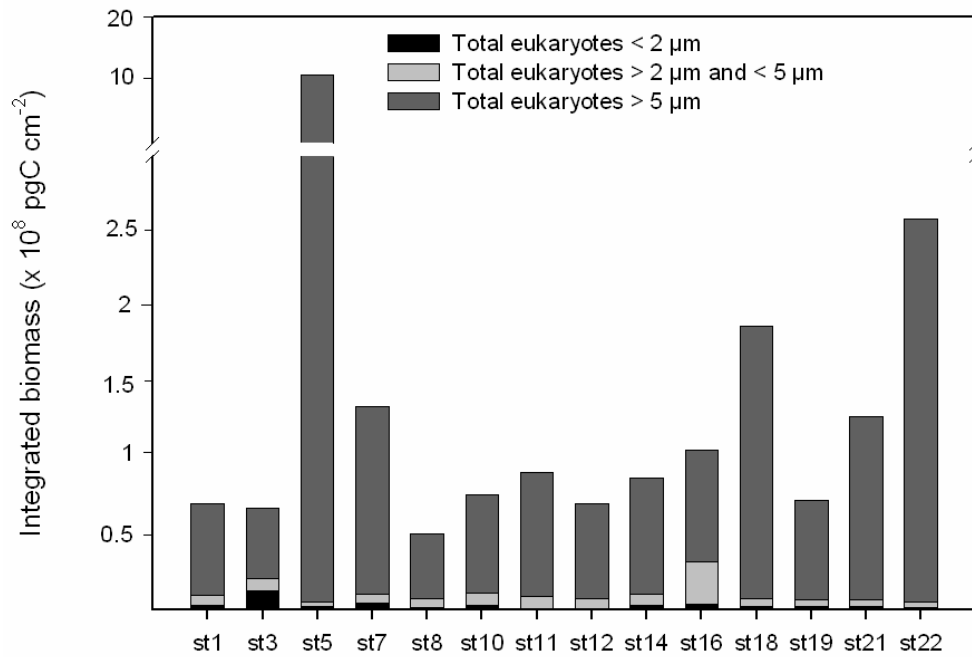
Biomass calculation has been done from microscopical measurements of cell dimensions. However, it should be noted that paraformaldehyde and glutaraldehyde can cause cell shrinkage. For instance, Verity et al. (1992) found a 7 % reduction in the biovolume of *Synechococcus bacillaris* after fixation in 0.5 % glutaraldehyde (final concentration). Therefore, we have to keep in mind that the biomass contribution to particulate carbon biomass could be underestimated.

#### 4.2. Composition of the eukaryotic community

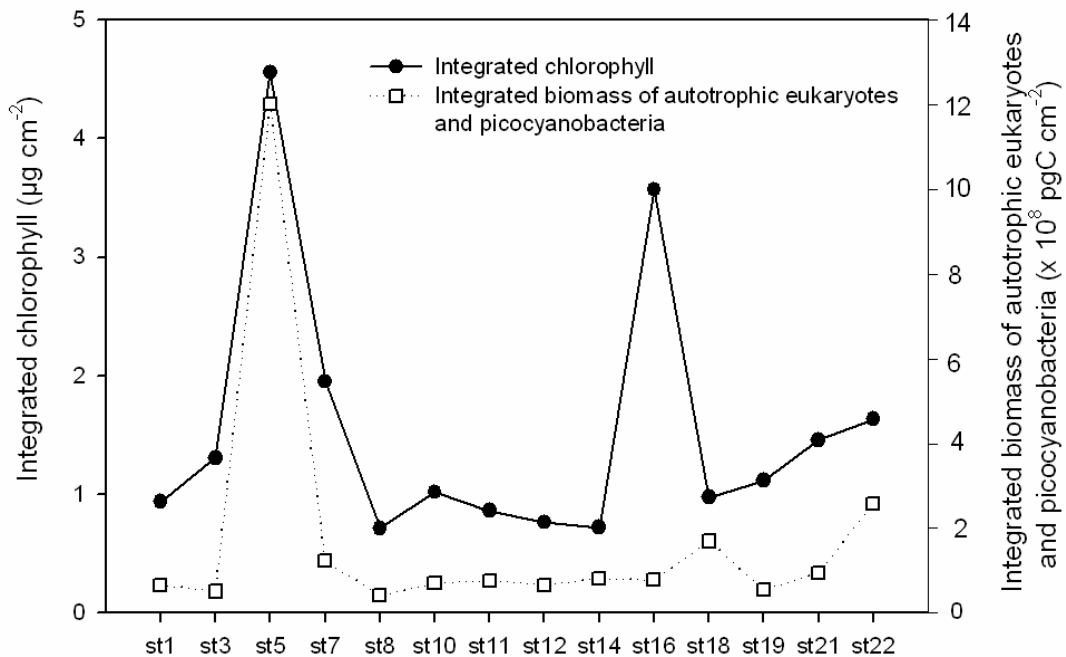
The dominance of eukaryotes smaller than 2  $\mu\text{m}$  at all stations (except at station 16) (Figure 4A) in terms of abundance is in agreement with other studies in the English Channel and the North Atlantic Ocean (Not et al., 2004; Veldhuis et al., 2005). Not et al. (2004) showed that in the English Channel, picoeukaryotes reached their maximum in summer with concentration of  $2 \cdot 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ , which is in agreement with concentrations obtained by flow cytometry (up to  $2.42 \cdot 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  at station 3 at 25 m). This concentration corresponded to the maximum of picoeukaryotes observed during the cruise. Generally, autotrophic organisms dominated the picoeukaryotic population with contributions reaching more than 90 %, although for some stations (stations 5, 10, 16, 19, 21 and 22), we observed a high contribution of heterotrophic picoeukaryotes (from 52 % to 90 %) (Figure 4B). In contrast to Andersen et al. (1996), the relative abundance of heterotrophic eukaryotes seemed to increase with depth at stations 5, 16, 21 and 22 while no apparent depth-dependant variations appeared at stations 10 and 19 (data not shown).

In the larger than 2  $\mu\text{m}$  size class, autotrophic eukaryotes contributed from 60 % to more than 90 % of total eukaryotes. That is in agreement with Beardsley et al. (2005) who determined by DAPI staining contributions of phototrophic nanoplankton from 69 % to 90 % in summer in the North Sea.

Chlorophyta contributions were generally higher in the smaller than 2  $\mu\text{m}$  fraction with an average value of 62 % while only 16 % and 12 % of Chlorophyta contributed on average in the fractions between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$  and larger than 5  $\mu\text{m}$ , respectively. This is in agreement with previous studies which showed that Chlorophyta population in the English Channel and in the North Sea was composed in majority by small Prasinophyceae as *Micromonas pusilla* and *Mantoniella* sp. (Kuylenstierna and Karlson, 1994; Not et al., 2004).



**Fig. 8.** Whole water column-integrated biomass ( $\times 10^8$  pgC mL<sup>-1</sup>) of total eukaryotes and contribution of the different size classes.



**Fig. 9.** Whole water column-integrated concentrations ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) of chlorophyll ( $\bullet$ ), and whole water column-integrated biomass ( $\times 10^8$  pgC cm<sup>-2</sup>) of autotrophic eukaryotes and picocyanobacteria ( $\square$ ).

No eukaryote smaller than 2  $\mu\text{m}$  was hybridized with the probe Pym02. This is in agreement with the fact that the smaller Haptophyta species (*Chrysochromulina minor*) described so far has a minimum size of 2.5  $\mu\text{m}$  (Vaulot et al., 2008). However, probe Pym02 recognized cells on the pico size fraction in the South-East Pacific (unpublished data). Pigment analyses made on the pico size fraction showed a dominance of haptophytes in the Equatorial Pacific (Moon-van der Staay et al., 2000), suggesting that pico haptophytes exist but would be preferentially encountered in more oligotrophic waters.

Eukaryotes larger than 5  $\mu\text{m}$  were principally composed of diatoms and dinoflagellates as previously shown by several studies in the English Channel and the North Sea (Beaugrand-Gregory et al., 2004). Green fluorescing dinoflagellates were initially observed by Shapiro et al. (1989) in the North-West Atlantic, but little reported since then (Fig. 2B). Shapiro et al. (1989) found that green fluorescing dinoflagellates could contribute from 4 to 100% to heterotrophic dinoflagellates. Masquelier and Vaulot (2008) found that in the South-East Pacific, from 5 to 50 % of heterotrophic dinoflagellates produced bright green fluorescence. In the present study, we observed a maximum of 22 % of green dinoflagellates among heterotrophic dinoflagellates at station 10 while no green dinoflagellate was observed at stations 1 and 3 of the English Channel. Shapiro et al. (1989) suggested that abundance of green dinoflagellates were generally positively correlated with chlorophyll. In the present study, green dinoflagellates abundance showed opposite pattern of chlorophyll (data not shown). The same trend was observed by Masquelier and Vaulot (2008) in the South-East Pacific where green dinoflagellates accounted for up to 50 % and between 5 % and 25 % of heterotrophic dinoflagellates in the oligotrophic and meso-eutrophic zones, respectively. These data suggest that green dinoflagellates are more abundant in oligotrophic waters.

#### 4.3. Distribution of the eukaryotic community

At station 1 and 3 of the English Channel, Chlorophyta contributed for more than 90 % of picoeukaryote population. This is in agreement with Not et al. (2004) who showed that on average in the English Channel, Chlorophyta contributed for 85 % of the picoeukaryote population. Furthermore, an average of 77 % of pico-Chlorophyta cells belonged to the order of Mamiellales at stations 1 and 3 which is also in agreement with average contribution of Mamiellales found by Not et al. (2004) (78 %). As previously shown by these authors, most of Mamiellales at stations 1 and 3 belonged to *Micromonas pusilla*, confirming the fact that

this species prevails in coastal systems and in particular, in the English Channel (Foulon et al., 2008). However, at station 5 also situated in the English Channel, only 46 % of picoeukaryotes belonged to Chlorophyta. Although all pico-chlorophytes detected at this station belonged to the Mamiellales order, the contribution of *M. pusilla* remained very low (14 % of picoeukaryotes), suggesting that other genera such as *Bathycoccus* and *Ostreococcus* occurred at station 5 (Not et al., 2004). Chlorophyta and Haptophyta accounted for less than 20 % of eukaryotes larger than 2  $\mu\text{m}$  in the English Channel. This is in agreement with several studies showing that haptophyte contribution was lower in coastal zones (Thomsen et al., 1994; Not et al., 2005, 2008). As previously shown by McQuatters-Gollop et al. (2007), diatoms, principally *Chaetoceros* sp. and *Guinardia* sp., dominated microphytoplankton over dinoflagellates certainly because well mixed and rich-nutrient waters promote diatom growth (Cloern and Dufford, 2005).

At stations 7 and 8 which can be considered as transition stations between the English Channel and the North Sea proper, the Chlorophyta still dominated picoeukaryotes but *M. pusilla* contribution decreased maybe due to the increased stratification as shown by Foulon et al. (2008). While the dominance of haptophytes (87 %) was observed at station 7 for eukaryotes between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$ , the opposite pattern was observed at station 8 with the dominance of chlorophytes (71 %). Among larger eukaryotes, the contribution of Chlorophyta and Haptophyta remained low. More diatoms (*Guinardia* sp.) were encountered at station 7, probably due to the well mixed water while at station 8, stratification of water promoted dinoflagellates (Smayda and Reynolds, 2001), and in particular the genus *Ceratium*.

The central stations 10 to 14 were all characterized by stratified waters. Chlorophyta contribution to picoeukaryotes was high (more than 80 %), except at station 10 where it decreased to 40 %. *M. pusilla* virtually disappeared at station 11, was low at station 14 and reached 59 % near the coast. The local absence of *Micromonas pusilla* at station 11 could be due to a viral infection which could decrease its abundance in an important way. Previous studies have suggested that viruses infecting *Micromonas pusilla* have a profound impact on populations of the species in natural systems (Zingone et al., 1999). Eukaryotes between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$  were dominated by haptophytes which of contributions ranged from 57 % at station 12 to 82 % at station 14. That is in agreement with the literature which showed a dominance of haptophytes in open seawater (Thomsen et al., 1994; Not et al., 2008). Among larger eukaryotes, the highest relative abundance of green dinoflagellates was observed at station 10

and globally, dinoflagellates dominated over diatoms, principally *Ceratium*, a dominant genus in summer in the North Sea (Dodge, 1982). The dominance of dinoflagellates over diatoms in the North Sea stations in summer, is in agreement with phytoplankton seasonal cycles survey made in the NE Atlantic by McQuatters-Gollop et al. (2007) which showed that in summer, the phytoplankton community composition across most of the NE Atlantic consisted of a greater number of dinoflagellates than diatoms.

At station 16, pico-chlorophytes contribution decreased to less than 40 % of picoeukaryotes and *M. pusilla* contributed for only 1 % of the picoeukaryote population. Eukaryotes between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$  dominated and were principally composed of Haptophyta (Fig. 2D). Riegman and Kraay (2001) also observed, based on HPLC analysis, a pronounced dominance of Prymnesiophyceae in the Faroe-Shetland Channel during summer 1999. The input of nutrient-rich Atlantic water could have promoted a haptophyte bloom in summer, inducing a relative decrease of the picophytoplankton (Fig. 7 and Table 4) as hypothesized by Iriarte and Purdie (1994). In the same way, the peak of diatoms observed at station 5 co-occurred with low concentrations of picoeukaryotes and picocyanobacteria. In contrast, at station 18, picocyanobacteria and picoeukaryotes decreased less despite high concentration of diatoms maybe due to lower nutrient limitation (Fig. 2). At station 16, we also observed the occurrence of *Ceratium* sp., and in particular the largest encountered during the cruise (*Ceratium trichoceros*).

At the northern station 18, *M. pusilla* was not counted despite a high contribution of pico-chlorophytes (62 % of picoeukaryotes). Not et al. (2005) which conducted observations in the Norwegian Sea in late summer showed that *M. pusilla* could contribute on average for up to 40 % of picoeukaryotic population, suggesting maybe a viral infection as previously discussed to explain the absence of *M. pusilla* at this station. Contributions of Chlorophyta and Haptophyta among eukaryotes larger than 2  $\mu\text{m}$  were relatively low (less than 30 %). High abundance of small chains-forming diatoms *Chaetoceros* spp. and small dinoflagellates were encountered inducing the diatom maximum observed in epifluorescence counts.

Stations 19 and 21 showed an important decrease of pico-chlorophytes contributions: 23 % and 43 %, respectively. At these stations, less than 1 % of picoeukaryotes belonged to Mamiellales order and *M. pusilla* was not counted. This could be due to the input of freshwater observed in the upper layer. However, *M. pusilla* seems to be able to grow at

salinity from 4 psu to 35 psu (Thronsen, 1976). Furthermore, this species is observed at salinity ranging from 14 psu to 35 psu in Dourduff estuary (English Channel, pers. comm. E. Foulon). Kuylenstierna & Karlson (1994), based on microscopy counts, already showed an important decrease of *M. pusilla* in the Skagerrak in summer with concentrations less than  $100 \text{ cell mL}^{-1}$ . While it reached 85 % at station 19, contributions of Haptophyta were relatively low (less than 30 %) at stations 21 for eukaryotes between  $2 \mu\text{m}$  and  $5 \mu\text{m}$ . Kuylenstierna & Karlson (1994) already showed that Haptophyta were not abundant in the Skagerrak (station 21) in July (less than  $200 \text{ cell mL}^{-1}$ ). For larger eukaryotes, dinoflagellates, principally *Ceratium* sp. and *Prorocentrum* sp., dominated over diatoms with the occurrence of the maximum abundance of dinoflagellates at station 21.

At station 22, *M. pusilla* was detected and contributed for 8 % of pico-eukaryotes, probably due to the occurrence of well mixed water at this station (Foulon et al., 2008). At this coastal station, contributions of Haptophyta were relatively low (less than 30 %) (Thomsen et al., 1994; Not et al., 2005, 2008). For larger eukaryotes, dinoflagellates still dominated over diatoms despite the well mixed water with the occurrence of a bloom of *Ceratium* sp. (Fig. 2E and 5).

#### 4.4. Phytoplankton biomass

In oligotrophic waters, phytoplankton biomass and production are dominated by picoplankton principally because its small size (high surface:volume ratio) provides a competitive advantage in nutrients-impoverished regenerating systems (Chisholm, 1992). This advantage disappears in rich-nutrient waters where growth of large cells is promoted (Kiørboe, 1993). That was we observed in the present study with a dominance of eukaryotes larger than  $2 \mu\text{m}$ , eukaryotes smaller than  $2 \mu\text{m}$  accounting for less than 10 % of total eukaryotic biomass (Fig.8). However, comparison between integrated chlorophyll data (obtained *in situ* during the cruise) and integrated biomass calculated from microscopic measurements showed that an underestimation occurred, in particular at station 16 (Fig. 9). This is probably due to the prefiltration on  $200 \mu\text{m}$  realized on samples analyzed by epifluorescence microscopy which did not allow the count of phytoplankton larger than  $200 \mu\text{m}$  as *Ceratium* sp. and chain-forming diatoms (*Chaetoceros* sp. and *Guinardia* sp.) present in most stations (Table 5).

## Acknowledgements

We like to express special thanks to Captain J. Ellen and the crew of the R/V Pelagia and the technical assistance of DZT (J-W. Schmelling). We thank the NIOZ-Marine Research Facilities (MRF), NIOZ-Marine Technology (MT) and NIOZ-Data Management (DM) for on-shore and onboard support. The cruise was supported by the Research Council for Earth and Life Sciences (ALW) with financial aid from the Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO). S. Masquelier was supported by a doctoral fellowship (BFR05/027) from the “Ministère de la Culture, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche » of Luxembourg. F. Jouenne was supported by the Plankton\*Net EU project.

## References

- Amann, R., 1995. *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Mol. Microbiol. Ecol.* 3, 1-15
- Andersen, R. A., Bidigare, R. R., Keller, M. D., Latasa, M., 1996. A comparison of HPLC pigment signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the North Atlantic and Pacific Oceans. *Deep - Sea Res. Part II* 43, 517-537
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., Thingstad, F., 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257-263
- Beardsley, C., Knittel, K., Amann, R., Pernthaler, J., 2005. Quantification and distinction of aplastidic and plastidic marine nanoplankton by fluorescence *in situ* hybridization. *Aquat. Microbial Ecol.* 41, 163-169
- Beaugrand-Gregory, e., Edwards-Martin, e., John-Anthony, e., Lindley-Alistair, e. C. A. C.-P.-R.-S.-T. U. K., 2004. Continuous Plankton records: Plankton Atlas of the North Atlantic Ocean (1958-1999). II. Biogeographical charts. . *Mar. Ecol. Prog. Ser. (SUP)*, 11-75
- Brandt, S. M., Sleigh, M. A., 2000. The quantitative occurrence of different taxa of heterotrophic flagellates in Southampton Water, U.K. *Est. Coast. Shelf. Sci.* 51, 91-102
- Brunet, C., Lizon, F., 2003. Tidal and diel periodicities of size-fractionated phytoplankton pigment signatures at an offshore station in the southeastern English Channel. *Est. Coast. Shelf. Sci.* 56, 833-843
- Campbell, L., Liu, H. B., Nolla, H. A., Vault, D., 1997. Annual variability of phytoplankton and bacteria in the subtropical North Pacific Ocean at Station ALOHA during the 1991-1994 ENSO event. *Deep-Sea Res. Part I* 44, 167-192
- Caron, D. A., Peele, E. R., Lim, E. L., Dennett, M. R., 1999. Picoplankton and nanoplankton and their trophic coupling in surface waters of the Sargasso Sea south of Bermuda. *Limnol. Oceanogr.* 44, 259-272
- Chisholm, S. W., 1992. Phytoplankton size. In: Falkowski PG, Woodhead AD (ed) *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. Plenum Press, New York, p 213-237

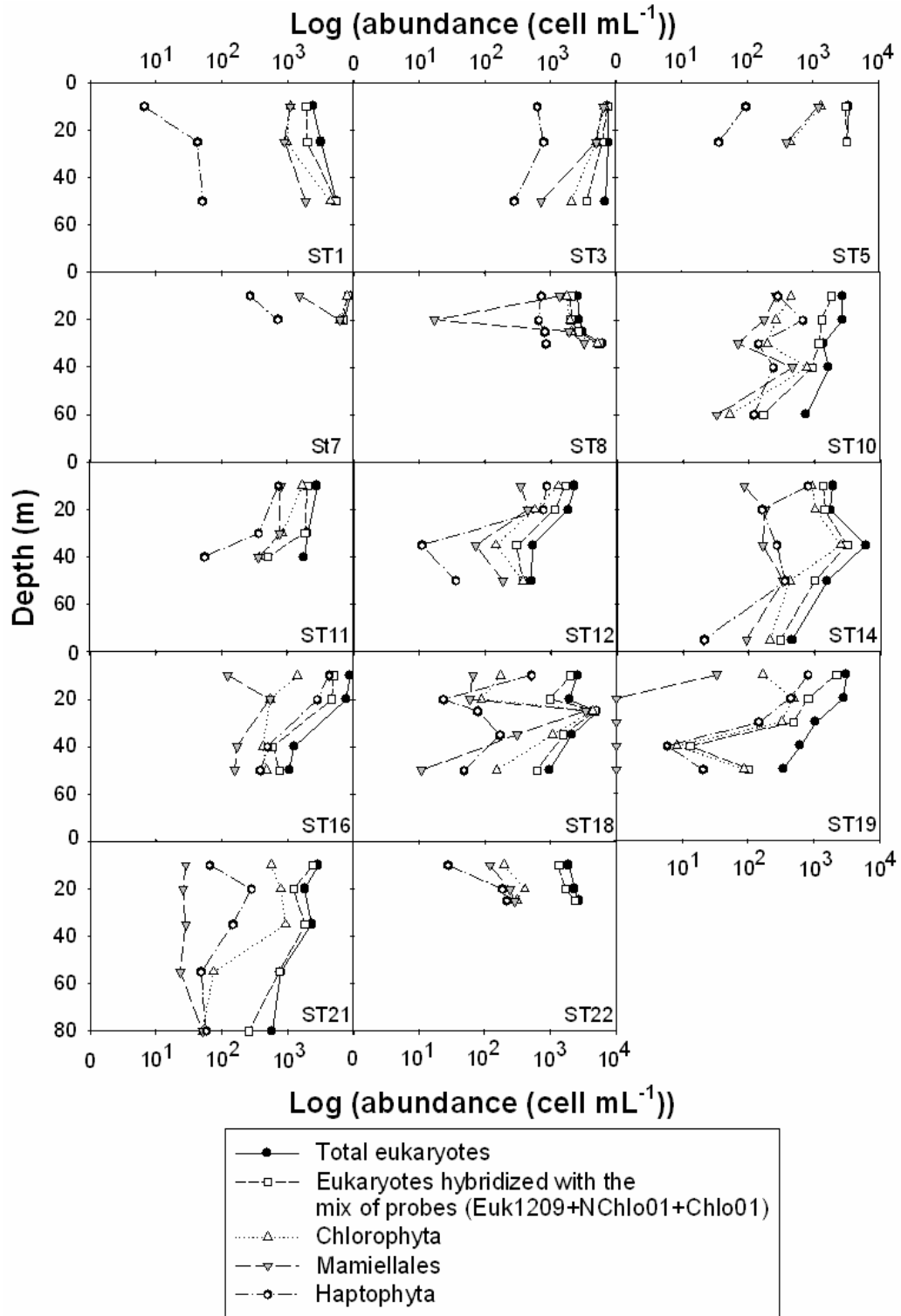
- Christaki, U., Courties, C., Karayanni, H., Giannakourou, A., Maravelias, C., Kormas, K. A., Lebaron, P., 2002. Dynamic characteristics of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* consumption by bacterivorous nanoflagellates. *Microbial Ecol.* 43, 341-352
- Cloern, J. E., Dufford, R., 2005. Phytoplankton community ecology: principles applied in San Francisco Bay. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 285, 11-28
- Dodge, J. D., 1982. *Marine dinoflagellates of the British Isles*, Vol, London
- Druzhkov, N. V., Druzhkova, E. I., 2000. The dynamics of the nanophytoplankton community in the coastal ecosystem of the Southern Bight (North Sea) during the winter-spring period. *J. Sea Res.* 43, 105-111
- Fenchel, T., 1982. Ecology of heterotrophic microflagellates. II. Bioenergetics and growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 8, 225-231
- Foulon, E., Not, F., Jalabert, F., Cariou, T., Massana, R., Simon, N., 2008. Ecological niche partitioning in the picoplanktonic green alga *Micromonas pusilla*: evidence from environmental surveys using phylogenetic probes. *Environ. Microbiol.* 10, 2433-2443
- Gieskes, W. W. C., Leterme, S. C., Peletier, H., Edwards, M., Reid, P. C., 2007. *Phaeocystis* colony distribution in the North Atlantic Ocean since 1948, and interpretation of long-term changes in the *Phaeocystis* hotspot in the North Sea. *Biogeochemistry* 83, 49-60
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., Pace, N. R., 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells [published erratum appears in *J. Bacteriol.* 170, 2418 (1988)]. *J. Bact.* 170, 720-726
- Hagström, Azam, F., Andersson, A., Wikner, J., Rassoulzadegan, F., 1988. Microbial loop in an oligotrophic pelagic marine ecosystem: possible roles of cyanobacteria and nanoflagellates in the organic fluxes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 49, 171-178
- Hillebrand, H., Durselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35, 403-424
- Iriarte, A., Purdie, D. A., 1994. Size distribution of chlorophyll *a* biomass and primary production in a temperate estuary (Southampton Water): the contribution of photosynthetic picoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 115, 283-297
- Kjørboe, T., 1993. Turbulence, phytoplankton cell size, and the structure of pelagic food webs. *Adv. Mar. Biol.* 29, 1-72
- Kuylenstierna, M., Karlson, B., 1994. Seasonality and composition of pico- and nanoplanktonic cyanobacteria and protists in the Skagerrak. *Bot. Mar.* 37, 17-33
- Lim, E. L., Amaral, L. A., Caron, D. A., DeLong, E. F., 1993. Application of rRNA-based probes for observing nanoplanktonic protists. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1647-1655
- Masquelier, S., Vaultot, D., 2008. Distribution of micro-organisms along a transect in the South-East Pacific Ocean (BIOSOPE cruise) using epifluorescence microscopy. *Biogeosciences* 5, 311-321
- McQuatters-Gollop, A., Raitos, D. E., Edwards, M., Attrill, M. J., 2007. Spatial patterns of diatom and dinoflagellate seasonal cycles in the NE Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 339, 301-306
- Medlin, L. K., Metfies, K., Mehl, H., Wiltshire, K., Valentin, K., 2006. Picoeukaryotic plankton diversity at the Helgoland time series site as assessed by three molecular methods. *Microbial Ecol.* 52, 53-71
- Menden-Deuer, S., Lessard, E. J., 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnol. Oceanogr.* 45, 569-579
- Millan Nunez, E., Sieracki, M. E., Millan Nunez, R., Lara Lara, J. R., Gaxiola Castro, G., Trees, C. C., 2004. Specific absorption coefficient and phytoplankton biomass in the southern region of the California Current. *Deep - Sea Res. Part II* 51, 817-826



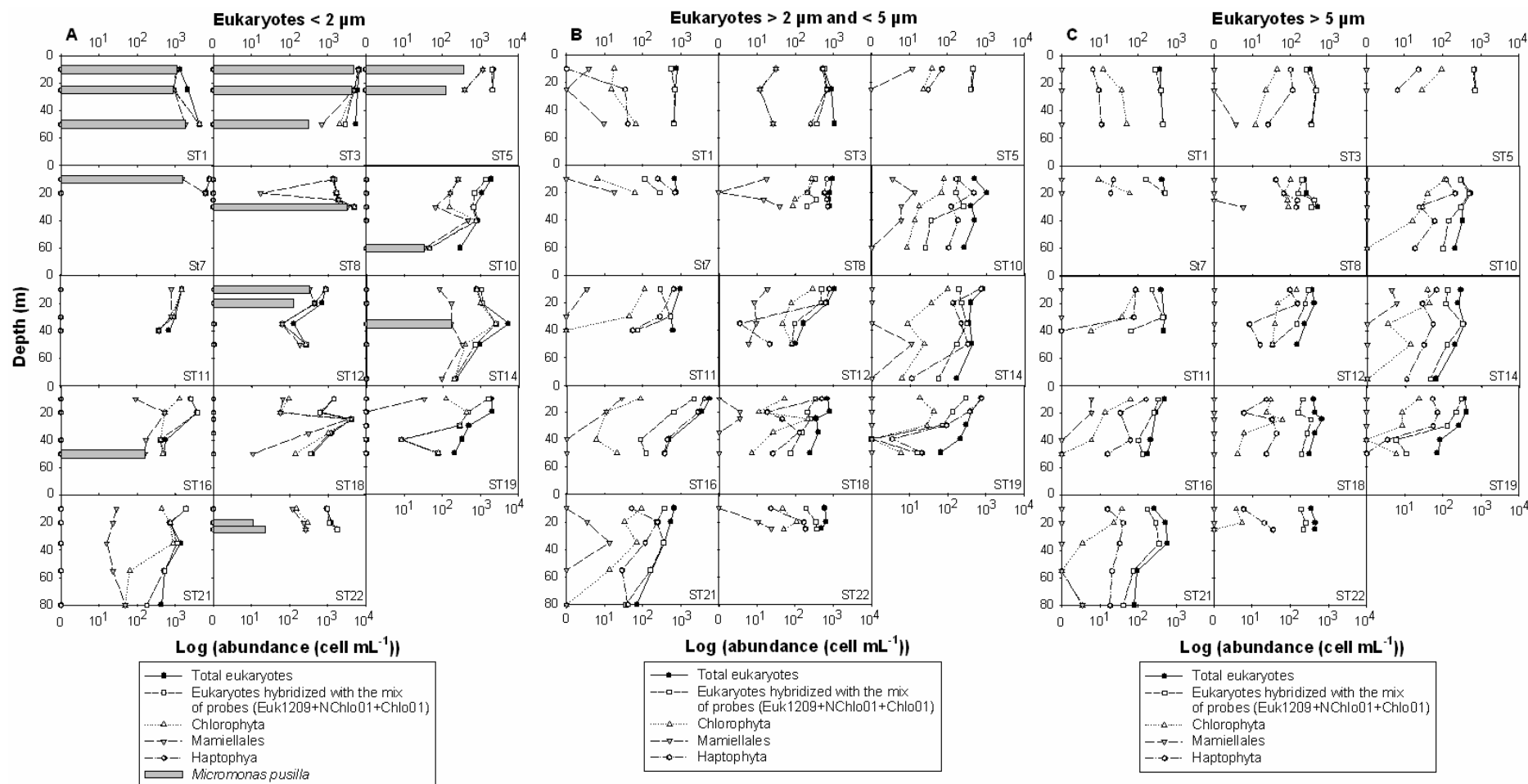
- Moon-van der Staay, S. Y., Van Der Staay, G. W. M., Guillou, L., Vaultot, D., Claustre, H., Medlin, L. K., 2000. Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnol. Oceanogr.* 45, 98-109
- Nejstgaard, J. C., Tang, K. W., Steinke, M., Dutz, J., Koski, M., Antajan, E., Long, J. D., 2007. Zooplankton grazing on *Phaeocystis*: a quantitative review and future challenges. "Phaeocystis", major link in the biogeochemical cycling of climate-relevant elements. *Biogeochemistry Dordrecht* 83, 147-172
- Not, F., Latasa, M., Marie, D., Cariou, T., Vaultot, D., Simon, N., 2004. A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the Western English Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4064-4072
- Not, F., Latasa, M., Scharek, R., Viprey, M., Karleskind, P., Balague, V., Ontoria-Oviedo, I., Cumino, A., Goetze, E., Vaultot, D., Massana, R., 2008. Protistan assemblages across the Indian Ocean, with a specific emphasis on the picoeukaryotes. *Deep-Sea Res. Part I* 55, 1456-1473
- Not, F., Massana, R., Latasa, M., Marie, D., Colson, C., Eikrem, W., Pedros-Alio, C., Vaultot, D., Simon, N., 2005. Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1677-1686
- Not, F., Simon, N., Biegala, I. C., Vaultot, D., 2002. Application of fluorescent *in situ* hybridization coupled with tyramide signal amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. *Aquat. Microbial Ecol.* 28, 157-166
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W. G., Peplies, J., Glockner, F. O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35, 7188-7196
- Reckermann, M., Veldhuis, M. J. W., 1997. Trophic interactions between picophytoplankton and micro- and nanozooplankton in the western Arabian Sea during the NE monsoon 1993. *Aquat. Microbial Ecol.* 12, 263-273
- Reid, P. C., Lancelot, C., Gieskes, W. W. C., Hagmeier, E., Weichart, G., 1990. Phytoplankton of the North Sea and its dynamics: a review. *Neth. J. Sea Res.* 26, 295-331
- Reid, P. C., Taylor, A. H., Stephens, J. A., 1988. The hydrography and hydrographic balances of the North Sea. In: Salomons W, Blayne BL, Duursma EK, Förstner U (eds) *Pollution of the North Sea: an Assessment*. Springer Verlag
- Riegman, R., Kraay, G. W., 2001. Phytoplankton community structure derived from HPLC analysis of pigments in the Faroe-Shetland Channel during summer 1999: The distribution of taxonomic groups in relation to physical/chemical conditions in the photic zone. *J. Plankton Res.* 23, 191-205
- Romari, K., Vaultot, D., 2004. Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. *Limnol. Oceanogr.* 49, 784-798
- Shapiro, L. P., Haugen, E. M., Carpenter, E. J., 1989. Occurrence and abundance of green-fluorescing dinoflagellates in surface waters of the Northwest Atlantic and Northeast Pacific oceans. *J. Phycol.* 25, 189-191
- Sieburth, J. M., Smetacek, V., Lenz, J., 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 23, 1256-1263

- Simon, N., Campbell, L., Ornlófsdóttir, E., Groben, R., Guillou, L., Lange, M., Medlin, L. K., 2000. Oligonucleotide probes for the identification of three algal groups by dot blot and fluorescent whole-cell hybridization. *J. Euk. Microbiol.* 47, 76-84
- Simon, N., LeBot, N., Marie, D., Partensky, F., Vaultot, D., 1995. Fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2506-2513
- Smayda, T. J., Reynolds, C. S., 2001. Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. *J. Plankton Res.* 23, 447-461
- Thomsen, H. A., Buck, K. R., Chavez, F. P., 1994. Haptophytes as components of marine phytoplankton. In: Green JC, Leadbeater BSC (eds) *The Haptophyte Algae Vol 51. Systematics Association Special*, Clarendon Press, Oxford, p 187-208
- Thronsen, J., 1976. Occurrence and productivity of small marine flagellates. *Norw. J. Bot.* 23,
- Tomas, C. R., 1997. *Identifying Marine Phytoplankton.*, Vol. Academic Press, San Diego, US
- Van Duyl, F. C., Bak, R. P. M., Kop, A. J., Nieuwland, G., 1990. Bacteria, auto- and heterotrophic nanoflagellates, and their relations in mixed, frontal and stratified waters of the North Sea. *Neth. J. Sea Res.* 26, 97-109
- Vaultot, D., Eikrem, W., Viprey, M., Moreau, H., 2008. The diversity of small eukaryotic phytoplankton (< 3 µm) in marine ecosystems. *FEMS. Microbiol. Ecol.*, 1-26
- Veldhuis, M. J. W., Timmermans, K. R., Croot, P., van der Wagt, B., 2005. Picophytoplankton; a comparative study of their biochemical composition and photosynthetic properties. *J. Sea Res.* 53, 7-24
- Verity, P. G., Robertson, C. Y., Tronzo, C. R., Andrews, M. G., Nelson, J. R., Sieracki, M. E., 1992. Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 37, 1434-1446
- Zingone, A., Sarno, D., Forlani, G., 1999. Seasonal dynamics in the abundance of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) and its viruses in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *J. Plankton Res.* 21, 2143-2159

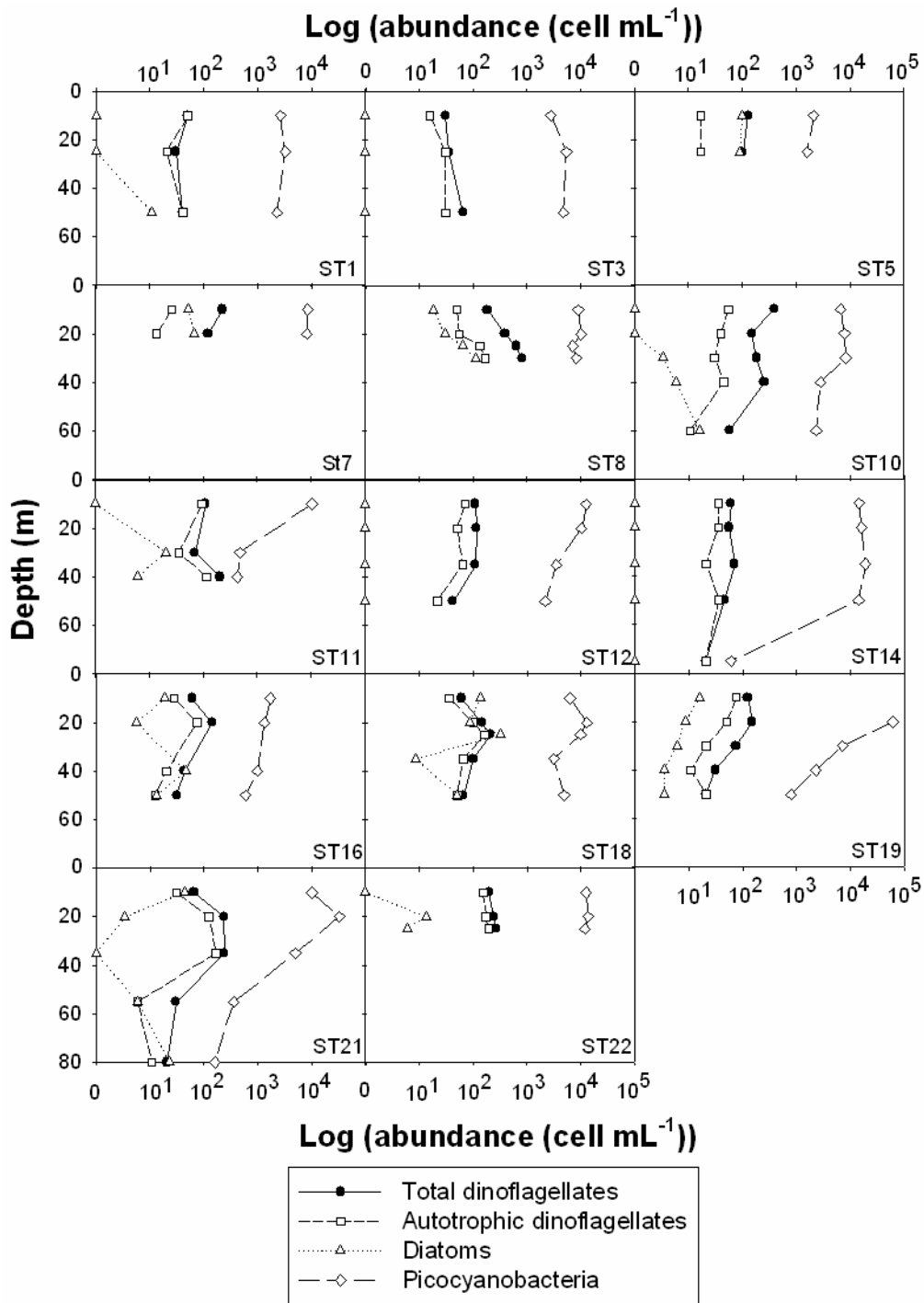
# **SUPPLEMENTARY DATA**



**Fig. S1.** Vertical profiles of abundance (log (cell mL<sup>-1</sup>)) of total eukaryotes (●), eukaryotes hybridized with the mix of probes (Euk1209+NChlo01+Chlo01) (□), Chlorophyta (△), Mamiellales (▽), and Haptophyta (○).



**Fig. S2.** Vertical profiles of abundance (log (cell mL<sup>-1</sup>)) of total eukaryotes (●), eukaryotes hybridized with the mix of probes (Euk1209+NChlo01+Chlo01) (□), Chlorophyta (Δ), Mamiellales (▽), Haptophyta (○) and *Micromonas pusilla* (grey histogram) for eukaryotes smaller than 2 μm (A), eukaryotes between 2 μm and 5 μm (B) and eukaryotes larger than 5 μm (C).



**Fig. S3.** Vertical profiles of abundance (log (cell mL<sup>-1</sup>)) of total dinoflagellates (●), autotrophic dinoflagellates (□), diatoms (Δ), and picocyanobacteria (◇).

# CHAPITRE IV

**Distribution des micro-organismes  
le long d'un transect dans le  
Pacifique Sud-Est  
(campagne BIOSOPE)**

#### IV. 1 Résumé en français

La distribution de groupes sélectionnés de micro-organismes a été analysée le long d'un transect du Pacifique Sud-Est échantillonné durant la campagne BIOSOPE en 2004. Le transect pourrait être divisé en quatre régions de statu trophique contrasté : une région riche en nutriments et pauvre en chlorophylle (HNLC, mésotrophe) près de l'équateur, le gyre (hyper-oligotrophe) de l'Océan Pacifique Sud-Est, une région de transition entre le gyre et la côte sud-américaine (modérément oligotrophe), et l'upwelling du Chili (eutrophe). L'abondance des picocyanobactéries contenant de la phycoérythrine (PE picocyanobactéries), des eucaryotes autotrophes et hétérotrophes (classifiés en différentes gammes de tailles), des dinoflagellés et ciliés a été déterminée par microscopie à épifluorescence après marquage au DAPI. Malgré des pertes apparentes de cellules dues à la conservation des échantillons, les profils de distribution étaient globalement similaires à ceux obtenus par cytométrie en flux pour les PE picocyanobactéries et les picoeucaryotes. Toutes les populations atteignaient un maximum dans l'upwelling du Chili et un minimum près du centre du gyre. L'abondance maximum des PE picocyanobactéries était de  $70 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$ . L'abondance des eucaryotes autotrophes et des dinoflagellés atteignaient  $24,5 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$  et  $20 \text{ cell mL}^{-1}$ , respectivement. Nous avons observé un changement dans la distribution des tailles des eucaryotes autotrophes entre  $2 \mu\text{m}$  et  $5 \mu\text{m}$  dans les régions eutrophes et mésotrophes à ceux inférieurs  $2 \mu\text{m}$  dans la région centrale. La contribution des eucaryotes autotrophes par rapport aux eucaryotes totaux était la plus faible dans le gyre central. La concentration maximum des ciliés ( $18 \text{ cell mL}^{-1}$ ) a également été observée dans l'upwelling du Chili, mais, contrairement aux autres groupes, leur abondance était très faible dans la zone HNLC et près des Iles Marquises. Deux éléments clés de ce travail qui n'auraient pas pu être observés avec d'autres techniques, sont le pourcentage élevé de PE picocyanobactéries formant des colonies dans la région HNLC et l'observation d'un grand nombre de dinoflagellés émettant une intense fluorescence verte.



## Distribution of micro-organisms along a transect in the South-East Pacific Ocean (BIO SOPE cruise) using epifluorescence microscopy

S. Masquelier and D. Vaultot

Station Biologique de Roscoff, UMR 7144, CNRS et Université Pierre et Marie Curie, Place G. Tessier, 29682, Roscoff, France

Received: 6 July 2007 – Published in Biogeosciences Discuss.: 7 August 2007

Revised: 18 January 2008 – Accepted: 1 February 2008 – Published: 4 March 2008

**Abstract.** The distribution of selected groups of micro-organisms was analyzed along a South-East Pacific Ocean transect sampled during the BIO SOPE cruise in 2004. The transect could be divided into four regions of contrasted trophic status: a High Nutrient Low Chlorophyll (HNLC) region (mesotrophic) near the equator, the South-East Pacific Ocean gyre (hyper-oligotrophic), a transition region between the gyre and the coast of South America (moderately oligotrophic), and the Chile upwelling (eutrophic). The abundance of phycoerythrin containing picocyanobacteria (PE picocyanobacteria), autotrophic and heterotrophic eukaryotes (classified into different size ranges), dinoflagellates, and ciliates was determined by epifluorescence microscopy after DAPI staining. Despite some apparent loss of cells due to sample storage, distribution patterns were broadly similar to those obtained by flow cytometry for PE picocyanobacteria and picoeukaryotes. All populations reached a maximum in the Chile upwelling and a minimum near the centre of the gyre. The maximum abundance of PE picocyanobacteria was  $70 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$ . Abundance of autotrophic eukaryotes and dinoflagellates reached  $24.5 \times 10^3$  and  $20 \text{ cell mL}^{-1}$ , respectively. We observed a shift in the size distribution of autotrophic eukaryotes from 2–5  $\mu\text{m}$  in eutrophic and mesotrophic regions to less than 2  $\mu\text{m}$  in the central region. The contribution of autotrophic eukaryotes to total eukaryotes was the lowest in the central gyre. Maximum concentration of ciliates ( $18 \text{ cell mL}^{-1}$ ) also occurred in the Chile upwelling, but, in contrast to the other groups, their abundance was very low in the HNLC zone and near the Marquesas Islands. Two key findings of this work that could not have been observed with other techniques are the high percentage of PE picocyanobacteria forming colonies in the HNLC region and the observation of numerous dinoflagellates with bright green autofluorescence.

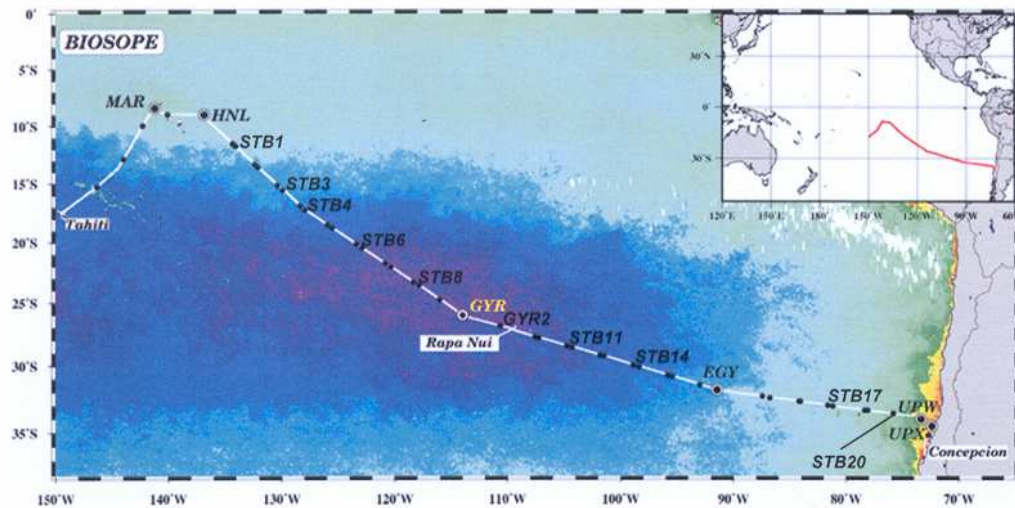
### 1 Introduction

Unicellular picoplanktonic prokaryotes and eukaryotes less than 2  $\mu\text{m}$  in size (Sieburth et al., 1978) are found in marine ecosystems at concentrations ranging from  $10^2$  to  $10^5$  and  $10^2$  to  $10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ , respectively. They play a fundamental role (Azam et al., 1983; Sherr and Sherr, 2000), in particular, in oligotrophic waters (Hagström et al., 1988; Marañón et al., 2001) where their small size associated to the reduced diffusion boundary layer and large surface area per unit volume are an advantage to acquire nutrients (Raven, 1998). The photosynthetic component of picoplankton, i.e. *Prochlorococcus* and *Synechococcus* cyanobacteria and picoeukaryotic algae, are important contributors to the microbial community of the euphotic zone in many marine environments (Mackey et al., 2002; Pérez et al., 2006). Heterotrophic protists play a pivotal role in mediating organic flux to higher trophic levels in pelagic ecosystems (Azam et al., 1983; Fenchel, 1982; Hagström et al., 1988). Among the heterotrophic protists, ciliates and dinoflagellates are important grazers of picoplankton (Christaki et al., 2002).

In the Pacific Ocean, picoplankton has been analyzed both in the Equatorial region and the North gyre (e.g. Campbell et al., 1997; Mackey et al., 2002) but not in the South gyre. The latter is the most oligotrophic environment of the world oceans based on SeaWiFS imagery which provides estimates of average surface chlorophyll *a* concentrations down to  $0.02 \text{ mg m}^{-3}$  (Morel et al., 2007). The BIO SOPE (Biogeochemistry and Optics South Pacific Experiment) cruise explored this region sailing from the Marquesas Islands to the coast of Chile. Along this transect, a gradient in trophic conditions was encountered, from hyper-oligotrophic (gyre) to very eutrophic waters (Chile upwelling). The present study relied on epifluorescence microscopy to assess the distribution in this region of phycoerythrin containing picocyanobacteria (called PE picocyanobacteria throughout the paper), autotrophic and heterotrophic eukaryotes (in particular dinoflagellates and ciliates). In contrast to faster



Correspondence to: D. Vaultot  
(vaultot@sb-roscoff.fr)



**Fig. 1.** Map of the BIOSOPE cruise track superimposed on a SeaWiFS ocean colour composite, dark purple indicating extremely low values ( $0.018 \text{ mg m}^{-3}$ ) of total chlorophyll *a*. Figure modified from Claustre et al. (2007). Stations analyzed by DAPI staining are labelled.

**Table 1.** Concentrations of the different populations enumerated in the present study. Values are averages for the six depths sampled at each station.

Station	Latitude-Longitude	Picocyanobacteria containing phycoerythrin $\text{mL}^{-1}$	Total eukaryotes $\text{mL}^{-1}$	Autotrophic eukaryotes $\text{mL}^{-1}$	Heterotrophic eukaryotes $\text{mL}^{-1}$	Total dinoflagellates $\text{mL}^{-1}$	Autotrophic dinoflagellates $\text{mL}^{-1}$	Heterotrophic dinoflagellates $\text{mL}^{-1}$	Green dinoflagellates $\text{mL}^{-1}$	Total ciliates $\text{mL}^{-1}$
MAR1	08°23 S–141°14 W	3486	1520	1292	228	105	56	48	4.6	<1.5
HLN1	09°00 S–136°51 W	2818	2312	1836	476	93	61	32	4.2	3
STB1	11°44 S–134°06 W	1612	1895	1165	730	111	62	50	4.5	1.5
STB3	15°00 S–129°55 W	413	1423	737	686	59	28	31	4.2	3.5
STB4	17°13 S–127°58 W	374	1267	736	531	57	26	32	7.0	1.5
STB6	20°26 S–122°54 W	6	1413	726	687	37	19	17	2.2	1.5
STB8	23°32 S–117°52 W	37	937	521	416	31	12	19	3.5	4.5
GYR2	25°58 S–114°00 W	46	806	541	265	43	21	22	3.5	1.5
STB11	27°45 S–107°16 W	34	1050	526	525	31	10	21	6.5	<1.5
STB14	30°02 S–98°23 W	142	1314	854	460	55	22	33	8.5	4.2
EGY2	31°50 S–91°27 W	1734	3083	2481	602	82	47	35	6.5	1.9
STB17	32°23 S–86°47 W	1104	2607	2086	521	94	46	48	12	5.2
STB20	33°21 S–78°06 W	10726	1760	1195	566	92	44	48	6.7	3
UPW1	34°01 S–73°21 W	40548	3396	2526	870	122	63	59	15	10
UPX2	34°37 S–72°27 W	18548	14088	12211	1877	151	47	104	38	6.6

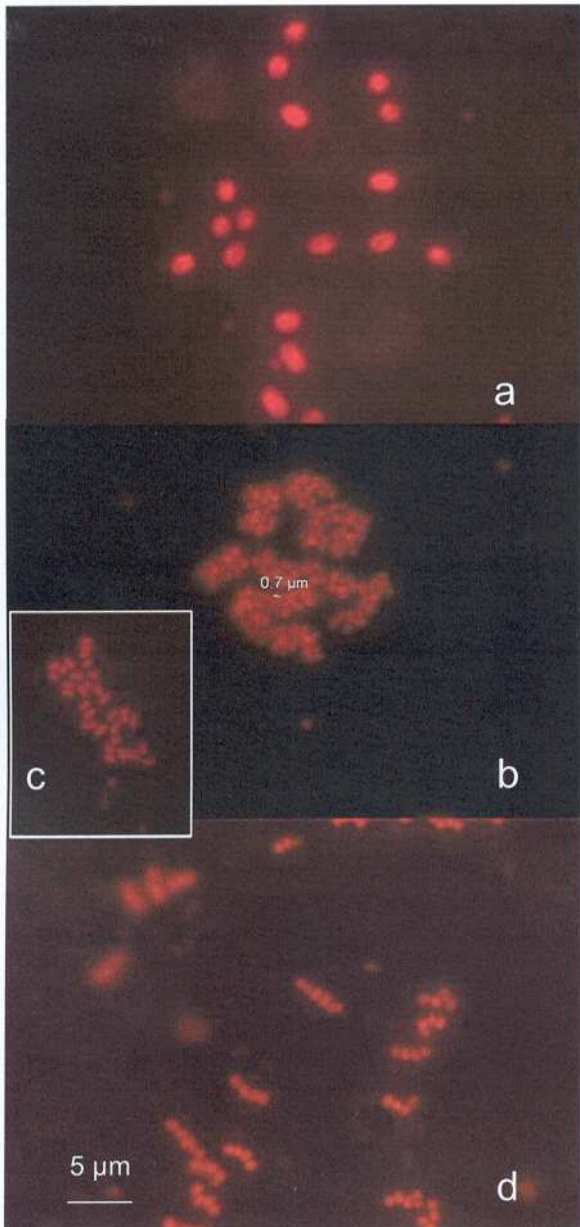
enumeration techniques such as flow cytometry, epifluorescence microscopy allows (1) to discriminate specific group of organisms such as dinoflagellates, (2) to recognize cell organization such as colonies, and (3) to regroup organisms into size classes. We attempted to relate the distribution of the different types of organisms to oceanographic conditions.

## 2 Material and methods

### 2.1 Oceanographic context

The BIOSOPE cruise took place on board the French NO "l'Atalante" in the South-East Pacific Ocean from 26th October to 11th December 2004 (Fig. 1). The transect inves-

tigated extended from the Marquesas Islands (South Pacific Tropical Waters; SPTW) to the coast of Chile, through the Eastern South Pacific Central Waters (ESPCW) which include the centre of the Pacific gyre (Claustre et al., 2008). The transect can be divided into four contrasted trophic zones (from West to East): a High Nutrient Low Chlorophyll (HNLC) zone (mesotrophic) near the equator, the South-East Pacific gyre (hyper-oligotrophic) proper, the transition zone between the gyre and the coastal region (moderately oligotrophic), and the Chile upwelling (very eutrophic). In the hyper oligotrophic zone, nitrate concentrations were nearly undetectable between the surface and 150–200m and remained very low ( $\sim 2.5 \mu\text{M}$ ) below this depth (Fig. 2 in Raimbault et al., 2007). Nitrate concentrations were higher in the HNLC zone and maximum in the Chile upwelling

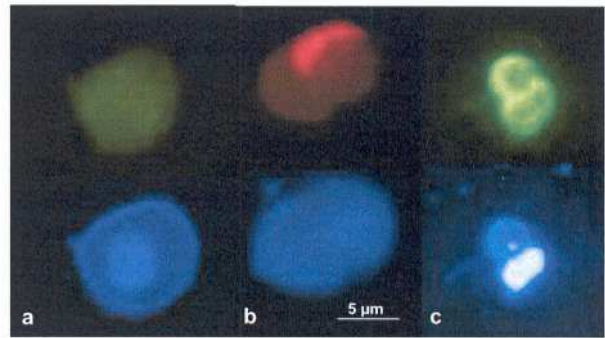


**Fig. 2.** Pictures of single (a), and colonial PE picocyanobacteria (b–d). Colony of more than 100 cells (b). Colony of 20–30 cells (c). Chain forming cells (d). Pictures taken under green light excitation on samples of stations MAR1 at 80 m (a), MAR1 at 40 m (b), HNLI at 60 m (c), and STB3 at 60 m (d).

(Fig. 2 in Raimbault et al., 2007). Phosphate was apparently never a limiting factor (Fig. 2 in Raimbault et al., 2007).

## 2.2 DAPI staining and epifluorescence microscopy

Fifteen stations (Fig. 1 and Table 1) were sampled at six depths with a conductivity-temperature-depth (CTD) rosette

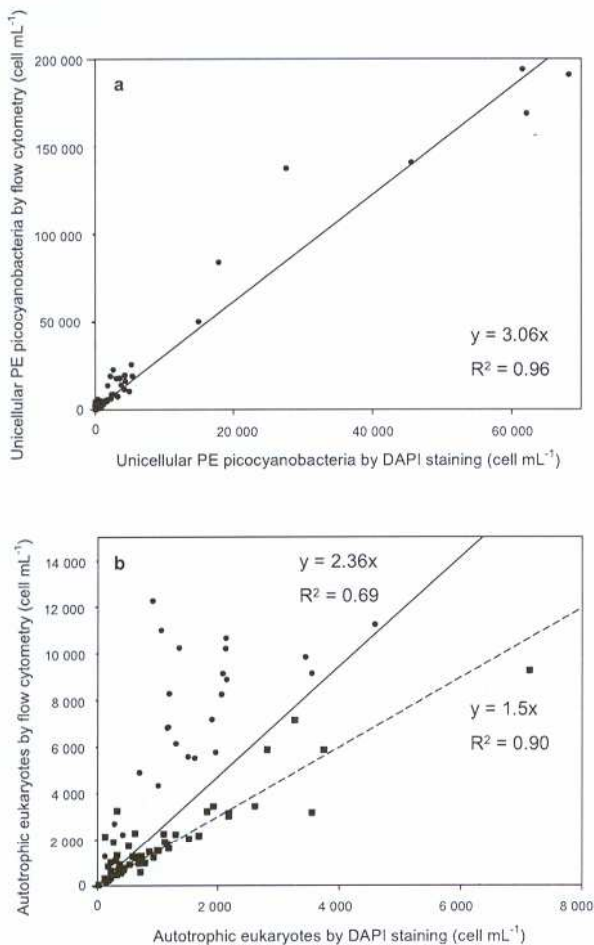


**Fig. 3.** Heterotrophic (a), autotrophic (b), and green fluorescing dinoflagellates (c) observed under blue light excitation (top) and UV light excitation (bottom). Pictures taken at stations STB3 (20 m), UPW and STB7 (5 m), respectively.

system equipped with 12 L Niskin bottles. In general, two samples were collected in the surface layer, three around the chlorophyll maximum and one below. Water was pre-filtered through a 200 µm mesh to remove zooplankton, large phytoplankton, and particles before further filtrations.

Water samples (100 mL) were fixed with glutaraldehyde (0.25% final concentration) and filtered through 0.8 µm pore size filters. This porosity was selected to avoid high densities of bacteria on the filter which would have rendered visualisation of the larger and less dense eukaryotes more difficult. Samples were stained with 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 5 µg mL<sup>-1</sup> final concentration) (Porter and Feig, 1980) and stored at -20°C for a minimum of 12 months before counting. Counts were performed with an Olympus BX51 epifluorescence microscope (Olympus Optical CO, Tokyo, Japan) equipped with a mercury light source and an x100 UVFL objective. Pictures of dinoflagellates were taken on board the ship on the freshly prepared slides using a BH2 Olympus microscope with an x40 objective and a Canon G5 digital camera. Pictures of PE containing picocyanobacteria were taken in the laboratory on the BX51 Olympus microscope with a Spot RT-slider camera (Diagnostics Instruments, Sterling Heights, MI).

*Prochlorococcus* cannot be counted reliably by epifluorescence microscopy because of their small size and rapidly fading fluorescence. Therefore, only isolated and colonial PE picocyanobacteria (Fig. 2) were counted based on the orange fluorescence of phycoerythrin excited under green light (530–550 nm). DAPI staining allowed us to discriminate eukaryotic from prokaryotic organisms. Under UV light (360/420 nm), eukaryotic cell nucleus appeared as a separate blue organelle, while for prokaryotes, no nucleus was visible and cells appeared uniformly stained. The red fluorescence of chlorophyll under blue light (490/515 nm) allowed us to discriminate autotrophic (photosynthetic) from heterotrophic eukaryotes. However, it was not possible to distinguish truly autotrophic organisms from organisms that had ingested



**Fig. 4.** Relationship between abundance ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) measured by flow cytometry (Grob et al., 2007) and estimated by DAPI counting for unicellular PE picocyanobacteria (a), and autotrophic eukaryotes (b). In panel (b) circles correspond to data from surface to 40–60 m depth depending on samples. Squares correspond to data from 40–60 m depth to 300 m depth. (a)  $R^2=0.96$ ,  $n=80$ ; (b) Solid line takes into account all data (circles and squares);  $R^2=0.69$ ,  $n=80$ . Dashed line takes into account only squares;  $R^2=0.90$ ,  $n=56$ .

chlorophyll-containing cells. Ten fields and a minimum of 100 cells were counted per slide. Eukaryotes were classified according to three diameter ranges: (i) smaller than  $2 \mu\text{m}$ , (ii) between  $2 \mu\text{m}$  and  $5 \mu\text{m}$ , (iii) larger than  $5 \mu\text{m}$ . Among eukaryotes larger than  $5 \mu\text{m}$ , ciliates and dinoflagellates were counted separately. Dinoflagellates were discriminated by their shape, their size (between  $5 \mu\text{m}$  and  $100 \mu\text{m}$ ), and the presence of a nucleus with condensed chromatin. Autotrophic and heterotrophic dinoflagellates were discriminated according to the red fluorescence of chlorophyll under blue light of the former (Figs. 3a and b). Among heterotrophic dinoflagellates, some were characterized by an intense green fluorescence under blue light (Fig. 3c), as reported previously (Shapiro et al., 1989), and counted sepa-

rately. Ciliates were discriminated by their shape, their size (between  $20 \mu\text{m}$  and  $100 \mu\text{m}$ ), and the presence of cilia and multiple nuclei. No distinction between different types of ciliates was attempted. Because of their low abundance, 50 fields per slide were counted for dinoflagellates and ciliates such that the minimum concentration detectable was  $1.5 \text{ cell mL}^{-1}$ .

### 2.3 Data representation

Contour maps showing the distributions of the different populations were drawn using the Ocean Data View software (Schlitzer, 2003) with averaging VG gridding length-scales of 100 for both X and Y.

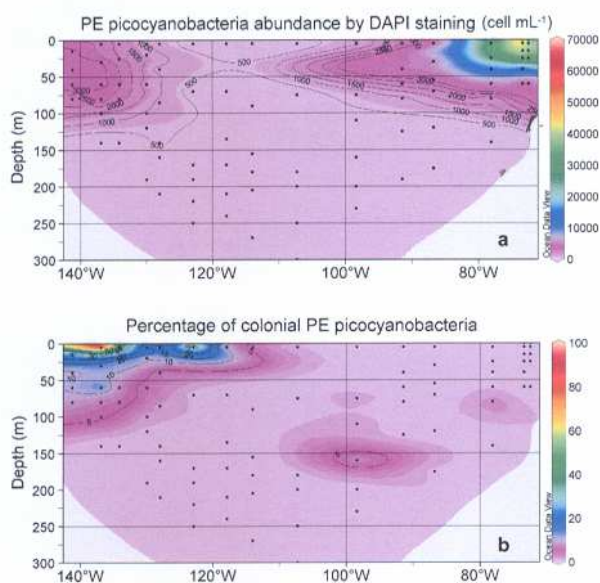
## 3 Results

### 3.1 Comparison between microscopy and flow cytometry

In order to validate our microscopy counts, we compared them to counts of *Synechococcus* cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes done by flow cytometry (Grob et al., 2007) at the same stations (Fig. 4). There was a relatively good correlation between the two methods, such that global distribution trends were identical. However, slopes were significantly larger than one indicating that microscopy was underestimating the actual concentrations. For PE picocyanobacteria ( $R^2=0.96$ ;  $n=80$ ), abundance found by microscopy was 3 times lower than measured by flow cytometry (Fig. 4a). For photosynthetic eukaryotes, the correlation was moderate ( $R^2=0.69$ ;  $n=80$ ) when all the data were considered, although the slope was lower than for cyanobacteria (Fig. 4b). When only data below 40–60 m were included, the correlation was significantly better ( $R^2=0.90$ ;  $n=56$ ) and the slope less pronounced.

### 3.2 PE picocyanobacteria

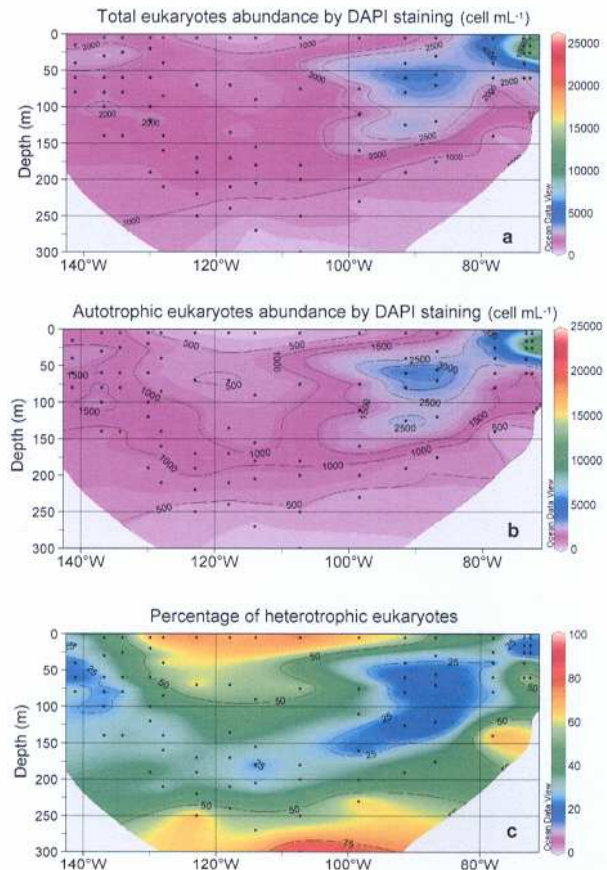
In surface, abundance of PE picocyanobacteria (Fig. 5a) reached a maximum ( $70 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$ ) near the coast of Chile (station UPW1) and a minimum (less than  $500 \text{ cell mL}^{-1}$ ) in the middle of the South-East Pacific gyre. Their abundance increased again near the Marquesas Islands. In the vertical dimension, abundance decreased slightly down to circa 100 m and cells quickly disappeared below (Fig. 5a). Interestingly, a large fraction of the PE picocyanobacteria belonged to colonial forms in the vicinity of the Marquesas Islands and in the HNLC zone (Fig. 5b). In this region, this fraction could reach up to 50% near the surface and 5 to 10% between 25 and 100 m, while it dropped below 5% almost everywhere else. Three types of colony could be observed (Fig. 2): (i) groups of 20–30 cells, (ii) groups of more than 100 cells, (iii) short chains. None of these forms seemed to be preferentially observed in any given region.



**Fig. 5.** Abundance obtained by DAPI counting for unicellular PE picocyanobacteria ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) (a), and percentage of unicellular PE picocyanobacteria in colony (b). Black dots correspond to samples analysed. Contour plots generated with the software Ocean Data View.

### 3.3 Eukaryotes

Maximum abundance of total eukaryotes ( $26 \cdot 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$ ) occurred in the Chile upwelling near the surface (station UPX2, 25 m) and minimum ( $276 \text{ cell mL}^{-1}$ ) in the gyre at depth (station GYR2, 270 m) (Fig. 6a). In the surface layer, abundance was minimal in the center of the gyre and increased both eastward and westward. The maxima of total eukaryotes coincided roughly with the depth of chlorophyll maximum (DCM, see Fig. 3 in Raimbault et al., 2007). Below 200 m, concentrations were always lower than  $1000 \text{ cell mL}^{-1}$ . The distributions of total eukaryotes and autotrophic eukaryotes were very similar with a maximum in the Chile upwelling and a minimum in the surface of the gyre (Fig. 6b). These similar distributions were a mere consequence of the fact that autotrophic eukaryotes were much more abundant than heterotrophic ones around the DCM (Fig. 6c). The size distribution of autotrophic eukaryotes varied dramatically throughout the transect (Figs. 7 and 8): in the surface of the gyre, cells smaller than  $2 \mu\text{m}$  accounted for less than 10% while, they dominated (50–70%) in the DCM of the gyre as well as east of the gyre (Fig. 7a). In the Chile upwelling (station UPX2, 25 m), they accounted for up to 80% of the total eukaryotes. In contrast, their contribution was much lower in the HNLC region where larger eukaryotes between  $2 \mu\text{m}$  and  $5 \mu\text{m}$  accounted for 40% to 60% of the population (Fig. 7b). This size class was also dominant near the surface in the transition zone between the



**Fig. 6.** Abundance obtained by DAPI counting of total eukaryotes ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) (a), autotrophic eukaryotes ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) (b), and percentage of heterotrophic eukaryotes in comparison with total eukaryotes (c). Legend as in Fig. 5.

gyre and the upwelling. Cells larger than  $5 \mu\text{m}$  accounted for less than 10% of autotrophic eukaryotes everywhere along the transect, except near the Marquesas Islands where they contributed slightly more (Fig. 7c).

The relative proportion of heterotrophic eukaryotes was the highest in the 0–50 m layer of the gyre (75–80%), while in the DCM it dropped to 25% (Fig. 6c). In the DCM, cells smaller than  $2 \mu\text{m}$  accounted for 28% (east of the gyre) to 40% (in the gyre) of heterotrophic eukaryotes (Fig. 8). The contribution of cells between  $2 \mu\text{m}$  and  $5 \mu\text{m}$  did not vary much (about 50%) while cells larger than  $5 \mu\text{m}$  accounted for up to 14% of total heterotrophic eukaryotes in the HNLC region and for about 10% elsewhere.

In the 0–100 m layer, dinoflagellate abundance (Fig. 9a) increased towards the HNLC region (maximum observed:  $200 \text{ cell mL}^{-1}$  at station STB1, 25 m) and the Chile upwelling, and decreased towards the gyre (minimum observed:  $10 \text{ cell mL}^{-1}$  at station GYR2, 270 m). In relative terms, autotrophic dinoflagellates dominated around the

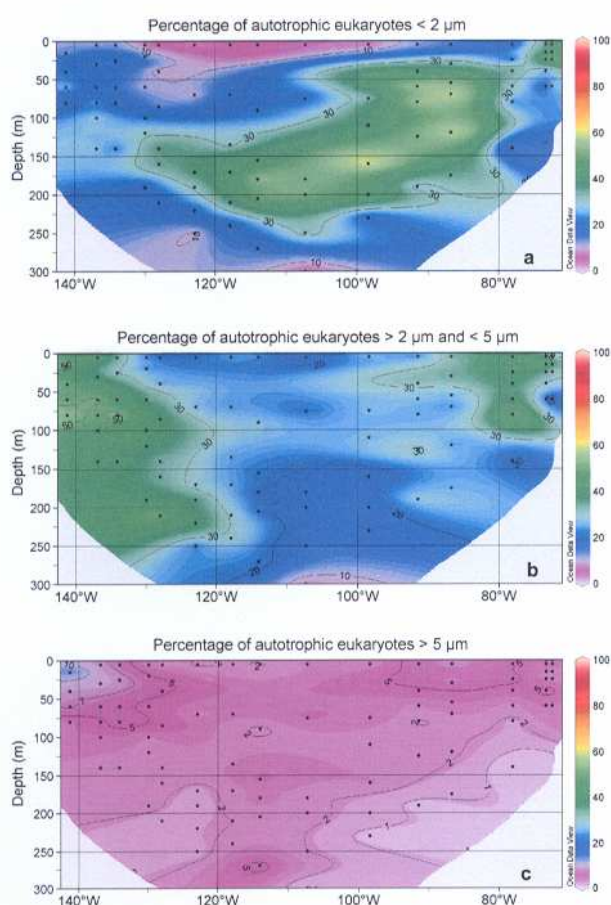


Fig. 7. Fraction of autotrophic eukaryotes smaller than  $2 \mu\text{m}$  (a), between  $2 \mu\text{m}$  and  $5 \mu\text{m}$  (b), and larger than  $5 \mu\text{m}$  (c) in comparison with the total eukaryotes. Legend as in Fig. 5.

Marquesas Islands (up to 80% of total dinoflagellates, at station STB1, 80 m depth) and in the Chile upwelling (70% at station UPW1, 15 m depth) (Fig. 9b). The maximum of percentage of autotrophic dinoflagellates (50%–80%) followed the DCM except at station STB8 where the highest percentage (50%) occurred at 70 m whereas the DCM was found much below at 170 m (Compare Fig. 9b in the present study and Fig. 3 in Raimbault et al., 2007). In the Chile upwelling, the maximum of autotrophic dinoflagellates (50% at station UPX2 in surface and 70% at station UPW1 at 15 m) occurred above the DCM. The percentage of autotrophic dinoflagellates was the lowest (5%–25%) in the surface of the gyre and below 250 m.

Heterotrophic dinoflagellates contribution ranged from 20% to 95% of the total (Fig. 9c) and consisted mostly (75% on average) of cells smaller than  $15 \mu\text{m}$  in size (data not shown). Vertical profiles showed that maximum abundances of heterotrophic dinoflagellates followed the DCM only at some stations in the gyre (STB3, STB6 and STB8, Fig. 10).

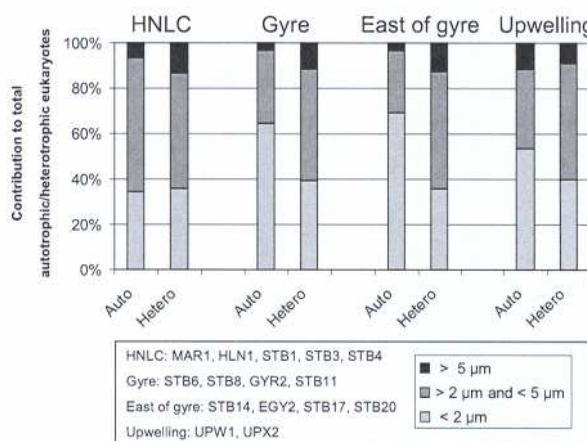


Fig. 8. Contribution of the different size classes to the abundance of autotrophic (Auto) and heterotrophic (Hetero) eukaryotes at the depth of chlorophyll maximum for the HNLC, Gyre, East of gyre and Chile upwelling regions.

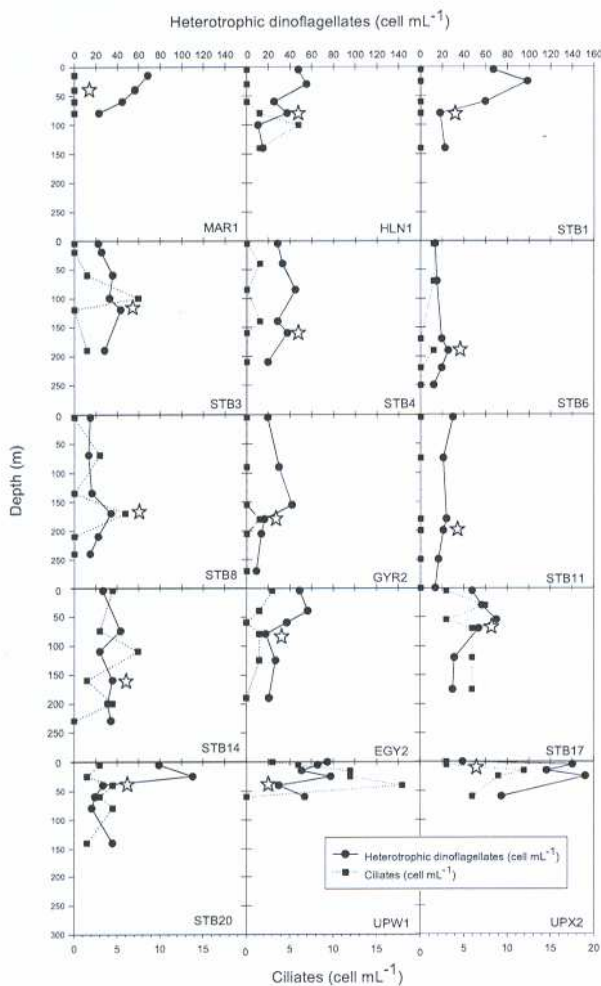
At other stations, the maximum abundance of heterotrophic dinoflagellates was observed above the DCM, except in the upwelling (station UPX2) where the maximum was found below. At station EGY2 (east of gyre), the lowest concentration of heterotrophic dinoflagellates ( $18 \text{ cell mL}^{-1}$ ) occurred in the DCM.

Green fluorescing dinoflagellates (Fig. 3c) accounted for up to 50% of the heterotrophic dinoflagellates in surface east of the gyre and at depth in the Chile upwelling. They accounted for 5 to 25% of heterotrophic dinoflagellates in the HNLC zone and in surface in the Chile upwelling (Fig. 9d).

Ciliate abundance reached a maximum ( $18 \text{ cell mL}^{-1}$ ) in the Chile upwelling (station UPW1, 40 m depth) and a minimum in the HNLC region (Fig. 11). Abundance increased towards the Chile upwelling and decreased towards the gyre as for most other groups. However, in contrast to most other groups, ciliates also remained quite low towards the HNLC zone and the Marquesas Islands. Vertically, at many stations, ciliate maxima corresponded to dinoflagellate minima (Fig. 10).

#### 4 Discussion

Differences between abundances estimated by microscopy vs. flow cytometry observed in this study could be due to several reasons. First, some cells smaller than  $0.8 \mu\text{m}$  (e.g. some *Synechococcus*) could have passed through the  $0.8 \mu\text{m}$  filter used here. The loss of eukaryotic cells is however likely to be negligible since the smallest known eukaryote *Ostreococcus tauri* has a size of  $0.8 \mu\text{m}$  (Courties et al., 1994). Furthermore, according to Sherr et al. (2005), 16% of *Synechococcus* and only 2% of picoeukaryote cells may pass through a  $1 \mu\text{m}$  filter. This may explain why the slope in the Fig. 4 is



**Fig. 10.** Vertical profiles of concentration ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) of total heterotrophic dinoflagellates (solid line) and ciliates (dotted line). Stars indicate the depth of chlorophyll maximum.

to ciliates ratio. Indeed, cells forming colonies could take advantage of the positive aspects of increased size, in particular lower grazing pressure, without paying the full cost of decreased metabolism and reduced growth which is associated with large individual cell size (Nielsen, 2006). In the light of our observations, it could be interesting to extend counts of colonial picocyanobacteria to other oceanic regions in order to better understand how this fraction varies with oceanographic conditions.

The present study is consistent with estimates by Ras et al. (2007) based on HPLC pigment data and assumptions concerning the size range of different taxonomic groups (Claustre, 1994; Vidussi et al., 2001). They found that the contribution of picophytoplankton (in terms of percentage of total chlorophyll *a*) was the highest in the gyre itself and east of gyre, while nanophytoplankton dominated in the HNLC zone and the Chile upwelling. However, their method tends to underestimate the contribution of picophytoplank-

ton and to overestimate the contribution of macrophytoplankton. For example, they only took into account for the picoplankton size group pigments characterizing cyanobacteria and Chlorophyta. However, Prymnesiophyceae may also contribute significantly to picoeukaryotic population (Moon-Van Der Staay et al., 2001; Not et al., 2005). Indeed, Prymnesiophyceae cells characterized by two chloroplasts were observed in our DAPI samples (data not shown). Conversely, Ras et al. (2007) include pigments of dinoflagellates and diatoms in the microplankton size range (20–200  $\mu\text{m}$ ), while many dinoflagellates and some diatoms smaller than 20  $\mu\text{m}$  (data not shown) have been detected along the South-East Pacific transect, as observed previously along 110° W (Hardy et al., 1996). Therefore, the contribution of microphytoplankton could be overestimated.

During the BIOSOPE cruise, Gómez et al. (2007) found dinoflagellate abundance always lower than  $1 \text{ cell mL}^{-1}$ , except at station 20 where a bloom of dinoflagellates was observed ( $\sim 4 \text{ cell mL}^{-1}$  between surface and 5 m depth), and at station UPW ( $\sim 2 \text{ cell mL}^{-1}$ ). These counts from acidified lugol's fixed samples are much lower than ours (Table 1). These differences could originate from differences in the size of the dinoflagellates that were counted in these two studies. We counted dinoflagellates which were between 5  $\mu\text{m}$  and 50  $\mu\text{m}$  in diameter while Gómez et al. (2007) only counted dinoflagellates larger than 15  $\mu\text{m}$ . Hardy et al. (1996) showed that dinoflagellates larger than 20  $\mu\text{m}$  accounted only for 10 to 30% of total dinoflagellates in the Pacific gyre. In our samples (data not shown), the contribution of dinoflagellates larger than 15  $\mu\text{m}$  to total dinoflagellates in terms of abundances was below 1% near the Marquesas Islands, 1% in the upwelling zone, 2% in the HNLC zone and around the station EGY, and reached a maximum of 3% at station ST20 where a bloom was observed by Gómez et al. (2007).

Globally, the abundance of dinoflagellates (Fig. 9) decreased towards the hyper-oligotrophic zone and increased towards the mesotrophic and eutrophic zones. This is in agreement with Leterme et al. (2006) who showed that the dinoflagellate abundances increased with trophic status in the NE Atlantic Ocean. The observed increase in heterotrophic dinoflagellates contribution with depth is coherent with previous observations in the Equatorial Pacific (Chavez et al., 1990). Heterotrophic dinoflagellates were always much more abundant than ciliates as shown previously in the Sargasso Sea (Lessard and Murrell, 1996) and the North-East Equatorial Pacific (Yang et al., 2004). Although it is generally admitted that heterotrophic nanoflagellates are the major grazers of picoplankton (Mackey et al., 2002; Sato et al., 2007), predation by heterotrophic dinoflagellates could also be important (Sanders et al., 2000; Sherr et al., 1991).

Green fluorescing dinoflagellates were initially observed by Shapiro et al. (1989) in the North-West Atlantic, but little reported since then. Recently, Tang and Dobbs (2007) showed that green autofluorescence is a common feature

of dinoflagellates, diatoms, green algae, cyanobacteria and raphidophytes. They observed that this green autofluorescence is stronger in fixed cells, not stable over time, and that its intensity varies with organisms (the strongest signal is observed for dinoflagellates). Shapiro et al. (1989) found that green fluorescing dinoflagellates could contribute from 4 to 100% to heterotrophic dinoflagellates while Chavez et al. (1990) found that in the Equatorial Pacific, 32% of heterotrophic dinoflagellates on average produced bright green fluorescence. The data reported here (maximal concentrations in excess of  $60 \text{ cell mL}^{-1}$  and maximum contribution up to 50%, Fig. 9) are in agreement with these previous studies. The origin of this bright green fluorescence (Fig. 3c) still remains intriguing. Shapiro et al. (1989) hypothesized that it could be due to a flavoprotein. The isolation by Fujita et al. (2005) of a flavoprotein from the green-fluorescing flagellum of the brown alga *Scytosiphon lomentaria* lends support to this hypothesis. Kim et al. (2004) showed that the infection of the thecate dinoflagellate *Gonyaulax spinifera* by *Amoebophrya*, a parasitic dinoflagellate, induces a bright green autofluorescence in infected cells. This fluorescence is, however, much more localised than in the green dinoflagellates observed in our samples (Fig. 3c). Another attractive possibility could be the presence of a cytoplasmic green fluorescing protein (GFP, Wilson and Hastings, 1998).

Ciliate abundances reported here (Table 1) are comparable to those reported from other similar marine systems ranging from oligotrophic to eutrophic (Beers et al., 1980; Leakey et al., 1996; Lessard and Murrell, 1996; Yang et al., 2004). Focusing only on tintinnid ciliates, Dolan et al. (2007) observed during the BIOSOPE cruise much lower concentrations ranging from 0.002 and  $0.04 \text{ cell mL}^{-1}$  between 5 and 300 m. However, tintinnids generally account only for 5–10% of all ciliates (Dolan and Marrasé, 1995). Comparing our data with values from Table 2 of Dolan et al. (2007) results in a proportion of tintinnids (0.05%) smaller, for example, than in the Catalan Sea (Dolan and Marrasé, 1995). However, maxima and minima of tintinnid and total ciliates occurred simultaneously, in the upwelling and in the gyre, respectively.

The distribution pattern of ciliates (Fig. 11) agrees with previous observations in the North Western Indian Ocean (Leakey et al., 1996) where the lowest abundances were observed in oligotrophic waters and the highest in the most productive waters. The different patterns of vertical distribution of ciliates observed in the present study could be explained by the fact that no distinction has been made between the different types of ciliates (mixotrophic and heterotrophic ciliates). In the Catalan Sea, the distribution of heterotrophic ciliate is closely related to the DCM while mixotrophic ciliates display a more complicated vertical pattern and their distribution may vary from system to system (Dolan and Marrasé, 1995).

Nano-ciliates ( $<20 \mu\text{m}$ ) have been identified as potentially important grazers of picoplankton (Sherr and Sherr, 1987;

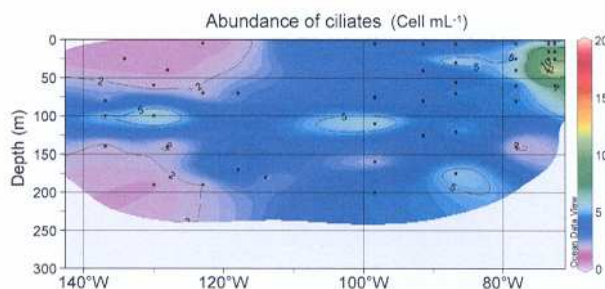


Fig. 11. Abundance of ciliates ( $\text{cell mL}^{-1}$ ). Legend as in Fig. 5.

Sherr et al., 1991) and account in general from 50 to 95% of total ciliates in a variety of marine ecosystems (Beers et al., 1980; Montagnes et al., 1988; Yang et al., 2004). However, in our study, we observed very few nanociliates as the size of the majority of ciliates felled into a 50–100  $\mu\text{m}$  range (data not shown). That could be explained by the fixation method used in our study: Leakey et al. (1994) demonstrated that the use of glutaraldehyde as fixative could lead to a loss of cells as high as 70% among aloricate ciliates relative to lugol's iodine while tintinnid numbers did not vary significantly between fixative treatments. However, Dolan and Marrasé (1995), observed only 8% of nanociliates in the Catalan Sea in June 1993 while lugol's iodine was used as fixative.

In conclusion, although assessing the abundance of the different microbial groups by DAPI microscopy is slow and labour-intensive and despite some cell loss following long-term sample storage, the present data set highlights some characteristics of the microbial community in the South-East Pacific Ocean that have escaped more rapid techniques such as flow cytometry. This includes in particular the importance of colonial PE containing picocyanobacteria in the HNLC area and the large contribution of green fluorescing dinoflagellates in some regions, such as between the gyre and the coast of South America.

**Acknowledgements.** D. Tailliez and C. Bournot are warmly thanked for their efficient help in CTD rosette management and data processing. D. Marie, M. Viprey and L. Garczarek are acknowledged for their help during the cruise. This is a contribution to the BIOSOPE project (LEFE-CYBER program). This research was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut des Sciences de l'Univers (INSU), the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES), the European Space Agency (ESA), the National Aeronautics and Space Administration (NASA) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Additional funds were provided by the ANR Biodiversity project PICOFUNPAC. S. Masquelier was supported by a doctoral fellowship (BFR05/027) from the Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of Luxembourg.

Edited by: M. Dai



## References

- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., and Thingstad, F.: The ecological role of water column microbes in the sea, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 10, 257–263, 1983.
- Beers, J. R., Reid, M. H., and Stewart, G. L.: Microplankton population structure in Southern California nearshore waters in late spring, *Mar. Biol.*, 60, 209–226, 1980.
- Campbell, L., Liu, H. B., Nolla, H. A., and Vaultot, D.: Annual variability of phytoplankton and bacteria in the subtropical North Pacific Ocean at station Aloha during the 1991–1994 ENSO event, *Deep-Sea Res. I*, 44, 167–192, 1997.
- Capone, D. G., Zehr, J. P., Paerl, H. W., Bergman, B., and Carpenter, E. J.: *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium, *Science*, 276, 1221–1229, 1997.
- Chavez, F. P., Buck, K. R., and Barber, R. T.: Phytoplankton taxa in relation to primary production in the Equatorial Pacific, *Deep-Sea Res. II*, 37, 1733–1752, 1990.
- Christaki, U., Courties, C., Karayanni, H., Giannakourou, A., Maravelias, C., Kormas, K. A., and Lebaron, P.: Dynamic characteristics of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* consumption by bacterivorous nanoflagellates, *Microb. Ecol.*, 43, 341–352, 2002.
- Claustre, H.: The trophic status of various oceanic provinces as revealed by phytoplankton pigment signatures, *Limnol. Oceanogr.*, 39, 1206–1210, 1994.
- Claustre, H., Huot, Y., Obermosterer, I., Gentili, B., Tailliez, D., and Lewis, M.: Gross community production and metabolic balance in the South Pacific Gyre, using a non intrusive bio-optical method, *Biogeosciences Discuss.*, 4, 3089–3121, 2007, <http://www.biogeosciences-discuss.net/4/3089/2007/>.
- Claustre, H., Sciandra, A., and Vaultot, D.: Introduction to the special section: Bio-optical and biogeochemical conditions in the South East Pacific in late 2004 – the BIOSOPE cruise, *Biogeosciences Discuss.*, 5, 605–640, 2008, <http://www.biogeosciences-discuss.net/5/605/2008/>.
- Courties, C., Vaquer, A., Trousselier, M., Lautier, J., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Neveux, J., Machado, C., and Claustre, H.: Smallest eukaryotic organism, *Nature*, 370, 255, 1994.
- Dolan, J. R. and Marrasé, C.: Planktonic ciliate distribution relative to a deep chlorophyll maximum: Catalan Sea. N.W. Mediterranean, June 1993, *Deep-Sea Res. I*, 42, 1965–1987, 1995.
- Dolan, J. R., Ritchie, M. E., and Ras, J.: The “neutral” community structure of planktonic herbivores, tintinnid ciliates of the microzooplankton, across the SE Tropical Pacific Ocean, *Biogeosciences*, 4, 297–310, 2007, <http://www.biogeosciences.net/4/297/2007/>.
- Fenchel, T.: Ecology of heterotrophic microflagellates. II. Bioenergetics and growth, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 8, 225–231, 1982.
- Fujita, S., Iseki, M., Yoshikawa, S., Makino, Y., Watanabe, M., Motomura, T., Kawai, H., and Murakami, A.: Identification and characterization of a fluorescent flagellar protein from the brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae): a flavoprotein homologous to old yellow enzyme, *Eur. J. Phycol.*, 40, 159–167, 2005.
- Gómez, F., Claustre, H., Raimbault, P., and Souissi, S.: Two High-Nutrient Low-Chlorophyll phytoplankton assemblages: The tropical central Pacific and the offshore Perú-Chile current, *Biogeosciences*, 4, 1101–1113, 2007, <http://www.biogeosciences.net/4/1101/2007/>.
- Graham, L. and Wilcox, L.: *Algae*, Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River, NJ, 630 pp., 2000.
- Grob, C., Ulloa, O., Claustre, H., Huot, Y., Alarcon, G., and Marie, D.: Contribution of picoplankton to the total particulate organic carbon concentration in the Eastern South Pacific, *Biogeosciences*, 4, 837–852, 2007, <http://www.biogeosciences.net/4/837/2007/>.
- Gundersen, K., Bratbak, G., and Heldal, M.: Factors influencing the loss of bacteria in preserved seawater samples, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 137, 305–307, 1996.
- Hagström, Azam, F., Andersson, A., Wikner, J., and Rassoulzadegan, F.: Microbial loop in an oligotrophic pelagic marine ecosystem: possible roles of cyanobacteria and nanoflagellates in the organic fluxes, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 49, 171–178, 1988.
- Hardy, J., Hanneman, A., Behrenfeld, M., and Horner, R.: Environmental biogeography of near-surface phytoplankton in the Southeast Pacific Ocean, *Deep-Sea Res. I*, 43, 1647–1659, 1996.
- Kim, S., Park, M. G., Yih, W., and Coats, D. W.: Infection of the bloom-forming thecate dinoflagellates *Alexandrium affine* and *Gonyaulax spinifera* by two strains of *Amoebophrya* (Dinophyta), *J. Phycol.*, 40, 815–822, 2004.
- Le Gall, F., Marie, D., Garczarek, L., Viprey, M., and Vaultot, D.: Picoplankton diversity in the South East Pacific from cultures, *Biogeosciences*, 5, 203–214, 2008, <http://www.biogeosciences.net/5/203/2008/>.
- Leakey, R. J. G., Burkill, P. H., and Sleigh, M. A.: A comparison of fixatives for the estimation of abundance and biovolume of marine planktonic ciliate populations, *J. Plankton Res.*, 16, 375–389, 1994.
- Leakey, R. J. G., Burkill, P. H., and Sleigh, M. A.: Planktonic ciliates in the Northwestern Indian ocean: their abundance and biomass in waters of contrasting productivity, *J. Plankton Res.*, 18, 1063–1071, 1996.
- Lessard, E. J. and Murrell, M. C.: Distribution, abundance and size composition of heterotrophic dinoflagellates and ciliates in the Sargasso Sea near Bermuda, *Deep-Sea Res. I*, 43, 1045–1065, 1996.
- Leterme, S. C., Seuront, L., and Edwards, M.: Differential contribution of diatoms and dinoflagellates to phytoplankton biomass in the NE Atlantic Ocean and the North Sea, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 312, 57–65, 2006.
- Mackey, D. J., Blanchot, J., Higgins, H. W., and Neveux, J.: Phytoplankton abundances and community structure in the Equatorial Pacific, *Deep-Sea Res. II*, 49, 2561–2582, 2002.
- Marañón, E., Holligan, P. M., Barciela, R., González, N., Mouriño, B., Pazó, M. J., and Varela, M.: Patterns of phytoplankton size structure and productivity in contrasting open-ocean environments, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 216, 43–56, 2001.
- Montagnes, D. J. S., Lynn, D. H., Roff, J. C., and Taylor, W. D.: The annual cycle of heterotrophic planktonic ciliates in the waters surrounding the isles of shoals, Gulf of Maine: an assessment of their trophic role, *Mar. Biol.*, 99, 21–30, 1988.
- Moon-van der Staay, S. Y., De Wachter, R., and Vaultot, D.: Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity, *Nature*, 409, 607–610, 2001.
- Morel, A., Gentili, B., Claustre, H., Babin, M., Bricaud, A., Ras, J., and Tieche, F.: Optical properties of the “clearest” natural waters, *Limnol. Oceanogr.*, 52, 217–229, 2007.
- Nielsen, S. L.: Size-dependent growth rates in eukaryotic and prokaryotic algae exemplified by green algae and cyanobacte-

- ria: Comparisons between unicells and colonial growth forms, *J. Plankton Res.*, 28, 489–498, 2006.
- Not, F., Massana, R., Latasa, M., Marie, D., Colson, C., Eikrem, W., Pedrós-Alió, C., Vaultot, D., and Simon, N.: Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas, *Limnol. Oceanogr.*, 50, 1677–1686, 2005.
- Paerl, H. W.: Marine plankton, The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 121–148, 2000.
- Partensky, F., Hess, W. R., and Vaultot, D.: *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance, *Microb. Mol. Biol. R.*, 63, 106–127, 1999.
- Pérez, V., Fernández, E., Marañón, E., Morán, X. A. G. and Zubkove, M. V.: Vertical distribution of phytoplankton biomass, production and growth in the Atlantic subtropical gyres, *Deep-Sea Res. I*, 53, 1616–1634, 2006.
- Porter, K. G. and Feig, Y. S.: The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnol. Oceanogr.*, 25, 943–948, 1980.
- Putland, J. and Rivkin, R.: Influence of storage mode and duration on the microscopic enumeration of *Synechococcus* from a cold coastal ocean environment, *Aquat. Microb. Ecol.*, 17, 191–199, 1999.
- Raimbault, P. and Garcia, N.: Carbon and nitrogen uptake in the South Pacific Ocean: Evidence for efficient dinitrogen fixation and regenerated production leading to large accumulation of dissolved organic matter in nitrogen-depleted waters, *Biogeosciences Discuss.*, 4, 3531–3579, 2007, <http://www.biogeosciences-discuss.net/4/3531/2007/>.
- Raimbault, P., Garcia, N., and Cerutti, F.: Distribution of inorganic and organic nutrients in the South Pacific Ocean-evidence for long-term accumulation of organic matter in nitrogen-depleted waters, *Biogeosciences Discuss.*, 4, 3041–3087, 2007, <http://www.biogeosciences-discuss.net/4/3041/2007/>.
- Ras, J., Uitz, J. and Claustre, H.: Spatial variability of phytoplankton pigment distribution in the South East Pacific, *Biogeosciences Discuss.*, 4, 3409–3451, 2007, <http://www.biogeosciences-discuss.net/4/3409/2007/>.
- Raven, J. A.: The twelfth Tansley lecture. Small is beautiful: The picophytoplankton, *Funct. Ecol.*, 12, 503–513, 1998.
- Sanders, R. W., Berninger, U. G., Lim, E. L., Kemp, P. F., and Caron, D. A.: Heterotrophic and mixotrophic nanoplankton predation on picoplankton in the Sargasso Sea and on Georges Bank, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 192, 103–118, 2000.
- Sato, M., Yoshikawa, T., Takeda, S., and Furuya, K.: Application of the size-fractionation method to simultaneous estimation of clearance rates by heterotrophic flagellates and ciliates of pico- and nanophytoplankton, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 349, 334–343, 2007.
- Schlitzer, R.: ODV software, <http://www.awi-bremerhaven.de/GEO/ODV>, 2003.
- Shapiro, L. P., Haugen, E. M., and Carpenter, E. J.: Occurrence and abundance of green-fluorescing dinoflagellates in surface waters of the Northwest Atlantic and Northeast Pacific Oceans, *J. Phycol.*, 25, 189–191, 1989.
- Sherr, B. F. and Sherr, E. B.: High rates of consumption of bacteria by pelagic ciliates, *Nature*, 325, 710–711, 1987.
- Sherr, E. B. and Sherr, B. F.: Marine microbes an overview, in: *Microbial Ecology of the Oceans*, edited by: Kirchman, D. L., New York, Willey-Liss, Inc., 13–46, 2000.
- Sherr, E. B., Sherr, B. F., and Wheeler, P. A.: Distribution of coccoid cyanobacteria and small eukaryotic phytoplankton in the upwelling ecosystem off the Oregon coast during 2001 and 2002, *Deep-Sea Res. II*, 52, 317–330, 2005.
- Sherr, E. F., Sherr, B. F., and McDaniel, J.: Clearance rates of <math><6\ \mu\text{m}</math> fluorescently labeled algae (FLA) by estuarine protozoa: Potential grazing impact of flagellates and ciliates, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 69, 81–92, 1991.
- Sieburth, J. M., Smetacek, V., and Lenz, J.: Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions, *Limnol. Oceanogr.*, 23, 1256–1263, 1978.
- Tang, Y. Z. and Dobbs, F. C.: Green autofluorescence in dinoflagellates, diatoms, and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 2306–2313, 2007.
- Vidussi, F., Claustre, H., Manca, B. B., Luchetta, A., and Marty, J. C.: Phytoplankton pigment distribution in relation to upper thermocline circulation in the Eastern Mediterranean Sea during winter, *J. Geophys. Res.*, 106, 19939–19956, 2001.
- Wilson, T. and Hastings, J. W.: Bioluminescence, *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.*, 14, 197–230, 1998.
- Yang, E. J., Choi, J. K., and Hyun, J. H.: Distribution and structure of heterotrophic protist communities in the Northeast Equatorial Pacific Ocean, *Mar. Biol.*, 146, 1–15, 2004.
- Zehr, J. P., Waterbury, J. B., Turner, P. J., Montoya, J. P., Omoregie, E., Steward, G. F., Hansen, A., and Karl, D. M.: Unicellular cyanobacteria fix  $\text{N}_2$  in the subtropical North Pacific Ocean, *Nature*, 412, 635–638, 2001.

**ANNEXE**  
**du chapitre IV**

## Analyse des populations planctoniques du Pacifique Sud-Est par sondes moléculaires

Les résultats exposés ci-après étant peu fiables de part les problèmes d'hybridation et de faible marquages rencontrés avec la majorité des échantillons, ils n'ont pas été intégrés dans le papier Biogeosciences et ne feront pas partie d'une autre publication.

### Introduction

Après les comptages réalisés sur les filtres marqués au DAPI (papier Biogeosciences), nous avons voulu connaître la distribution des Chlorophyta et Haptophyta parmi les différentes classes de taille le long du transect Pacifique Sud-Est. Nous nous sommes également intéressés à la distribution des Mamiellales dont plusieurs études ont montré qu'ils dominaient généralement la fraction picoplanctonique dans les milieux côtiers (Not et al. 2004, 2008). Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode FISH-TSA avec les sondes spécifiques de ces groupes.

### Matériel et méthodes

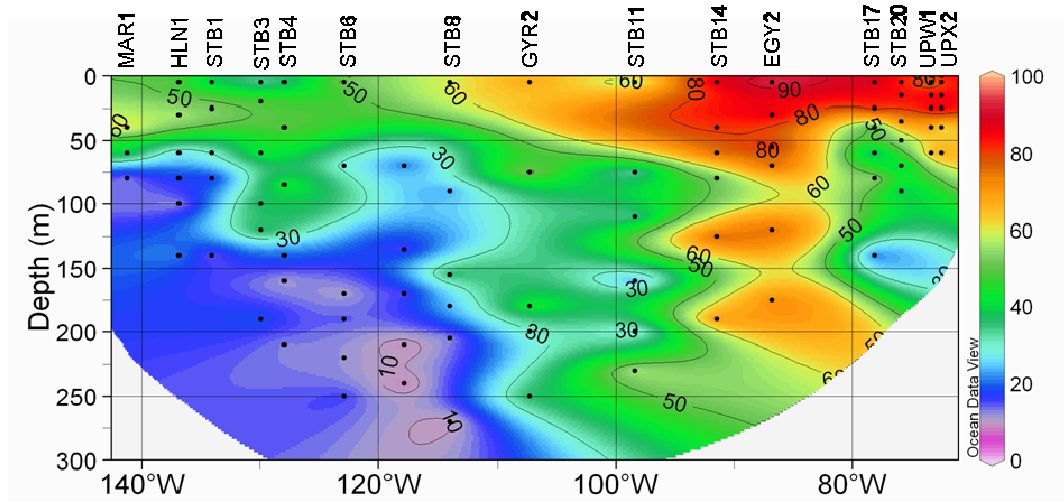
Le protocole d'hybridation utilisé au cours de ce travail est détaillé en Annexe I.

Dans un premier temps, le mélange de sondes (Euk1209+Chlo01+NChlo01) a été utilisé afin de visualiser et compter tous les eucaryotes présents dans les échantillons. Parallèlement à cette hybridation, un marquage au DAPI a été réalisé afin de vérifier la spécificité d'hybridation du mélange de sondes sur les cellules eucaryotes.

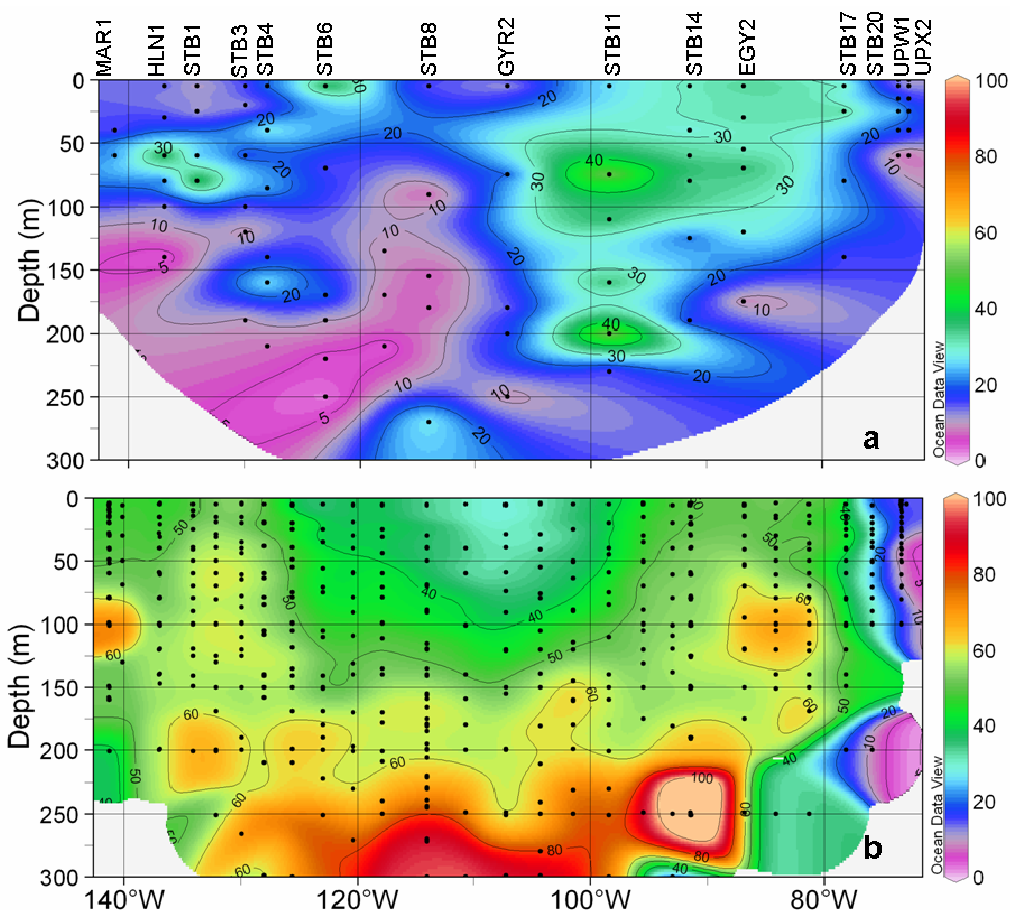
Dans un second temps, les sondes Chlo02, Pras04 et Prym02 ont été utilisées afin de cibler les Chlorophyta, les Mamiellales et les Haptophyta, respectivement.

### Résultats et discussion

Une comparaison du marquage au DAPI avec celui réalisé avec le mélange de sondes (Euk1209+Chlo01+NChlo01) pour l'ensemble des eucaryotes montre un très faible pourcentage d'hybridation (moins de 50 % d'hybridation) sur la première partie du transect



**Figure IV-1 :** Distribution en fonction de la longitude et de la profondeur, des pourcentages d'hybridation obtenus avec le mélange de sondes (Euk1209+NChlo01+Chlo01) par rapport au total d'eucaryotes comptés en DAPI. Les points noirs correspondent aux échantillons ayant permis la construction du profil. Ce profil a été réalisé à l'aide du logiciel « Ocean Data View ».



**Figure IV-2 :** Distribution en fonction de la longitude et de la profondeur, du pourcentage d'hybridation obtenu avec la sonde Pym02 (spécifique des Haptophyta) par rapport aux eucaryotes hybridés avec le mélange de sondes (Euk1209+NChlo01+Chlo01) (a), du rapport des concentrations de 19'hex et chl *a* (b). Les concentrations en pigments ont été communiquées par J. Ras. Légende comme à la figure IV-1.

(Fig. IV-1). Cependant, si on compare les efficacités d'hybridation dans les différentes classes de taille, on s'aperçoit que les faibles valeurs obtenues dans la première partie du transect, sont principalement dues à la fraction picoplanctonique (Tableau IV-1). Ces différences dans l'efficacité d'hybridation pourraient être dues à :

- Une faible quantité d'ARN ribosomal dans les cellules à cause d'une croissance plus faible dans ces eaux très oligotrophes. En effet, les pourcentages d'hybridation les plus élevés ont été rencontrés en milieu côtier, au niveau de l'upwelling du Chili. La technique de FISH-TSA ne pourrait être alors réellement efficace qu'en milieu côtier, comme récemment suggéré par Not et al. (2008) lorsque de très faibles hybridations ont été observées sur certains échantillons de l'Océan Indien.
- La présence d'une plus grande quantité de cellules mortes n'ayant plus de ribosomes mais dont le noyau serait encore visible après marquage au DAPI et visualisation sous lumière UV.
- La présence d'inhibiteurs sur les filtres. Un lavage des filtres au PBS (Phosphate Buffered Saline) a été réalisé afin d'éliminer les inhibiteurs potentiels mais n'a pas permis d'augmenter l'efficacité d'hybridation sur les filtres testés.
- Des problèmes d'échantillonnage. Durant la campagne, des problèmes avec les solutions de fixation ont pu avoir lieu et causer des problèmes lors de l'hybridation.
- Des problèmes de dégradation des échantillons. Cela semble peu probable car ils ont été conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  dès leur retour à Roscoff.

Lorsqu'on s'intéresse aux résultats obtenus avec les sondes spécifiques, on s'aperçoit que la majorité des cellules eucaryotes n'ont été hybridées ni avec la sonde Chlo02, ni avec la sonde Prym02 (Fig. IV-2 et IV-3). Cela a été également observé dans l'Océan Indien où 70 % des cellules eucaryotes n'ont été identifiées ni avec la sonde Chlo02, ni avec la sonde Prym02 (Not et al. 2008). Une explication pourrait être la faible efficacité d'hybridation observée pour l'ensemble des eucaryotes dans la première moitié du transect. Cependant, au niveau de l'upwelling du Chili, moins de 50 % des cellules eucaryotes ont été hybridées avec les sondes spécifiques des Chlorophyta (moins de 10 %) et Haptophyta (entre 15 % et 40 %) alors que de



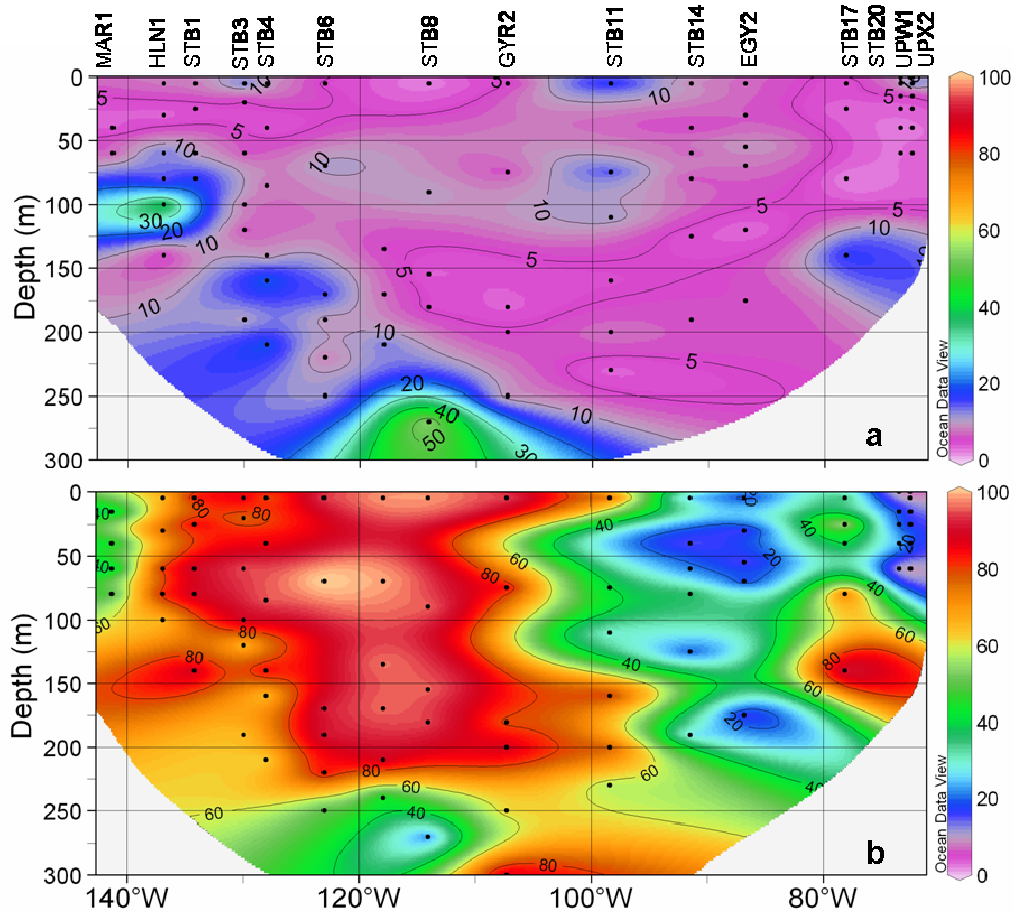
bons pourcentages d'hybridation ont été obtenus avec le mélange de sondes (Euk1209+NChlo01+Chlo01) (entre 75 % et 99 %).

Dans l'ensemble, il semble quand même y avoir une plus grande proportion d'Haptophyta que de Chlorophyta tout le long du transect, excepté à la station UPX2 (5m) où on observe 40 % de Chlorophyta contre 4 % d'Haptophyta. La comparaison des hybridations réalisées avec la sonde Pym02 et la distribution du rapport des pigments 19' hex/chl *a* montre que dans la deuxième partie du transect, les maxima d'hybridation suivent la zone correspondant à un rapport de plus de 50 % entre les pigments (Figure IV-2b). Les données d'hybridation semblent donc cohérentes avec les données pigmentaires dans cette seconde partie du transect. Concernant la première partie du transect, la moins bonne cohérence entre les données FISH et pigmentaires pourrait être due (1) aux faibles pourcentages d'hybridation obtenus avec le mélange de sondes (Euk1209+NChlo01+Chlo01) mais également (2) au fait que le contenu pigmentaire peut varier très fortement avec les paramètres environnementaux et le statut physiologique des cellules (Jeffrey et al. 1999).

De plus, lorsqu'on s'intéresse à la répartition des Haptophyta dans les différentes classes de taille, on s'aperçoit que la majorité des hybridations a été obtenue dans la classe de taille entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  (Tableau IV-1). Cette observation est en accord avec des analyses précédentes réalisées avec des sondes spécifiques des haptophytes en milieu naturel montrant que la majorité d'entre eux présentent une taille  $\sim 4 \mu\text{m}$  (H. Liu, comm. pers). Les échantillons du Pacifique Sud-Est montrent jusqu'à 30 % de pico-haptophytes (STB1 80m et MAR1 15 m). Cependant, ces résultats sont à relativiser étant donné que les efficacités d'hybridation à ces stations sont très faibles. En tenant compte de l'ensemble des eucaryotes comptés en DAPI, ce pourcentage n'atteint plus que 8 % de la communauté eucaryote. Lorsqu'on s'intéresse aux stations pour lesquelles une efficacité d'hybridation d'au moins 50 % a été obtenue, on s'aperçoit que les contributions des pico-haptophytes varient de moins de 1 % à 22 % des cellules hybridées avec les valeurs les plus élevées rencontrées dans la zone de transition entre le tourbillon Sud Pacifique et les côtes chiliennes. Les valeurs minimales sont observées au niveau du tourbillon Sud Pacifique mais aussi au niveau des côtes chiliennes et ce, quelque soit la profondeur considérée.

Les pourcentages d'hybridation obtenus avec la sonde Chlo02 sont très faibles même aux stations côtières où on s'attendrait à avoir des contributions supérieures à 50 % d'après la littérature (Figure IV-3) (Not et al. 2004, 2008). A ces stations, l'efficacité d'hybridation peut atteindre plus de 90 % en surface. Cela correspond notamment à la station UPX2 (5m) où on





**Figure IV-3 :** Distribution en fonction de la longitude et de la profondeur, du pourcentage d'hybridation obtenu avec la sonde Chlo02 (spécifique des Chlorophyta) par rapport aux eucaryotes hybridés avec le mélange de sondes (Euk1209+NChlo01+Chlo01) (a), du pourcentage d'hybridation obtenu avec la sonde Pras04 (spécifique des Mamiellales) par rapport aux Chlorophyta précédemment comptés (b). Les points noirs correspondent aux échantillons ayant permis la construction du profil. Légende comme à la figure IV-1.

observe une contribution des pico-chlorophytes de 39 %. C'est le seul échantillon pour lequel une contribution aussi importante des chlorophytes (toutes tailles confondues) a été observée. Les faibles concentrations de chlorophytes obtenues dans les zones océaniques du transect semblent néanmoins être en accord avec des études précédentes montrant la diminution des abondances en chlorophytes lorsqu'on s'éloigne des zones côtières vers les zones océaniques (Carreto et al. 2003 ; Not et al. 2008).

Lorsque l'on compare les comptages réalisés avec la sonde Chlo02 et la sonde Pras04 (spécifique des Mamiellales), on constate que globalement, le pourcentage de Chlorophyta hybridés qui appartiennent à l'ordre des Mamiellales atteint plus de 25 % dans la plupart des stations et va jusque 100 % pour une grande partie des échantillons dans la zone HNLC et le tourbillon Sud Pacifique (Fig. IV-3b). Cependant, ces résultats semblent contradictoires avec les banques de clones réalisées sur des échantillons triés au cytomètre en flux montrant une dominance de la fraction pico par les Mamiellales uniquement dans l'upwelling, alors que dans la zone HNLC et le tourbillon Sud Pacifique, la fraction pico est dominée par des non-Mamiellales (X. Shi, comm. pers.).

Les Mamiellales étant composés en grande partie d'espèces picoplanctoniques (*Micromonas pusilla*, *Ostreococcus tauri*) ou situés dans la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  (Vaulot et al. 2008), on s'attendrait à retrouver une contribution plus importante des Mamiellales dans ces fractions de taille. C'est ce qu'on observe en général lorsque l'on considère toutes les données y compris les échantillons pour lesquels moins de 50 % d'efficacité d'hybridation a été obtenue.

**Tableau IV-1 :** Pourcentages d'hybridation obtenus avec le mélange de sondes (Euk1209+NChlo01+Chlo01) (% marquage) dans chaque classe de taille ; pourcentages d'hybridation avec la sonde Chlorophyta (% Chlo02), la sonde Haptophyta (% Prym02) par rapport au total des eucaryotes hybridés avec le mélange de sondes ; pourcentages d'hybridation avec la sonde Mamiellales (% Pras04) par rapport à l'ensemble des Chlorophyta détectés avec la sonde Chlo02 aux différentes stations et profondeurs (m) étudiées au cours de la campagne BIOSOPE. Le surlignage jaune correspond aux échantillons pour lesquels plus de 50 % d'hybridation a été obtenu avec le mélange de sondes (Euk1209+NChlo01+Chlo01).

Station	Prof (m)	< 2 µm				> 2 µm et < 5 µm				> 5 µm			
		% marquage	% Chlo02	% Prym02	% Pras04	% marquage	% Chlo02	% Prym02	% Pras04	% marquage	% Chlo02	% Prym02	% Pras04
MAR1	80	12	0	18	0	38	2	78	25	6	< 1	1	0
MAR1	60	32	0	< 1	0	70	< 1	14	0	68	1	< 1	0
MAR1	40	57	< 1	2	0	87	< 1	6	17	98	< 1	< 1	8
MAR1	15	16	< 1	31	0	37	2	97	0	6	< 1	1	17
HLN1	140	9	0	0	0	47	0	0	0	50	1	0	100
HLN1	100	< 1	33	0	0	1	33	0	50	0	0	0	0
HLN1	80	4	0	0	17	29	2	1	67	63	< 1	0	17
HLN1	60	3	4	6	20	19	14	45	73	50	1	4	0
HLN1	30	35	0	3	13	80	< 1	13	50	94	< 1	< 1	0
HLN1	5	18	2	4	21	87	6	12	30	82	< 1	1	0
STB1	140	< 1	0	0	0	< 1	50	0	50	6	50	0	50
STB1	80	< 1	0	30	0	3	22	45	100	4	0	0	0
STB1	60	9	1	2	33	52	4	8	61	54	< 1	< 1	6
STB1	25	25	< 1	2	63	81	1	4	33	57	< 1	< 1	4
STB1	5	4	< 1	3	29	62	4	2	65	15	1	0	6
STB3	190	6	4	3	60	33	1	4	0	100	0	0	0
STB3	120	15	1	< 1	40	82	0	1	0	90	0	0	0
STB3	100	27	< 1	3	89	77	0	3	11	75	< 1	< 1	0
STB3	60	36	< 1	3	40	85	1	6	50	86	0	0	10
STB3	20	35	< 1	1	8	74	2	4	31	67	< 1	1	23
STB3	5	5	2	4	43	37	13	5	55	67	< 1	0	3
STB4	210	5	19	6	25	20	6	0	0	0	0	0	25
STB4	160	4	25	11	43	6	0	21	0	15	0	0	0
STB4	140	6	1	8	75	35	0	8	0	38	1	0	25
STB4	85	28	1	12	55	84	2	15	40	63	< 1	< 1	5
STB4	40	20	1	15	29	75	1	21	29	75	1	0	14
STB4	5	13	3	11	27	44	1	14	18	53	1	0	18
STB6	250	7	9	0	33	25	0	0	11	50	0	0	0
STB6	220	7	1	1	100	28	0	1	0	40	0	0	0
STB6	190	8	1	3	67	33	0	3	33	67	0	1	0
STB6	170	1	3	3	67	11	6	19	33	5	10	3	0
STB6	70	18	10	4	35	39	3	8	17	36	5	2	26
STB6	5	41	1	8	67	87	1	34	33	89	< 1	4	0

Tableau IV-1 : suite

Station	Prof (m)	< 2 µm				> 2 µm et < 5 µm				> 5 µm			
		% marquage	% Chlo02	% Prym02	% Pras04	% marquage	% Chlo02	% Prym02	% Pras04	% marquage	% Chlo02	% Prym02	% Pras04
STB8	240	4	63	0	15	3	19	0	8	0	0	0	0
STB8	210	< 1	0	0	0	< 1	0	0	100	0	0	0	0
STB8	170	< 1	0	0	0	2	0	8	0	25	12	0	100
STB8	135	< 1	0	4	0	19	8	20	67	21	4	0	33
STB8	70	3	0	0	0	28	3	15	67	57	1	0	33
GYR2	270	2	40	0	0	10	0	20	0	0	0	0	0
GYR2	205	< 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GYR2	180	14	0	0	0	41	2	2	100	50	0	0	0
GYR2	155	51	0	1	0	66	0	< 1	67	50	< 1	< 1	33
GYR2	90	3	1	0	0	26	5	1	44	75	2	1	56
GYR2	5	50	< 1	5	20	77	< 1	8	40	100	< 1	< 1	40
STB11	250	30	1	0	0	58	< 1	2	25	89	1	1	25
STB11	200	24	2	5	67	57	2	5	33	0	0	2	0
STB11	180	63	0	3	0	81	< 1	4	67	67	< 1	1	0
STB11	75	63	0	2	13	78	1	7	38	77	1	2	50
STB11	5	74	0	3	80	71	< 1	3	20	71	< 1	< 1	0
STB14	230	54	0	1	0	81	1	4	0	67	< 1	< 1	33
STB14	200	< 1	0	17	0	5	8	42	100	20	0	17	0
STB14	160	1	0	21	100	5	0	21	0	29	0	4	0
STB14	110	8	5	3	6	32	8	34	6	16	2	4	11
STB14	75	5	11	13	15	15	7	47	8	24	5	16	15
STB14	5	25	3	12	86	46	3	13	11	57	1	2	3
EGY2	190	93	3	1	0	95	1	3	0	100	1	0	0
EGY2	125	93	< 1	6	0	97	< 1	4	6	89	< 1	< 1	0
EGY2	80	36	0	11	0	54	< 1	13	33	30	< 1	1	0
EGY2	60	78	< 1	12	4	93	2	16	15	88	< 1	< 1	0
EGY2	40	75	< 1	6	6	92	2	19	3	81	< 1	< 1	0
EGY2	5	97	3	13	3	99	3	18	2	100	< 1	< 1	2
STB17	175	65	1	0	0	95	4	0	0	57	0	0	0
STB17	120	81	0	10	50	83	< 1	23	50	85	0	1	0
STB17	70	91	1	21	0	97	6	19	0	100	1	< 1	0
STB17	55	99	4	18	< 1	100	11	10	3	98	1	< 1	< 1
STB17	30	96	2	19	< 1	97	4	14	2	97	1	< 1	0
STB17	5	99	2	22	1	99	4	13	7	95	< 1	< 1	< 1
STB20	140	21	0	0	29	7	9	11	57	14	5	0	14
STB20	80	61	0	10	0	85	< 1	11	67	67	< 1	< 1	0
STB20	60	1	0	22	0	5	0	78	0	0	0	0	0
STB20	40	27	0	39	0	31	< 1	59	50	5	< 1	2	0
STB20	25	97	< 1	24	14	97	< 1	17	82	91	< 1	< 1	5
STB20	5	100	< 1	15	5	99	< 1	25	37	100	< 1	2	5
UPW1	60	67	0	1	0	80	< 1	3	0	88	0	0	0
UPW1	40	67	< 1	0	0	94	< 1	22	14	99	< 1	< 1	29
UPW1	25	89	< 1	0	0	95	1	45	15	99	< 1	2	5
UPW1	15	91	< 1	0	5	90	< 1	29	25	89	< 1	1	0
UPW1	5	8	0	0	0	24	0	12	0	11	0	0	0
UPW1	0	97	2	0	0	85	1	16	7	92	< 1	< 1	0
UPX2	60	79	5	0	0	67	< 1	2	0	84	0	0	0
UPX2	40	< 1	1	0	0	23	1	10	0	33	0	1	0
UPX2	25	100	3	0	0	83	< 1	4	4	89	< 1	< 1	0
UPX2	15	100	< 1	< 1	0	56	< 1	4	0	76	< 1	< 1	0
UPX2	5	100	39	< 1	< 1	84	1	4	< 1	93	< 1	< 1	0
UPX2	0	100	7	< 1	0	96	< 1	3	< 1	93	< 1	< 1	0

# CHAPITRE V

## **Conclusions et perspectives**

## V.1 Considérations méthodologiques

L'hybridation *in situ* fluorescente avec des sondes ciblant l'ARNr 18S est une méthode couramment utilisée pour l'identification et la quantification de populations microbiennes dans des environnements complexes. C'est une technique qui ne demande pas d'investissement matériel lourd et avec laquelle des résultats sont disponibles après une journée d'expérimentation. Cependant, cette technique comporte des limites discutées par Amann & Fuchs (2008) auxquelles nous avons été confrontées au cours de ce travail. Les tests réalisés sur cultures nous ont permis de mettre en évidence l'importance de l'étape de perméabilisation, en particulier sur les souches de Trebouxiophyceae réfractaires à la perméabilisation à la cellulase utilisée dans ce travail (Annexe I). Ceci peut expliquer en partie les faibles pourcentages d'hybridations obtenus avec le mélange de sondes (Euk1209+Chlo01+NChlo01), et les faibles contributions de Chlorophyta obtenues pour le lac d'Esch-sur-Sûre. Cette étape est d'autant plus importante lors de l'utilisation du FISH-TSA qui nécessite la pénétration dans les cellules de l'enzyme HRP de grande taille (40 000 daltons). Kapaun et al. (1995) ont réussi à hydrolyser les couches de microfibrilles de glucosamine composant la membrane cellulaire d'une souche de *Chlorella* sp. à l'aide d'un traitement à l'acide fort (HCl 6N), suivi d'un traitement à la chitinase et à la chitosanase. Une des perspectives de notre travail pourrait être la mise au point d'un protocole de perméabilisation adéquat de ces cellules tout en préservant les autres cellules moins résistantes.

La spécificité des sondes oligonucléotidiques dépend du nombre de séquences disponibles dans les bases de données lors de leur création. Dans cette optique, la présence de faux positifs parmi les cultures testées suggère un affinement des sondes Chlo02, Pras04 et Prym02 dont la création date de 2000 (Chlo02 et Prym02) et 2004 (Pras04).

L'intensité de marquage est proportionnelle au contenu en ribosomes qui peut varier fortement d'une cellule à une autre. L'amplification de la fluorescence (TSA), permet de s'affranchir de ce biais dans la plupart des cas. Cependant, au cours de ce travail, nous avons obtenu de très faibles signaux dans les milieux oligotrophes à hyper-oligotrophes du Pacifique Sud-Est malgré l'utilisation de la méthode FISH-TSA, mettant en évidence l'inefficacité de cette technique dans certains environnements, comme récemment suggéré par Not et al. (2008). Il serait donc intéressant d'utiliser d'autres techniques sur ces échantillons comme par exemple, la méthode de PCR quantitative (QPCR).

**Tableau V-1 :** Moyennes des contributions (%) des Chlorophyta et des Haptophyta dans les différentes classes de taille ainsi que pour l'ensemble des eucaryotes comptés (total) dans les milieux marins étudiés dans ce travail. Les moyennes ont été réalisées sur les échantillons présentant au minimum 50 % d'hybridation avec le mélange de sondes (Euk1209+NChlo01+Chlo01).

	Milieu marin					
	Hyper-oligotrophe	Oligotrophe	Méso-eutrophe (côtier)	Méso-eutrophe (côtier)	Méso-eutrophe	Eutrophe (côtier)
	Tourbillon Sud Pacifique (STB11)	Zone de transition tourbillon Sud Pacifique - côtes Sud américaines (Egy2-STB17-STB20)	Manche (St1 à St 5)	Mer du Nord (St19 à St 22)	Mer du Nord (St7à St18)	Upwelling du Chili (UPW1-UPX2)
<b>Contribution des Chlorophyta</b>						
Fraction < 2 µm	<1	2	81	31	77	9
Fraction > 2 µm et < 5 µm	2	7	5	19	28	2
Fraction > 5 µm	11	6	9	5	19	2
Total	2	4	62	24	61	7
<b>Contribution des Haptophyta</b>						
Fraction < 2 µm	4	30	0	0	0	<1
Fraction > 2 µm et < 5 µm	15	40	9	35	64	42
Fraction > 5 µm	20	7	9	15	25	3
Total	9	31	2	10	17	18

**Tableau V-2 :** Moyennes des contributions (%) des Chlorophyta et des Haptophyta dans les différentes classes de taille ainsi que pour l'ensemble des eucaryotes comptés (total) dans les milieux lacustres étudiés dans ce travail. Les moyennes ont été réalisées sur les échantillons présentant au minimum 50 % d'hybridation avec le mélange de sondes (Euk1209+NChlo01+Chlo01).

	Eau douce							
	Méso-eutrophe Février	Méso-eutrophe Avril	Méso-eutrophe Juin	Méso-eutrophe Juillet	Méso-eutrophe Octobre	Méso-oligotrophe Juillet	Mésotrophe Juin	Eutrophe Juillet
	Esch-sur-Sûre	Esch-sur-Sûre	Esch-sur-Sûre	Esch-sur-Sûre	Esch-sur-Sûre	Pavin	Bourget	Aydat
<b>Contribution des Chlorophyta</b>								
Fraction < 2 µm	3	7	28	3	1	41	9	11
Fraction > 2 µm et < 5 µm	7	5	11	5	1	28	47	22
Fraction > 5 µm	4	5	99	12	3	14	31	29
Total	5	7	31	5	1	26	27	16
<b>Contribution des Haptophyta</b>								
Fraction < 2 µm	0	0	<1	0	0	0	0	0
Fraction > 2 µm et < 5 µm	<1	<1	0	7	1	34	24	25
Fraction > 5 µm	0	0	0	0	9	6	17	18
Total	<1	<1	<1	2	2	9	8	7

Une étude réalisée en Méditerranée sur la fraction picoplanctonique a montré une bonne correspondance entre les contributions des Chlorophyta obtenus par FISH-TSA et par QPCR (Zhu et al. 2005). Bien que cette méthode soit plus difficile à calibrer que le FISH-TSA pour l'étude de groupes taxinomiques étendus à cause de la variation du nombre de copies du gène de l'ARNr 18S d'une espèce à l'autre, elle permet l'analyse rapide d'un grand nombre d'échantillons et paraît être une bonne alternative à l'utilisation de la méthode FISH-TSA, particulièrement dans l'étude de la distribution d'espèces ou de genres (Countway & Caron 2006 ; Marie et al. 2006).

## V. 2 Contributions des Chlorophyta et des Haptophyta dans les différents milieux étudiés

Un des objectifs de ce travail était d'évaluer la contribution des Chlorophyta et des Haptophyta aux eucaryotes de différentes classes de taille dans des milieux marins et d'eau douce présentant des statuts trophiques différents pour fournir de nouveaux éléments permettant de répondre à la question de la dominance de la « lignée rouge » ou de la « lignée verte ». Les résultats obtenus au cours de ce travail sont résumés dans le tableau V-1 pour les milieux marins et dans le tableau V-2 pour les milieux lacustres. Les résultats obtenus dans le Pacifique Sud-Est étant peu fiables (Annexe du chapitre IV), ils ne seront pas repris dans la discussion.

Globalement, la contribution des Chlorophyta dans la fraction picoplanctonique est plus élevée en milieu marin qu'en milieu lacustre, alors que leur contribution dans la fraction supérieure à 5 µm semble plus élevée en eau douce, probablement due à la présence de chlorophytes de plus grande taille dans les lacs comme *Schroederia* (John et al. 2002).

Ce travail confirme la dominance du picoplancton par les Chlorophyta dans les stations de la Manche mais également dans les stations du large de la Mer du Nord. La dominance de la « lignée verte » parmi le picoplancton de la Manche avait déjà été suggérée par Not et al. (2005) (Tableau V-1). Cependant, alors que *Micromonas pusilla* domine au niveau de la Manche, sa contribution dans les stations du large reste très faible ou non détectable. Dans les stations côtières de la Mer du Nord, la contribution des pico-chlorophytes diminue de façon importante pour ne représenter que 31 % du picoplancton. Dans les fractions supérieures à 2 µm, les Chlorophyta sont minoritaires (moins de 30 %) que l'on se trouve en Manche ou en Mer du Nord.



En milieu lacustre, comme précédemment montré par Hepperle & Krienitz (2001), la contribution des Chlorophyta dans la fraction inférieure à 2  $\mu\text{m}$  est la plus importante dans le milieu de plus faible statut trophique sans jamais dominer la communauté picoeucaryote (41 % ; Tableau V-2). Dans la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$ , la même tendance est observée dans le lac du Bourget (mésotrophe) où les Chlorophyta atteignent un maximum de 47 % sans dominer pour autant dans cette fraction de taille. Dans la fraction supérieure à 5  $\mu\text{m}$ , les Chlorophyta sont minoritaires dans les lacs français. La contribution des Chlorophyta dans le lac d'Esch-sur-Sûre est généralement plus faible que celle observée dans les autres lacs sauf durant la phase d'eau claire (en juin) où une dominance des Chlorophyta dans la fraction supérieure à 5  $\mu\text{m}$  a été observée (99 %), probablement due à des espèces proches de *Schroederia* (Chapitre III).

Les haptophytes sont quant à eux, généralement absents de la fraction picoplanctonique. Ils y ont été détectés uniquement dans les échantillons du Pacifique Sud-Est et dans le lac d'Esch-sur-Sûre (Tableaux V-1 et V-2). Les haptophytes présentent des contributions plus élevées dans la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  quelque soit le milieu étudié. Ceci confirme des analyses précédentes réalisées avec des sondes spécifiques des haptophytes en milieu naturel montrant que la majorité d'entre eux présentent une taille  $\sim 4 \mu\text{m}$  (H. Liu, comm. pers).

En mer du Nord, les Haptophyta présentent généralement de plus fortes densités au printemps et en été (Reid et al. 1990 ; Kuylenstierna & Karlson 1994). Au cours de ce travail (en été) les Haptophyta dominent la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  uniquement dans les stations du large (64 % en moyenne pour les stations 7 à 18) où une efflorescence d'haptophytes a été observée au cours de la campagne (st16). Leur contribution en Manche et dans les stations côtières dans cette fraction de taille reste faible mais supérieure à celle des Chlorophyta (Tableau V-1). Dans la fraction supérieure à 5  $\mu\text{m}$ , les diatomées dominent dans la Manche et les dinoflagellés en Mer du Nord (Chapitre III).

Les contributions des Haptophyta observées au niveau du lac d'Esch-sur-Sûre sont très faibles (toujours inférieures à 10 %) en comparaison avec les contributions observées dans les autres lacs étudiés, quelque soit la saison considérée. En milieu lacustre, la contribution des Haptophyta dans la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  est la plus importante dans le milieu de plus faible statut trophique (Pavin) mais ne domine pas pour autant cette population (34 %) (Tableau V-2). Au cours des comptages réalisés en microscopie à épifluorescence, les dinoflagellés, les diatomées et les cryptophytes colorés (autofluorescence orange sous lumière verte) ont aussi été comptés sur les échantillons lacustres (données non montrées). Malgré une

préfiltration réalisée sur 5  $\mu\text{m}$  pour les échantillons des lacs français, une contribution importante de diatomées supérieures à 5  $\mu\text{m}$  (77 % en moyenne), a été observée dans le lac Pavin. Dans les lacs du Bourget, Aydat et d'Esch-sur-Sûre (Octobre), peu de diatomées supérieures à 5  $\mu\text{m}$  ont été observées mais par contre des contributions moyennes de cryptophytes de 35 %, 40 % et 42 %, respectivement (données non montrées) ont été mises en évidence dans ces trois lacs.

En conclusion, nos données ont confirmé la dominance de la « lignée rouge » dans la fraction supérieure à 5  $\mu\text{m}$  (Grzebyk et al. 2003 ; Katz et al. 2004), pour l'ensemble des lacs étudiés (Pavin, du Bourget, Aydat et Esch-sur-Sûre en octobre) ainsi que pour les échantillons de Manche et de Mer du Nord en été. Alors que les haptophytes et les cryptophytes dominent cette fraction de taille dans les lacs du Bourget, Aydat et Esch-sur-Sûre (en octobre), elle est dominée dans le lac Pavin et en Manche par les diatomées. En Mer du Nord, ceux sont les dinoflagellés qui dominent. Alors que la dominance de la « lignée verte » ou de la « lignée rouge » reste encore à élucider pour la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  au niveau de la Manche, des stations côtières de la Mer du Nord et pour les lacs, cette étude suggère la dominance de la « lignée rouge » dans la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  pour les stations du large de la Mer du Nord en été. La dominance de la « lignée verte » a été confirmée dans la fraction picoplanctonique des stations de la Manche et les stations du large de la Mer du Nord. Le lac d'Esch-sur-Sûre a également montré une dominance de la « lignée verte » mais dans la fraction supérieure à 5  $\mu\text{m}$  durant la période de phase d'eau claire (juin).

Au cours de ce travail, nous avons utilisé principalement deux sondes en FISH-TSA, l'une caractéristique de la « lignée verte » (Chlorophyta) et l'autre caractéristique de la « lignée rouge » (Haptophyta). L'évaluation des contributions de ces deux groupes dans les différents milieux étudiés et les différentes classes de taille nous a permis de répondre à la question de la dominance de la « lignée verte » ou de la « lignée rouge » dans un nombre restreint de cas, en particulier pour les plus petites fractions de taille. Ces lignées sont composées d'autres groupes comme les Euglenophyta et les Chlorarachniophyta pour la « lignée verte » et les Cryptophyta et les Stramenopiles pour la « lignée rouge ». L'utilisation de sondes caractéristiques de ces autres groupes permettrait d'avoir une image plus complète de la dominance de l'une ou de l'autre lignée dans les différentes fractions de taille.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Agawin, N.S.R., Duarte, C.M., Agusti, S., 2000. Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography* 45:1891
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402
- Amann, R., Fuchs, B.M., 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology* 6:339-348
- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172:762-770
- Andersen, R.A., Bidigare, R.R., Keller, M.D., Latasa, M., 1996. A comparison of HPLC pigment signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the North Atlantic and Pacific Oceans. *Deep-Sea Research Part II* 43:517-537
- Andersen, R.A., Potter, D., Craig Bailey, J., 2002. *Pinguicoccus pyrenoidosus* gen. et sp. nov. (Pinguiphyceae), a new marine coccoid alga. *Phycological Research* 50:57-65
- Andersen, R.A., Saunders, G.W., Paskind, M.P., Sexton, J., 1993. Ultrastructure and 18S rRNA gene sequence for *Pelagomonas calceolata* gen. and sp. nov. and the description of a new algal class, the Pelagophyceae *classis nov.* *Journal of Phycology* 29:701-715
- Andreoli, C., Rascio, N., Casador, G., 1978. *Chlorella nana* sp. nov. (Chlorophyceae): a new marine *Chlorella*. *Botanica Marina* 21:253-256
- Backe-Hansen, P., Throndsen, J., 2002. Occurrence of pico- and smaller nanoplanktonic flagellates in the inner Oslofjord, eastern Norway, during the breeding season of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Sarsia* 87:65-74
- Baker, J.W., Grover, J.P., Brooks, B.W., Urena-Boeck, F., Roelke, D.L., Errera, R., Kiesling, R.L., 2007. Growth and toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) as a function of salinity, light, and temperature. *Journal of Phycology* 43:219-227
- Bell, T., Kalff, J., 2001. The contribution of picophytoplankton in marine and freshwater systems of different trophic status and depth. *Limnology and Oceanography* 46:1243-1248
- Biegala, I.C., Not, F., Vaultot, D., Simon, N., 2003. Quantitative assessment of picoeukaryotes in the natural environment by using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 69:5519-5529
- Binder, B.J., Chisholm, S.W., Olson, R.J., Frankel, S.L., Worden, A.Z., 1996. Dynamics of picophytoplankton, ultraphytoplankton and bacteria in the central equatorial Pacific. *Deep-Sea Research Part II* 43:907-931
- Blanchot, J., Andre, J.M., Navarette, C., Neveux, J., Radenac, M.H., 2001. Picophytoplankton in the equatorial Pacific: vertical distributions in the warm pool and in the high nutrient low chlorophyll conditions. *Deep-Sea Research Part I* 48:297-314
- Booth, B.C., Marchant, H.J., 1987. Parmales, a new order of marine chrysophytes, with descriptions of three new genera and seven new species. *Journal of Phycology* 23:245-260
- Boraas, M.E., Bolgrien, D.W., Holen, D.A., 1991. Determination of eubacterial and cyanobacterial size and number in Lake Baikal using epifluorescence. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie* 76:537-544

- Boucher, D., Jardillier, L., Debroas, D., 2006. Succession of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir. *FEMS Microbiology Ecology* 55:79-97
- Bravo, S.E., Hernandez, B.D.U., 2003. Parmales (Chrysophyceae) from the Gulf of Tehuantepec, Mexico, including the description of a new species, *Tetraparma insecta* sp. nov., and a proposal to the taxonomy of the group. *Journal of Phycology* 39:577-583
- Burns, C.W., Stockner, J.G., 1991. Picoplankton in six New Zealand lakes: abundance in relation to season and trophic state. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie* 76:523-536
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169-193
- Butcher, R., 1952. Contributions to our knowledge of the smaller marine algae. *Journal of the Marine Biological Association U.K.* 31:175-191
- Callieri, C., Stockner, J.G., 2002. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *Journal of Limnology* 61:1-14
- Campbell, L., Shapiro, L.P., Haugen, E., 1994. Immunochemical characterization of eukaryotic ultraplankton from the Atlantic and Pacific oceans. *Journal of Plankton Research* 16:35-51
- Caron, D.A., Peele, E.R., Lim, E.L., Dennett, M.R., 1999. Picoplankton and nanoplankton and their trophic coupling in surface waters of the Sargasso Sea south of Bermuda. *Limnology and Oceanography* 44:259-272
- Caron, D.A., Pick, F.R., Lean, D.R.S., 1985. Chroococcoid cyanobacteria in lake Ontario: vertical and seasonal distributions during 1982. *Journal of Phycology* 21:171-175
- Carreto, J.I., Montoya, N.G., Benavides, H.R., Guerrero, R., Carignan, M.O., 2003. Characterization of spring phytoplankton communities in the rio de la Plata maritime front using pigment signatures and cell microscopy. *Marine Biology* 143:1013-1027
- Carrias, J.F., Thouvenot, A., Amblard, C., Sime-Ngando, T., 2001. Dynamics and growth estimates of planktonic protists during early spring in Lake Pavin, France. *Aquatic Microbial Ecology* 24:163-174
- Chisholm, S.W., 2000. Oceanography - Stirring times in the Southern Ocean. *Nature* 407:685-687
- Chrétiennot-Dinet, M.J., Courties, C., Vaquer, A., Neveux, J., Claustre, H., Lautier, J., Machado, M.C., 1995. A new marine picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Phycologia* 34:285-292
- Countway, P.D., Caron, D.A., 2006. Abundance and distribution of *Ostreococcus* sp. in the San Pedro Channel, California, as revealed by quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 72:2496-2506
- Courties, C., Vaquer, A., Trousselier, M., Lautier, J., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Neveux, J., Machado, C., Claustre, H., 1994. Smallest eukaryotic organism. *Nature* 370:255
- Crosbie, N.D., Teubner, K., Weisse, T., 2003. Flow-cytometric mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton. *Aquatic Microbial Ecology* 33:53-66
- Dahl, E., Bagoien, E., Edvardsen, B., Stenseth, N.C., 2005. The dynamics of *Chrysochromulina* species in the Skagerrak in relation to environmental conditions. *Journal of Sea Research* 54:15-24
- Daugbjerg, N., Moestrup, O., Arctander, P., 1995. Phylogeny of genera of Prasinophyceae and Pedinophyceae (Chlorophyta) deduced from molecular analysis of the *Ircb L* gene. *Phycological Research* 43:203-213
- de Reviers, B., 1993. La classification des algues. *Biosystema* 10:59-111

- de Reviere, B., 2002. Biologie et phylogénie des algues-Tome 1, Vol. Editions Belin, Paris
- Delwiche, C.F., 1999. Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *American Naturalist* 154:S164-S177
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouze, P., Worden, A.Z., Robbens, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynie, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., Jabbari, K., Bowler, C., Panaud, O., Piegue, B., Ball, S.G., Ral, J.P., Bouget, F.Y., Piganeau, G., De Baets, B., Picard, A., Delseny, M., Demaille, J., Van de Peer, Y., Moreau, H., 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:11647-11652
- Detmer, A.E., Bathmann, U.V., 1997. Distribution patterns of autotrophic pico- and nanoplankton and their relative contribution to algal biomass during spring in the Atlantic sector of the Southern Ocean. *Deep-Sea Research Part II* 44:299-320
- DeYoe, H.R., Stockwell, D.A., Bidigare, R.R., Latasa, M., Johnson, P.W., Hargraves, P.E., Suttle, C.A., 1997. Description and characterization of the algal species *Aureoumbra lagunensis* gen. et sp. nov. and referral of *Aureoumbra* and *Aureococcus* to the Pelagophyceae. *Journal of Phycology* 33:1042-1048
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T.L., Massana, R., 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2942-2951
- Dohet, A., Hoffmann, L., 1995. Seasonal succession and spatial distribution of the zooplankton community in the reservoir of the Haute-Sûre (Luxembourg). *Belgian Journal of Zoology* 125:109-123
- Dufresne, A., Salanoubat, M., Partensky, F., Artiguenave, F., Axmann, I.M., Barbe, V., Duprat, S., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Le Gall, F., Makarova, K.S., Ostrowski, M., Oztas, S., Robert, C., Rogozin, I.B., Scanlan, D.J., de Marsac, N.T., Weissenbach, J., Wincker, P., Wolf, Y.I., Hess, W.R., 2003. Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10020-10025
- DuRand, M.D., Olson, R.J., Chisholm, S.W., 2001. Phytoplankton population dynamics at the Bermuda Atlantic Time-series station in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Research Part II* 48:1983-2003
- Edwardsen, B., Eikrem, W., Green, J.C., Andersen, R.A., Der Staay, S., Medlin, L.K., 2000. Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. *Phycologia* 39:19-35
- Eikrem, W., Romari, K., Latasa, M., Le Gall, F., Throndsen, J., Vaultot, D., 2004. *Florenciella parvula* gen. and sp. nov. (Dictyochophyceae, Heterokontophyta) a small flagellate isolated from the English Channel. *Phycologia* 43:658-668
- Eikrem, W., Throndsen, J., 1990. The ultrastructure of *Bathycoccus* gen. nov. and *B. prasinos* sp. nov., a non-motile picoplanktonic alga (Chlorophyta, Prasinophyceae) from the Mediterranean and Atlantic. *Phycologia* 29:344-350
- Estep, K.W., Davis, P.G., Hargraves, P.E., Sieburth, J.M., 1984. Chloroplast containing microflagellates in natural populations of North Atlantic nanoplankton: their identification and distribution; including a description of five new species of *Chrysochromulina*. *Protistologica*. 20:613-634
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., Taylor, F.J.R., 2004. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305:354-360

- Fawley, K.P., Fawley, M.W., 2007. Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. *Protist* 158:325-336
- Fawley, M.W., Fawley, K.P., Owen, H.A., 2005. Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itasca, Minnesota, USA, including *Meyerella planktonica*, gen. et sp. nov. *Phycologia* 44:35-48
- Fawley, M.W., Yun, Y., Qin, M., 2000. Phylogenetic analyses of 18s rDNA sequences reveal a new coccoid lineage of the Prasinophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 36:387-393
- Foulon, E., Not, F., Jalabert, F., Cariou, T., Massana, R., Simon, N., 2008. Ecological niche partitioning in the picoplanktonic green alga *Micromonas pusilla*: evidence from environmental surveys using phylogenetic probes. *Environmental Microbiology* 10:2433-2443
- Fuller, N.J., Campbell, C., Allen, D.J., Pitt, F.D., Le Gall, F., Vaultot, D., Scanlan, D.J., 2006. Analysis of photosynthetic picoeukaryote diversity at open ocean sites in the Arabian Sea using the PCR biased towards marine algal plastids. *Aquatic Microbial Ecology* 43:79-93
- Giovannoni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J., Pace, N.R., 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology* 170:720-726
- Gjosaeter, J., Lekve, K., Stenseth, N.C., Leinaas, H.P., Christie, H., Dahl, E., Danielssen, D.S., Edvardsen, B., Olsgard, F., Oug, E., Paasche, E., 2000. A long-term perspective on the *Chrysochromulina* bloom on the Norwegian Skagerrak coast 1988: A catastrophe or an innocent incident? *Marine Ecology-Progress Series* 207:201-218
- Gradinger, R., Lenz, J., 1989. Picocyanobacteria in the high Arctic. *Marine Ecology-Progress Series* 52:99-101
- Graham, L., Wilcox, L., 2000. *Algae*, Vol. Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River, NJ 07458
- Grob, C., Ulloa, O., Claustre, H., Huot, Y., Alarcon, G., Marie, D., 2007. Contribution of picoplankton to the total particulate organic carbon concentration in the eastern South Pacific. *Biogeosciences*: 837-852
- Grzebyk, D., Schofield, O., Vetriani, C., Falkowski, P.G., 2003. The mesozoic radiation of eukaryotic algae: The portable plastid hypothesis. *Journal of Phycology* 39:259-267
- Guillard, R.R.L., Keller, M.D., O' Kelly, C.J., Floyd, G.L., 1991. *Pycnococcus provasolii* gen. et sp. nov., a coccoid prasinolanthin-containing phytoplankton from the western North Atlantic and Gulf of Mexico. *Journal of phycology* 27:39-47
- Guillou, L., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Medlin, L.K., Claustre, H., Loiseaux-de Goër, S., Vaultot, D., 1999. *Bolidomonas*: a new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta). *Journal of Phycology* 35:368-381
- Guillou, L., Eikrem, W., Chrétiennot-Dinet, M.J., Le Gall, F., Massana, R., Romari, K., Pedros-Alio, C., Vaultot, D., 2004. Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist* 155:193-214
- Guillou, L., Viprey, M., Chambouvet, A., Welsh, R.M., Kirkham, A.R., Massana, R., Scanlan, D.J., Worden, A.Z., 2008. Widespread occurrence and genetic diversity of marine parasitoids belonging to Syndiniales (Alveolata). *Environmental Microbiology* 10:3349-3365
- Hansen, L.R., Kristiansen, J., Rasmussen, J.V., 1994. Potential toxicity of the freshwater *Chrysochromulina* species *C. parva* (Prymnesiophyceae). *Hydrobiologia* 287:157-159

- Hasegawa, T., Miyashita, H., Kawachi, M., Ikemoto, H., Kurano, N., Miyachi, S., Chihara, M., 1996. *Prasinoderma coloniale* gen. et sp. nov., a new pelagic coccoid prasinophyte from the western Pacific ocean. *Phycologia* 35:170-176
- Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W., 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* 35:1-21
- Henley, W.J., Hironaka, J.L., Guillou, L., Buchheim, M.A., Buchheim, J.A., Fawley, M.W., Fawley, K.P., 2004. Phylogenetic analysis of the 'Nannochloris-like' algae and diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycologia* 43:641-652
- Hepperle, D., Krienitz, L., 2001. Systematics and ecology of chlorophyte picoplankton in German inland waters along a nutrient gradient. *International Review of Hydrobiology* 86:269-284
- Hepperle, D., Schlegel, I., 2002. Molecular diversity of eucaryotic picoalgae from three lakes in Switzerland. *International Review of Hydrobiology* 87:1-10
- Hindák, F., 1977. Studies on the Chlorococcal algae (Chlorophyceae). *Biologické Práce* 23:1-192
- Hori, T., Moestrup, O., Hoffman, L.R., 1995. Fine structural studies on an ultraplanktonic species of *Pyramimonas*, *P. virginica* (Prasinophyceae), with a discussion of subgenera within the genus *Pyramimonas*. *European Journal of Phycology* 30:219-234
- Hu, X.Y., Yin, M.Y., Tseng, C.K., 2005. Morphology of *Chrysochromulina planisquama* sp. nov. (Haptophyta, Prymnesiophyceae) isolated from Jiaozhou Bay, China. *Botanica Marina* 48:52-57
- Iglesias-Rodriguez, M.D., Brown, C.W., Doney, S.C., Kleypas, J., Kolber, D., Kolber, Z., Hayes, P.K., Falkowski, P.G., 2002. Representing key phytoplankton functional groups in ocean carbon cycle models: Coccolithophorids. *Global Biogeochemical Cycles* 16:20
- Jasser, I., 2002. Autotrophic picoplankton (APP) in four lakes of different trophic status: composition, dynamics and relation to phytoplankton. *Polish Journal of Ecology* 50:341-355
- Jeffrey, S.W., Zapata, M., 1999. Recent advances in HPLC pigments analysis of phytoplankton. *Marine and Freshwater Research* 50:879-896
- John, D.M., Whitton, B.A., Brook, A.J., 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles - An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*, Press syndicate of the University of Cambridge, Cambridge pp 702
- Jones, H.L.J., Leadbeater, B.S.C., Green, J.C., 1994. An ultrastructural study of *Marsupiomonas pelliculata* gen. et sp. nov., a new member of the Pedinophyceae. *European Journal of Phycology* 29:171-181
- Kalina, T., Punčochářová, M., 1987. Taxonomy of the subfamily Scotielloccystoideae Fott 1976 (Chlorellaceae, Chlorophyceae). *Archiv für Hydrobiologie, supplement (Algalogical Studies 45)* 73:473-521
- Kapaun, E., Reisser, W., 1995. A Chitin-Like Glycan in the Cell-Wall of a *Chlorella* sp (Chlorococcales, Chlorophyceae). *Planta* 197:577-582
- Karlson, B., Potter, D., Kuylenstierna, M., Andersen, R.A., 1996. Ultrastructure, pigment composition, and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), a marine ultraplankton isolated from the Skagerrak, northeast Atlantic Ocean. *Phycologia* 35:253-260
- Katz, M.E., Finkel, Z.V., Grzebyk, D., Knoll, A.H., Falkowski, P.G., 2004. Evolutionary trajectories and biogeochemical impacts of marine eukaryotic phytoplankton. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 35:523-556



- Kawachi, M., Atsumi, M., Ikemoto, H., Miyachi, S., 2002. *Pinguiochrysis pyriformis* gen. et sp. nov. (Pinguiophyceae), a new picoplanktonic alga isolated from the Pacific Ocean. *Phycological Research* 50:49-56
- Krienitz, L., Hepperle, D., Stich, H.B., Weiler, W., 2000. *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* 39:219-227
- Krienitz, L., Takeda, H., Hepperle, D., 1999. Ultrastructure, cell wall composition, and phylogenetic position of *Pseudodictyosphaerium jurisii* (Chlorococcales, Chlorophyta) including a comparison with other picoplanktonic green algae. *Phycologia* 38:100-107
- Kuylenstierna, M., Karlson, B., 1994. Seasonality and composition of pico- and nanoplanktonic cyanobacteria and protists in the Skagerrak. *Botanica marina* 37:17-33
- Lefranc, M., Thenot, A., Lepere, U., Debroas, D., 2005. Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5935-5942
- Legendre, L., Robineau, B., Leblanc, B., Charpy-Loic, e., Larkum-A-W-D, e., 1999. Single-celled cyanobacteria in the first-year sea ice and ice-covered waters of the Northern Hemisphere. *Marine Cyanobacteria. Bulletin de l'Institut océanographique Monaco (NS19):169-174*
- Lepère, C., Domaizon, I., Debroas, D., 2008. Unexpected importance of potential parasites in the composition of freshwater small-eukaryotes community. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2940-2949
- Lewin, R.A., Krienitz, L., Goericke, R., Takeda, H., Hepperle, D., 2000. *Picocystis salinarum* gen. et sp. nov. (Chlorophyta) - a new picoplanktonic green alga. *Phycologia* 39:560-565
- Li, W.K.W., 1995. Composition of ultraphytoplankton in the central North Atlantic. *Marine Ecology-Progress Series* 122:1-8
- Lim, E.L., Amaral, L.A., Caron, D.A., DeLong, E.F., 1993. Application of rRNA-based probes for observing nanoplanktonic protists. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1647-1655
- Lim, E.L., Dennett, M.R., Caron, D.A., 1999. The ecology of *Paraphysomonas imperforata* based on studies employing oligonucleotide probe identification in coastal water samples and enrichment cultures. *Limnology and Oceanography* 44:37-51
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4516-4522
- Lovejoy, C., Vincent, W.F., Bonilla, S., Roy, S., Martineau, M.J., Terrado, R., Potvin, M., Massana, R., Pedros Alio, C., 2007. Distribution, phylogeny, and growth of cold-adapted picoprasinophytes in arctic seas. *Journal of Phycology* 43:78-89
- Malin, G., Steinke, M., 2004. Dimethyl sulfide production: what is the contribution of the coccolithophores? In: Thierstein HR, Young JR (eds) *Coccolithophores: From the Molecular Processes to Global Impact*. Springer Verlag, New York, p 127-164
- Malinsky-Rushansky, N., Berman, T., Dubinsky, Z., 1997. Seasonal photosynthetic activity of autotrophic picoplankton in Lake Kinneret, Israel. *Journal of Plankton Research* 19:979-993
- Manton, I., 1975. Observations on the microanatomy of *Scourfieldia marina* Thronsen and *Scourfieldia caeca* (Korsch.) Belcher et Swale. *Archiv Für Hydrobiologie* 117:358-368

- Manton, I., Parke, M., 1960. Further observations on small green flagellates with special reference to possible relatives of *Chromulina pusilla* Butcher. *Journal of the Marine Biological Association U.K.* 39:275-298
- Marie, D., Brussaard, C.P.D., Partensky, F., Vaulot, D., 1999. Flow cytometric analysis of phytoplankton, bacteria and viruses. *Current Protocols in Cytometry*, Vol 11.11 p 1-15
- Marie, D., Zhu, F., Balague, V., Ras, J., Vaulot, D., 2006. Eukaryotic picoplankton communities of the Mediterranean Sea in summer assessed by molecular approaches (DGGE, TTGE, QPCR). *FEMS Microbiology Ecology* 55:403-415
- Marino, D., Giuffrè, G., Montresor, M., Zingone, A., 1991. An electron microscope investigation on *Chaetoceros minimus* (Levander) comb. nov. and new observations on *Chaetoceros thronsdensei* (Marino, Montresor and Zingone) comb. nov. *Diatom Research* 6:317-326
- Massana, R., Balagué, V., Guillou, L., Pedrós-Alió, C., 2004. Picoeukaryotic diversity in an oligotrophic coastal site studied by molecular and culturing approaches. *FEMS Microbiology Ecology* 50:231-243
- Medlin, L.K., Elwood, H.J., Stickel, S., Sogin, M.L., 1991. Morphological and genetic variation within the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta): evidence for a new species, *Skeletonema pseudocostatum*. *Journal of Phycology* 27:514-524
- Medlin, L.K., Metfies, K., Mehl, H., Wiltshire, K.H., Valentin, K., 2006. Picoeukaryotic plankton diversity at the Helgoland Time Series site as assessed by three molecular methods. *Microbial Ecology* 52:53-71
- Melkonian, M., 1990. Phylum Chlorophyta. Introduction to the Chlorophyta. Class Prasinophyceae. Class Chlorophyceae. Chlorophyte orders of uncertain affinities. Order Pedinomoladales. Order Microthamniales. In: Margulis Lea, McKhann Hlec (eds) *Handbook of protozoista*. Jones & Bartlett Publ., Boston, p 597-654
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L.H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.P., Riaño-Pachón, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martínez, D., Ngau, W.C., Otilar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., Grossman, A.R., 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318:245-250
- Miyashita, M., Ikemoto, H., Kurano, N., Miyachi, S., Chihara, M., 1993. *Prasinococcus capsulatus* gen. et sp. nov., a new marine coccoid Prasinophyte. *Journal of General and Applied Microbiology* 39:571-582

- Moestrup, O., Thomsen, H.A., 1986. Ultrastructure and reconstruction of the flagellar apparatus in *Chrysochromulina apheles* sp. nov. (Prymnesiophyceae = Haptophyceae). Canadian Journal of Botany 64:593-610
- Moon-van der Staay, S.Y., De Wachter, R., Vaultot, D., 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. Nature 409:607-610
- Moon-van der Staay, S.Y., Van Der Staay, G.W.M., Guillou, L., Vaultot, D., Claustre, H., Medlin, L.K., 2000. Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. Limnology and Oceanography 45:98-109
- Morel, A., Gentili, B., Claustre, H., Babin, M., Bricaud, A., Ras, J., Tieche, F., 2007. Optical properties of the "clearest" natural waters. Limnology and Oceanography 52:217-229
- Munavar, M., Fahnenstiel, G.L., 1982. The abundance and significance of ultraplankton and microalgae at an offshore station in central Lake Superior. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 1153:1-13
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 59:695-700
- Nägeli, C., 1849. Gattungen einzelliger Algen. Neue Denkschriften der Verhandlungen der Allgemeinen Schweizerischen Gesellschaft für die Gesamten. Naturwissenschaften 10:1-139
- Nakayama, T., Marin, B., Kranz, H.D., Sureck, B., Huss, V.A.R., Inouye, I., Melkonian, M., 1998. The basal position of scaly green flagellates among the green algae (Chlorophyta) is revealed by analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences. Protist 149:367-380
- Naumann, E., 1919. Notizen zur Systematik der Süßwasseralgen. V. Über *Nannochloris*, eine neue Chlorophyceegattung. Arkiv für Botanik 16:16-19
- Nemcova, Y., Kalina, T., 2000. Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Archiv für Hydrobiologie Supplement and Algological studies 136:95-105
- Nicholls, K.H., Beaver, J.L., Estabrook, R.H., 1982. Lakewide odours in Ontario and New Hampshire caused by *Chrysochromulina breviturrita* Nich. (Prymnesiophyceae). Hydrobiologia 96:91-95
- Norton, T.A., Melkonian, M., Andersen, R.A., 1996. Algal biodiversity. Phycologia 35:308-326
- Not, F., Latasa, M., Marie, D., Cariou, T., Vaultot, D., Simon, N., 2004. A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the Western English Channel. Applied and Environmental Microbiology 70:4064-4072
- Not, F., Latasa, M., Scharek, R., Viprey, M., Karleskind, P., Balague, V., Ontoria-Oviedo, I., Cumino, A., Goetze, E., Vaultot, D., Massana, R., 2008. Protistan assemblages across the Indian Ocean, with a specific emphasis on the picoeukaryotes. Deep-Sea Research Part I 55: 1456-1473
- Not, F., Massana, R., Latasa, M., Marie, D., Colson, C., Eikrem, W., Pedros-Alio, C., Vaultot, D., Simon, N., 2005. Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas. Limnology and Oceanography 50:1677-1686
- Not, F., Valentin, K., Romari, K., Lovejoy, C., Massana, R., Tobe, K., Vaultot, D., Medlin, L.K., 2007. Picobiliphytes: A marine picoplanktonic algal group with unknown affinities to other eukaryotes. Science 315:253-255

- Ogier, S., 1999. Diagenèse précoce en domaine lacustre: étude des composés minéraux et organiques des sédiments récents du lac Aydat (Puy de Dôme, France). Thèse de Doctorat es sciences. Thèse de Doctorat es sciences, Université d'Orléans
- Palenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F.W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, W., Allen, E.E., McCarren, J., Paulsen, I., Dufresne, A., Partensky, F., Webb, E.A., Waterbury, J., 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* 424:1037-1042
- Palenik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouze, P., Salamov, A., Putnam, N., Dupont, C., Jorgensen, R., Derelle, E., Rombauts, S., Zhou, K.M., Otilar, R., Merchant, S.S., Podell, S., Gaasterland, T., Napoli, C., Gendler, K., Manuell, A., Tai, V., Vallon, O., Piganeau, G., Jancek, S., Heijde, M., Jabbari, K., Bowler, C., Lohr, M., Robbens, S., Werner, G., Dubchak, I., Pazour, G.J., Ren, Q.H., Paulsen, I., Delwiche, C., Schmutz, J., Rokhsar, D., Van de Peer, Y., Moreau, H., Grigoriev, I.V., 2007. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:7705-7710
- Partensky, F., Blanchot, J., Vaulot, D., 1999. Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. In: Charpy L, Larkum AWD (eds) *Marine Cyanobacteria*. Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco. Numéro spécial 19, p 457-475
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R., 2004. Sensitive multi-color fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms. In: *Molecular Microbial Ecology Manual* 3: 711-726
- Pröschold, T., Harris, E.H., Coleman, A.W., 2005. Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 170:1601-1610
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W.G., Peplies, J., Glockner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35:7188-7196
- Raven, J.A., 1998. The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Functional Ecology* 12:503-513
- Reid, P.C., Lancelot, C., Gieskes, W.W.C., Hagmeier, E., Weichart, G., 1990. Phytoplankton of the North Sea and its dynamics: a review. *Netherlands Journal of Sea Research* 26:295-331
- Reid, P.C., Taylor, A.H., Stephens, J.A., 1988. The hydrography and hydrographic balances of the North Sea. In: Salomons W, Blayne BL, Duursma EK, Förstner U (eds) *Pollution of the North Sea: an Assesment*. Springer Verlag
- Rocap, G., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N.A., Arellano, A., Coleman, M., Hauser, L., Hess, W.R., Johnson, Z.I., Land, M., Lindell, D., Post, A.F., Regala, W., Shah, M., Shaw, S.L., Steglich, C., Sullivan, M.B., Ting, C.S., Tolonen, A., Webb, E.A., Zinser, E.R., Chisholm, S.W., 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424:1042-1047
- Rodríguez, F., Feist, S.W., Guillou, L., Harkestad, L.S., Bateman, K., Renault, T., Mortensen, S., 2008. Phylogenetic and morphological characterisation of the green algae infesting blue mussel *Mytilus edulis* in the North and South Atlantic oceans. *Diseases of Aquatic Organisms* 81:231-240
- Romari, K., Vaulot, D., 2004. Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. *Limnology and Oceanography* 49:784-798

- Sarno, D., Kooistra, W., Medlin, L.K., Percopo, I., Zingone, A., 2005. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *Journal of Phycology* 41:151-176
- Schoemann, V., Becquevort, S., Stefels, J., Rousseau, W., Lancelot, C., 2005. *Phaeocystis* blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: a review. *Journal of Sea Research* 53:43-66
- Sieburth, J.M., Smetacek, V., Lenz, J., 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography* 23:1256-1263
- Simon, N., Campbell, L., Ornlófsdóttir, E., Groben, R., Guillou, L., Lange, M., Medlin, L.K., 2000. Oligonucleotide probes for the identification of three algal groups by dot blot and fluorescent whole-cell hybridization. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 47:76-84
- Simon, N., LeBot, N., Marie, D., Partensky, F., Vault, D., 1995. Fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2506-2513
- Simpson, P.D., Vanvalkenburg, S.D., 1978. Ultrastructure of *Mychonastes Ruminatus* gen. et sp. nov., a New Member of Chlorophyceae Isolated from Brackish Water. *British Phycological Journal* 13:117-130
- Skuja, H., 1948. Taxonomie des Phytoplanktons einiger Seen in Uppland, Schweden. *Symbolae Botanicae Upsaliensis* 9:1-399
- Šlapeta, J., Moreira, D., Lopez Garcia, P., 2005. The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 272:2073-2081
- Smith, G.M., 1920. Phytoplankton of the inland lakes of Wisconsin, Part I. *Bulletin of the Wisconsin Geological and Natural History Survey* 57:1-243
- Stein, F., 1878. *Der organismus der infusionsthier. III Die Naturgeschichte der Flagellatenoder Geisselinfusoria. I Hälfte.* Engelmann W., Leipzig.
- Stockner, J., Callieri, C., Cronberg, G., 2000. Picoplankton and other non-bloom forming cyanobacteria in lakes. In: Whitton B, Potts M (eds) *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space.* Kluwer Academic Publishers, p 195-238
- Stockner, J.G., 1991. Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems: the view from the summit. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie* 76:483-492
- Suda, S., Atsumi, M., Miyashita, H., 2002. Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41:273-279
- Sym, S.D., Pienaar, R.N., 1993. The class Prasinophyceae. *Progress in Phycological Research* 9:281
- Tell, G., 1979. Remarks on the Genus *Choricystis* (Chlorophyceae). *Schweizerische Zeitschrift Fur Hydrologie-Swiss Journal of Hydrology* 41:150-154
- Thomsen, H.A., 1980. Two species of *Trigonaspis* gen. nov. (Prymnesiophyceae) from West Greenland. *Phycologia* 19:218-229
- Thomsen, H.A., 1986. A survey of the smallest eucaryotic organisms of the marine phytoplankton. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences* 214:121-158
- Thomsen, H.A., Bjorn, P.D.P., Hojlund, L., Olesen, J., Federsen, J.B., 1995. *Ericiolus* gen. nov. (Prymensiophyceae); a new coccolithophorid genus from polar and temperate regions. *European Journal of Phycology* 30:29-34

- Thronsdén, J., 1969. Flagellates of Norwegian coastal waters. *Nytt Magasin for Botanik* 16:161-216
- Thronsdén, J., Zingone, A., 1997. *Dolichomastix tenuilepis* sp. nov., a first insight into the microanatomy of the genus *Dolichomastix* (Mamiellales, Prasinophyceae, Chlorophyta). *Phycologia* 36:244-254
- Thurman, H.V., Trujillo, A.P., 1999. *Essentials of Oceanography*, Vol, New Jersey
- Valentin, K., Mehl, H., Medlin, L.K., 2005. Picoplankton culture assessment using single strand conformation polymorphism and partial 18S sequencing. *Journal of Plankton Research* 27:1149-1154
- Vaulot, D., 1989. CYTOPC: Processing software for flow cytometric data. *Signal and Noise* 2:8
- Vaulot, D., Eikrem, W., Viprey, M., Moreau, H., 2008. The diversity of small eukaryotic phytoplankton (< 3 µm) in marine ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*: 1-26
- Vaulot, D., Le Gall, F., Marie, D., Guillou, L., Partensky, F., 2004. The Roscoff Culture Collection (RCC): a collection dedicated to marine picoplankton. *Nova Hedwigia* 79:49-70
- Veldhuis, M.J.W., Timmermans, K.R., Croot, P., van der Wagt, B., 2005. Picophytoplankton; a comparative study of their biochemical composition and photosynthetic properties. *Journal of Sea Research* 53:7-24
- Verity, P.G., Brussaard, C.P., Nejstgaard, J.C., van Leeuwe, M.A., Lancelot, C., Medlin, L.K., 2007. Current understanding of *Phaeocystis* ecology and biogeochemistry, and perspectives for future research. *Biogeochemistry* 83:311-330
- Vincent, W.F., 2000. Cyanobacterial dominance in the polar regions. In: Whitton B, Potts M (eds) *The Ecology of Cyanobacteria: their diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers, p 321-340
- Viprey, M., Guillou, L., Ferréol, M., Vaulot, D., 2008. Wide genetic diversity of picoplanktonic green algae (Chloroplastida) in the Mediterranean Sea uncovered by a phylum-biased PCR approach. *Environmental Microbiology* 10:1804-1822
- Vörös, L., Callieri, C., V. B.K., Bertoni, R., Alvarez-Cobelas-Miguel, E., Reynolds-Colin-S, E., Sanchez-Castillo-Pedro, e., Kristiansen-Jorgen, 1998. Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Phytoplankton and trophic gradients. Hydrobiologia* 369-70:117-125
- Weisse, T., 1993. Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. In: Jones JG (ed) *Advances in Microbial Ecology* 13: 327-370
- Welsh, E.A., Liberton, M., Stockel, J., Loh, T., Elvitigala, T., Wang, C., Wollam, A., Fulton, R.S., Clifton, S.W., Jacobs, J.M., Aurora, R., Ghosh, B., Sherman, L., Smith, R.D., Wilson, R.K., Pakrasi, H.B., 2008. The genome of *Cyanothece* 51142, a unicellular diazotrophic cyanobacterium important in the marine nitrogen cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105
- West, G.S., 1916. *Algae I*, Vol. Cambridge University Press, Cambridge
- Wilhelm, C., Eisenbeis, G., Wild, A., Zahn, R., 1982. *Nanochlorum eucarytum*: a very reduced coccoid species of marine Chlorophyceae. *Zeitschrift für Naturforschung* 37c:107-114
- Willame, R., Thys, I., Jacquet, V., Verbank, M., Cauchie, H., Hoffmann, L., 2008. Environmental variables involved in the development of bloom-forming cyanobacteria in a mesoeutrophic reservoir. *Algological Studies* 126:227-247
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbial Review* 51:221-271
- Worden, A.Z., 2006. Picoeukaryote diversity in coastal waters of the Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* 43:165-175

- Zhu, F., Massana, R., Not, F., Marie, D., Vault, D., 2005. Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiology Ecology* 52:79-92
- Zingone, A., Borra, M., Brunet, C., Forlani, G., Kooistra, W., Procaccini, G., 2002. Phylogenetic position of *Crustomastix stigmatica* sp. nov. and *Dolichomastix tenuilepis* in relation to the Mamiellales (Prasinophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 38:1024-1039
- Zingone, A., Chrétiennot-Dinet, M.J., Lange, M., Medlin, L., 1999. Morphological and genetic characterization of *Phaeocystis cordata* and *P. jahnii* (Prymnesiophyceae), two new species from the Mediterranean Sea. *Journal of Phycology* 35:1322-1337
- Zingone, A., Percopo, I., Sims, P.A., Sarno, D., 2005. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). I. A reexamination of the type material of s. *costatum* with the description of s. *grevillei* sp. nov. *Journal of Phycology* 41:140-150
- Zubkov, M.V., Sleight, M.A., Burkill, P.H., 2000. Assaying picoplankton distribution by flow cytometry of underway samples collected along a meridional transect across the Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* 21:13-20

### **Sites internet**

Check Chimera : <http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimeras.cgi?su=SSU>

Equipe Plancton Océanique : <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/>

<http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html>

KeyDNAtools : <http://www.keydnatools.com>

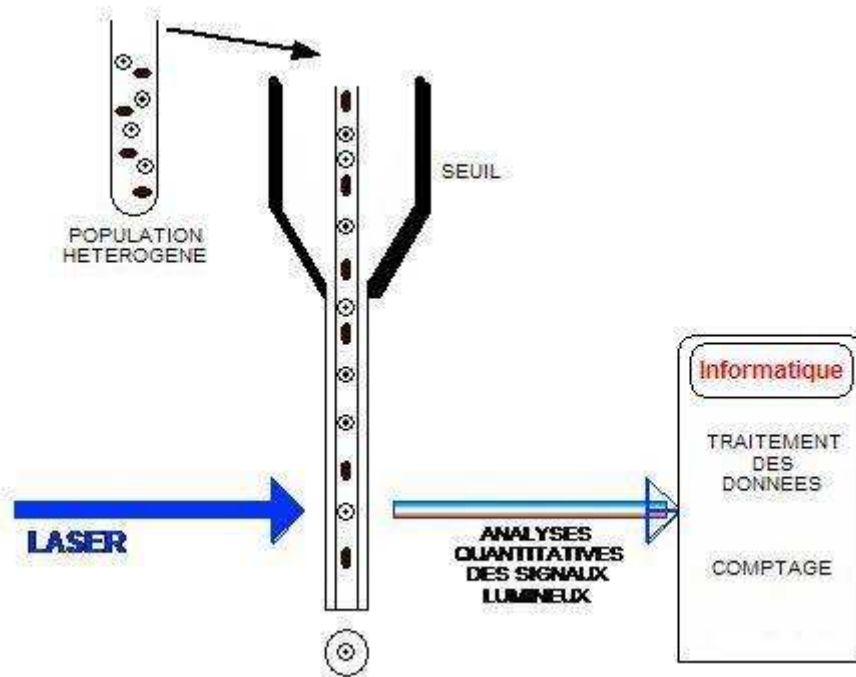
Ocean Data View : <http://odv.awi-bremerhaven.de/home.html>

Plateforme séquençage génotypage Ouest-génopole<sup>®</sup> : <http://www.sb-roscoff.fr/SG/>

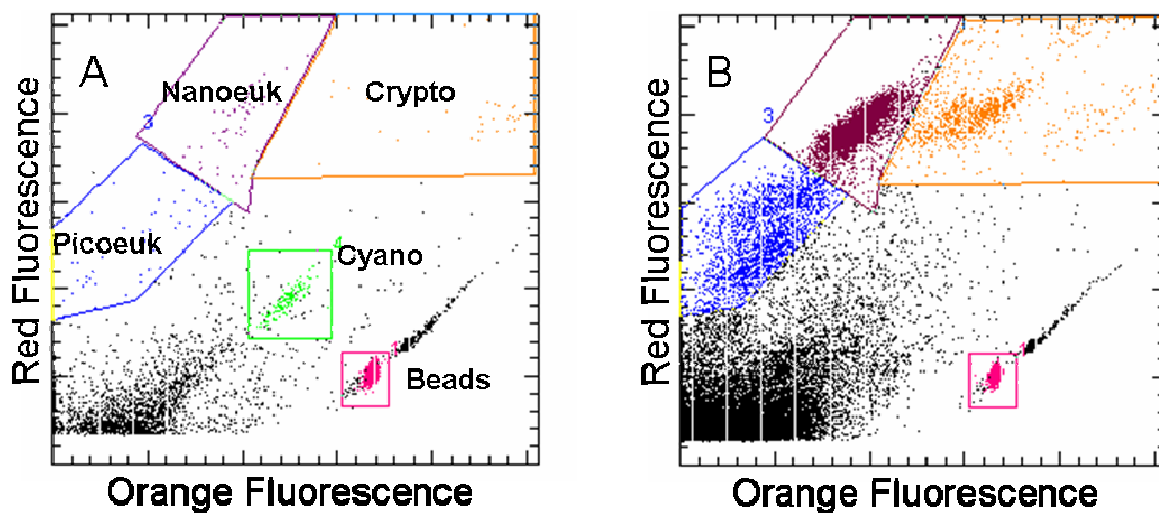
Wikipedia : <http://fr.wikipedia.org>

**ANNEXE I**  
**Méthodes utilisées**





**Figure AI-1 :** Schéma résumant le principe de la cytométrie en flux. Ce schéma est issu du site internet <http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html>.



**Figure AI-2 :** Cytogrammes obtenus après passage d'échantillons du 24 octobre 2006 à 5 m (A) et du 27 avril 2006 en surface (B) provenant du lac d'Esch-sur-Sûre. « Cyano » correspond à la population des picocyanobactéries, « Picoeuk » correspond à la population des picoeucaryotes autotrophes, « Nanoeuk » correspond à la population des nanoeucaryotes autotrophes, « Crypto » correspond à la population de cryptophytes et « Beads » correspond aux billes ajoutées dans l'échantillon pour la calibration.

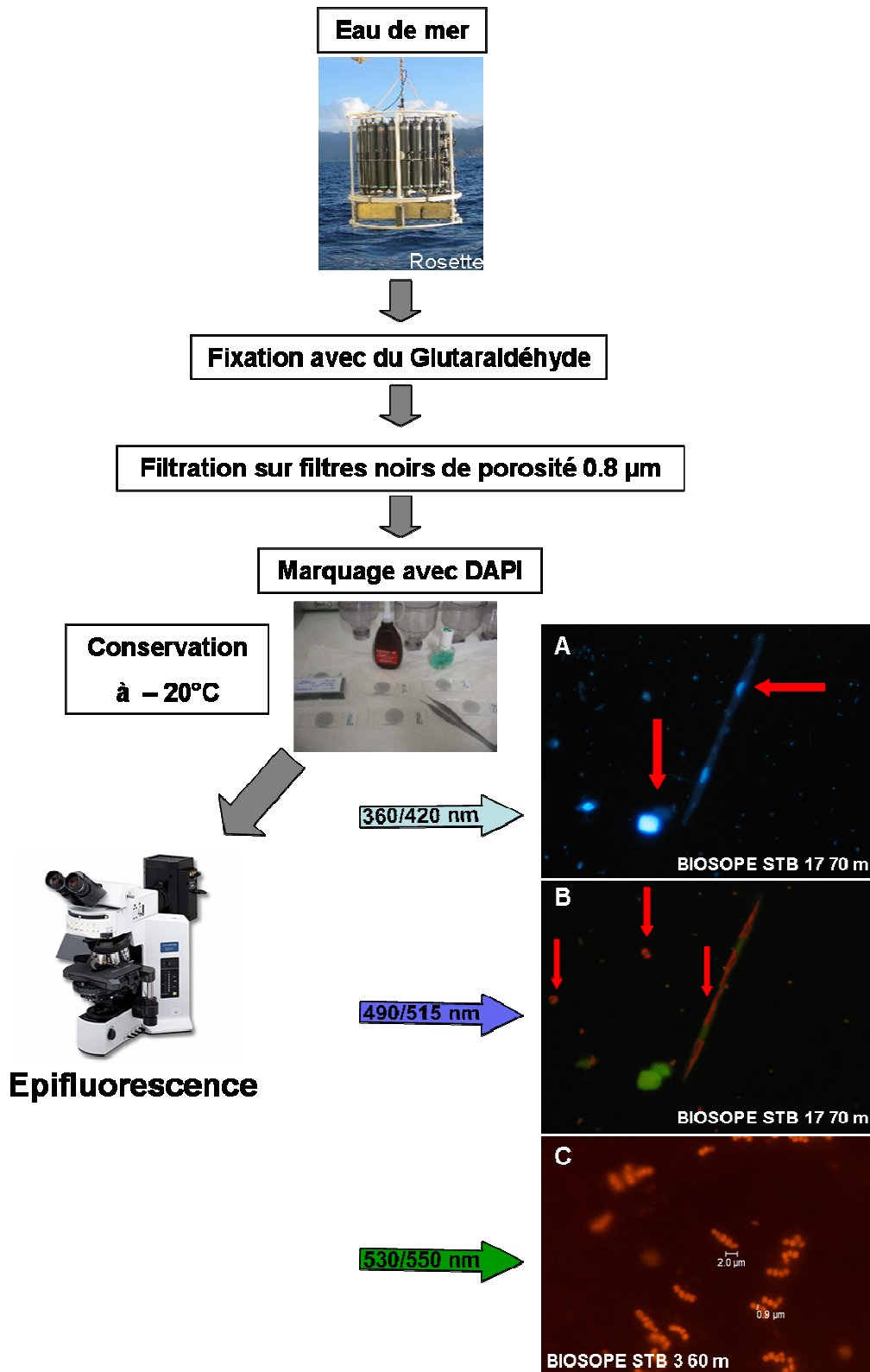
## A. I La cytométrie en flux

Au cours de ce travail, la cytométrie en flux a été utilisée pour l'analyse des échantillons d'eau douce. Les cellules présentes dans l'échantillon sont poussées par pression et envoyées une à une devant un (ou plusieurs) faisceau laser qui permet de mesurer ou d'évaluer des paramètres cellulaires (Figure A-1). La lumière diffractée mesurée dans l'axe du rayon laser permet d'évaluer la taille des cellules (paramètre FSC). La lumière diffractée, mesurée à 90° (paramètre SSC) donne une mesure de la structure de la cellule. L'analyse combinée des paramètres mesurés à partir des lumières diffractées et la fluorescence naturelle des pigments photosynthétiques (chlorophylle, phycoérythrine) permet l'identification de groupes d'organismes présentant des tailles et un contenu en pigments différents.

En pratique, des prélèvements d'eau (de mer ou d'eau douce suivant le milieu étudié) de 1,5 ml sont placés dans des cryotubes et sont soit directement analysés (c'était le cas pour les campagnes BIOSOPE et Microvir) ou fixés avec du glutaraldéhyde à 1‰ en concentration finale et stockés à -80°C jusqu'à l'analyse au laboratoire (c'était le cas pour les échantillons du lac d'Esch-sur-Sûre). Les mesures de cytométrie en flux réalisées au laboratoire, l'ont été dans les deux heures qui suivent la décongélation en utilisant un cytomètre en flux Becton-Dickinson de type FACSort. Le liquide d'entraînement est constitué d'eau de mer filtrée ou d'eau MQ pour les échantillons d'eau douce.

La calibration a été réalisée avec des billes de 0,95 µm (en rose sur la figure A-2). L'analyse finale pour l'identification et le dénombrement des populations a été réalisée en utilisant le logiciel Cytowin (Vaulot, 1989).

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux populations pico- et nanoplanctoniques. Au sein de ces populations, les picocyanobactéries (population verte sur la figure A-2) ont été discriminées des autres groupes de phytoplancton par leur autofluorescence orange due à la présence de phycoérythrine et plus particulièrement par le cytogramme « orange vs red fluorescence ». Les cellules de picophytoeucaryotes (population bleue sur la figure A-2) et nanophytoplancton (population violette sur la figure A-2) ont été discriminées par leur taille et leur autofluorescence rouge plus intense. Les cellules de cryptophytes ont été discriminées par leur autofluorescence orange et leur taille (population orange sur la figure A-2).



**Figure AI-3 :** Différentes étapes de la préparation et de l'observation des échantillons marqués au DAPI. Les photos (A) et (B) ont été prises sous UV et sous lumière bleue, respectivement à la station STB17 (70 m) de la campagne BIOSOPE. Sous UV, les noyaux des eucaryotes sont visibles (flèches rouges) (A). Sous lumière bleue, on observe l'autofluorescence rouge de la chlorophylle des organismes autotrophes (flèches rouges) (B). La photo (C) a été prise à la station STB3 (60 m) sous lumière verte mettant en évidence l'autofluorescence orange de la phycoérythrine des picocyanobactéries (C).

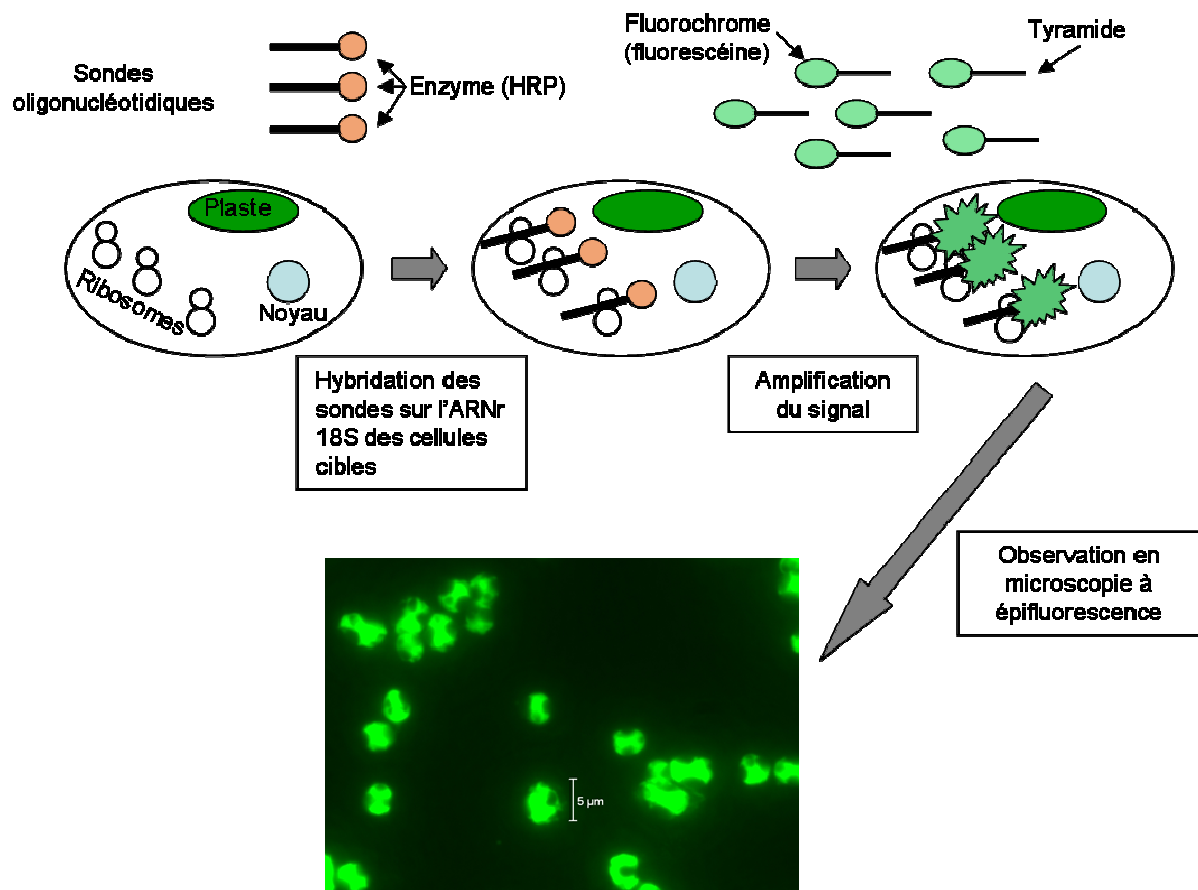
## A. II La microscopie à épifluorescence

Les observations faites au laboratoire ont été réalisées avec un microscope en épifluorescence Olympus BX51 équipé d'une lampe à mercure et d'un objectif UVFL 100x.

### A. II.1 Filtres marqués uniquement au DAPI

Au cours des campagnes BIOSOPE et Microvir, de l'eau de mer (100 mL) a été fixée au glutaraldéhyde (0,25 % en concentration finale) et filtrée sur membranes noires de porosité 0.8  $\mu\text{m}$ . Les échantillons ont été marqués au 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dont la concentration finale était de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  et stockés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse en laboratoire. Les principales étapes de la méthode sont résumées dans la figure A-3.

Le DAPI est un intercalant qui se lie à l'ADN et qui le colore en bleu lorsqu'il est observé sous UV (360/420 nm). Le marquage au DAPI permet de distinguer les cellules procaryotes des cellules eucaryotes. En effet, sous UV le noyau des cellules eucaryotes apparaît comme une organelle séparée de couleur bleue alors que les cellules procaryotes, ne possédant pas de noyau, apparaissent uniformément colorées (Figure A-3A). L'observation des échantillons sous lumière bleue (490/515 nm) permet, de part l'autofluorescence naturelle rouge de la chlorophylle, de séparer les organismes autotrophes (photosynthétiques) des organismes hétérotrophes qui apparaissent verts (Figure A-3B). Les organismes contenant de la phycoérythrine comme les cyanobactéries (procaryotes) et les cryptophytes (eucaryotes) peuvent être discriminés par leur autofluorescence orange émise sous lumière verte (530/550 nm) (Figure A-3C).



**Figure AI-4 :** Différentes étapes de l'hybridation *in situ* fluorescente couplée à l'amplification du signal (TSA) par réaction enzymatique entre l'HRP et la tyramide (son substrat). La photo correspond à une culture de *Pavlova lutheri* hybridée avec la sonde Euk1209.

**Tableau AI-1 :** Sondes oligonucléotidiques utilisées dans ce travail

Nom de la sonde	Séquence	Groupe ciblé	Référence
EUK1209	5'-GGGCATCACAGACCTG-3'	Eucaryotes	Giovannoni et al 1988; Lim et al. 1993
CHLO01	5'-GCTCCACGCCTGGTGGTG-3'	La plupart des Chlorophyta et quelques Non-Chlorophyta	Simon et al. 1995
NCHLO01	5'-GCTCCACTCCTGGTGGTG-3'	La plupart des Non-Chlorophyta et quelques Chlorophyta	Simon et al. 1995
CHLO02	5'-CTTCGAGCCCCCAACTTT-3'	Chlorophyta	Simon et al. 2000
PRYM02	5'-GGAATACGAGTGCCCCTGAC-3'	Haptophyta	Simon et al. 2000
PRAS04	5'-CGTAAGCCCGCTTTGAAC-3'	Mamiellales (sauf le genre <i>Dolichomastix</i> )	Not et al. 2004
MICRO01	5'-AATGGAACACCGCCGCG-3'	<i>Micromonas pusilla</i>	Not et al. 2004

## A. II.2 FISH-TSA

Cette technique a été utilisée sur les échantillons BIOSOPE, Microvir et d'eau douce (lacs d'Esch-sur-Sûre, Pavin, du Bourget et Aydat). La technique d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) est une technique qui permet d'identifier et de quantifier les cellules ciblées par des sondes oligonucléotidiques spécifiques (Amann et al. 1990). Dans le cadre de l'étude des communautés picoplanctoniques d'échantillons naturels, l'amplification du signal par l'utilisation du « Tyramide Signal Amplification » (TSA) couplé à l'enzyme « Horse Radish Peroxidase » (HRP) est nécessaire à cause des faibles signaux obtenus lors de la seule utilisation de la méthode FISH (Biegala et al. 2003). Les principales étapes de la méthode sont résumées dans la figure A-4.

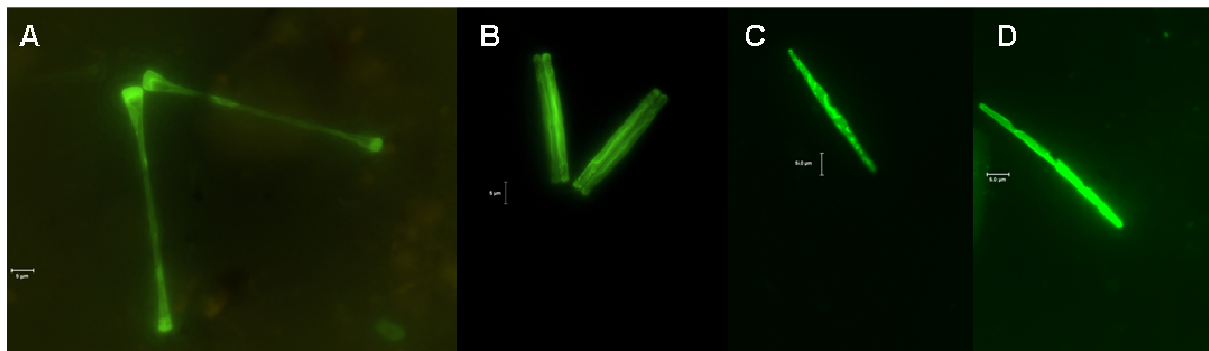
En pratique, les échantillons (45 mL à 90 mL) ont été fixés au paraformaldéhyde (1 % en concentration finale), puis filtrés sur des membranes Anodisc de porosité 0,2 µm (Whatman). Les filtres ont ensuite été déshydratés dans trois bains successifs d'éthanol 50 %, 80 % et 100 % (3 minutes dans chaque bain). Les filtres ont été conservés à – 80°C jusqu'à l'analyse.

Les sondes oligonucléotidiques utilisées au cours de ce travail sont présentées dans le tableau A-1. Les sondes Euk1209, Chlo01 et NChlo01 ont été utilisés en mélange afin de cibler tous les eucaryotes présents dans les échantillons. Les sondes Chlo02, Prym02, Pras04 et Micro01 ont été utilisées afin de cibler les Chlorophyta, les Haptophyta, les Mamiellales et l'espèce picophytoplanctonique *Micromonas pusilla*, respectivement.

Avant l'étape d'hybridation, les filtres ont été trempés dans une solution d'agarose « low melting point » 0,2 % (w : v), séchés à 35 °C et déshydratés dans un bain d'éthanol 96 % pendant 1 minute afin d'éviter toute perte de cellules durant l'étape de perméabilisation. Une solution de cellulase (15 mg mL<sup>-1</sup>) a alors été déposée sur les filtres qui ont ensuite été incubés à 37 °C pendant 10 min dans une chambre humide. Cette étape a été rajoutée afin de permettre une perméabilisation d'une partie des cellules plus réfractaires à l'entrée des sondes, comme c'est par exemple le cas des Eustigmatophyceae (paragraphe suivant). Une fois secs, les filtres sont coupés en quartier. Pour limiter le bruit de fond, chaque bout de filtre a d'abord été incubé avec 10 µl de tampon d'hybridation (40 % formamide désionisé, NaCl 0,9 M, Tris-HCl 20mM pH 7,5, SDS 0,01 %, agent bloquant 10 % [Roche Diagnostic Boehringer]) à 35 °C durant 30 minutes en chambre humide. Pour l'hybridation, 9 µL de tampon d'hybridation sont ajoutés à 1 µL de sonde à 50 ng µL<sup>-1</sup> (ou 1 µL de chaque sonde

**Tableau AI-2** : Résultats des hybridations réalisées avec les sondes oligonucléotidiques utilisées dans ce travail sur 27 cultures de la RCC. Le signe – correspond à une absence d’hybridation. Le signe + correspond à une hybridation. Le ? correspond à la présence de quelques positifs. Le premier symbole correspond au résultat obtenu. Le deuxième symbole correspond au résultat attendu. La coloration jaune correspond aux faux positifs pouvant affecter l’interprétation des résultats. La coloration bleue claire correspond aux faux négatifs.

RCC	Class	Genus	Species	EUK1209	CHLO01	NCHLO01	CHLO02	PRAS04	PRYM02
508	Cyanophyceae	<i>Synechococcus</i>	sp.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
287	Prasinophyceae	Unknown clade VII		+/+	+/+	?/-	+/+	-/-	-/-
696	Prasinophyceae	Unknown clade VII		+/+	?/+	-/-	?/+	-/-	-/-
114	Prasinophyceae	<i>Micromonas</i>	<i>pusilla</i>	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-
745	Prasinophyceae	<i>Ostreococcus</i>	<i>tauri</i>	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-
136	Prasinophyceae	<i>Prasinococcus</i>	sp.	+/+	+/+	+/-	+/+	-/-	-/-
135	Prasinophyceae	<i>Pycnococcus</i>	<i>provasolii</i>	+/+	+/+	-/-	+/+	?/-	-/-
289	Trebouxiophyceae	<i>Picochlorum</i>	sp.	-/+	?/+	-/-	?/+	-/-	-/-
7	Trebouxiophyceae	<i>Nannochloris</i>	<i>atomus</i>	?/+	?/+	?/-	?/+	-/-	-/-
396	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella</i>	sp.	-/+	?/+	-/-	?/+	-/-	-/-
6	Chlorophyceae	<i>Dunaliella</i>	<i>tertiolecta</i>	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	+/-
76	Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira</i>	<i>weissflogii</i>	+/+	+/-	+/+	+/-	+/-	?/-
70	Bacillariophyceae	<i>Skeletonema</i>	<i>costatum</i>	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-
192	Prymnesiophyceae	<i>Emiliana</i>	<i>huxleyi</i>	+/+	+/-	+/+	-/-	-/-	+/+
425	Prymnesiophyceae	<i>Imantonia</i>	<i>rotunda</i>	+/+	-/-	+/+	?/-	-/-	+/+
180	Pavlovophyceae	<i>Pavlova</i>	<i>lutheri</i>	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+
100	Pelagophyceae	<i>Pelagomonas</i>	<i>calceolata</i>	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-
97	Pelagophyceae	<i>Aureoumbra</i>	<i>lagunensis</i>	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-
20	Cryptophyceae	<i>Rhodomonas</i>	<i>salina</i>	+/+	-/-	+/+	+/-	-/-	-/-
659	Cryptophyceae	<i>Hemiselmis</i>	sp.	+/+	+/-	+/+	+/-	-/-	-/-
92	Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis</i>	<i>salina</i>	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-
438	Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis</i>	<i>granulata</i>	-/+	-/-	?/+	-/-	-/-	-/-
205	Bolidophyceae	<i>Bolidomonas</i>	<i>pacifica</i>	+/+	+/-	+/+	-/-	-/-	-/-
623	Chlorarachniophyceae	<i>Bigelowiella</i>	<i>natans</i>	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+/-
620	Chrysophyceae	<i>Paraphysomonas</i>	sp.	+/+	-/-	+/+	+/-	-/-	-/-
446	Dictyochophyceae	<i>Florenciella</i>	<i>parvula</i>	+/+	-/-	+/+	+/-	-/-	-/-
88	Dinophyceae	<i>Amphidinium</i>	<i>carterae</i>	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-



**Figure AI-5** : Photos prises en épifluorescence d’échantillons du lac d’Esch-sur-Sûre (A : 22 février 17 m ; B : 27 juillet 10 m) et d’échantillons du Pacifique Sud-Est (C : STB1 60 m ; D : STB1 5 m) montrant l’hybridation non-spécifique des sondes Chlo02 (A et B) et Prym02 (C et D) sur des cellules de diatomées.

lorsqu'il s'agit du mélange de sondes « eucaryotes »). Les filtres sont ensuite incubés à 35 °C durant 3h en chambre humide.

Les sections de filtres sont ensuite transférés dans 5 mL de tampon de lavage (NaCl 56 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,01 %, Tris-HCl 20 mM pH 7,5), à 37 °C pendant deux fois 20 minutes. Puis, les filtres sont incubés dans un tampon d'équilibration TNT (Tween 20, NaCl, 150 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7,5) à température ambiante, à l'obscurité durant 15 min. Finalement, les filtres sont incubés avec 10 µL de solution TSA (un volume de dextran sulfate 40 %, un volume de diluent d'amplification, un volume de fluorescéine tyramide (FITC) pour 50 volumes de solution) dans le noir durant 30 minutes. C'est le temps nécessaire pour que se fasse l'amplification. Les filtres sont alors déposés dans un bain de tampon TNT à 55 °C pendant deux fois 20 minutes afin de stopper la réaction enzymatique et d'éliminer le dextran sulfate. Les filtres sont récupérés, rincés deux fois dans de l'eau distillée stérile et séchés à l'obscurité. Ils sont ensuite montés entre lame et lamelle avec de l'huile citifluor AF1 (agent « antifading ») et du DAPI (concentration finale de 5 µg mL<sup>-1</sup>). Les cellules hybridées sont observées en épifluorescence sous lumière bleue (490/515 nm) pour détecter la fluorescéine isothiocyanate (FITC).

Des tests ont été faits sur 27 cultures provenant de la « Roscoff Culture Collection » (RCC) afin de vérifier si les différentes sondes oligonucléotidiques utilisées dans ce travail hybridait bien les groupes d'organismes pouvant être rencontrés dans nos échantillons (Tableau A-2).

Dans certains cas, des hybridations ont été observées alors qu'elles n'étaient pas attendues. Les sondes Euk1209, Chlo01 et NChlo01 ayant été utilisées en mélange pour cibler tous les eucaryotes, les faux positifs observés avec chacune de ses trois sondes n'affecteront pas l'interprétation des résultats. Les faux positifs pouvant affecter l'interprétation des résultats concernent 9 souches sur 27. C'est le cas des cultures de *Rhodomonas salina*, *Hemiselmis* sp., *Paraphysomonas* sp. et *Florenciella parvula* montrant une hybridation significative (signal fluorescent fort et sur la majorité des cellules) avec la sonde Chlo02. De même, les sondes Pras04 et Prym02 hybrident les souches de *Pycnococcus provasolii* et *Dunaliella tertiolecta*, *Bigelowiella natans*, respectivement. Une surestimation des populations de Chlorophyta, Mamiellales et Haptophyta est donc possible. Cependant, alors que *Florenciella parvula* par sa petite taille (3 µm – 6 µm) ne peut pas être discriminée des autres cellules picoplanctoniques hybridées avec la sonde Chlo02, les cryptophytes *Rhodomonas* sp. et *Hemiselmis* sp. rencontrées en milieu marin et en eau douce étaient reconnaissables par leur



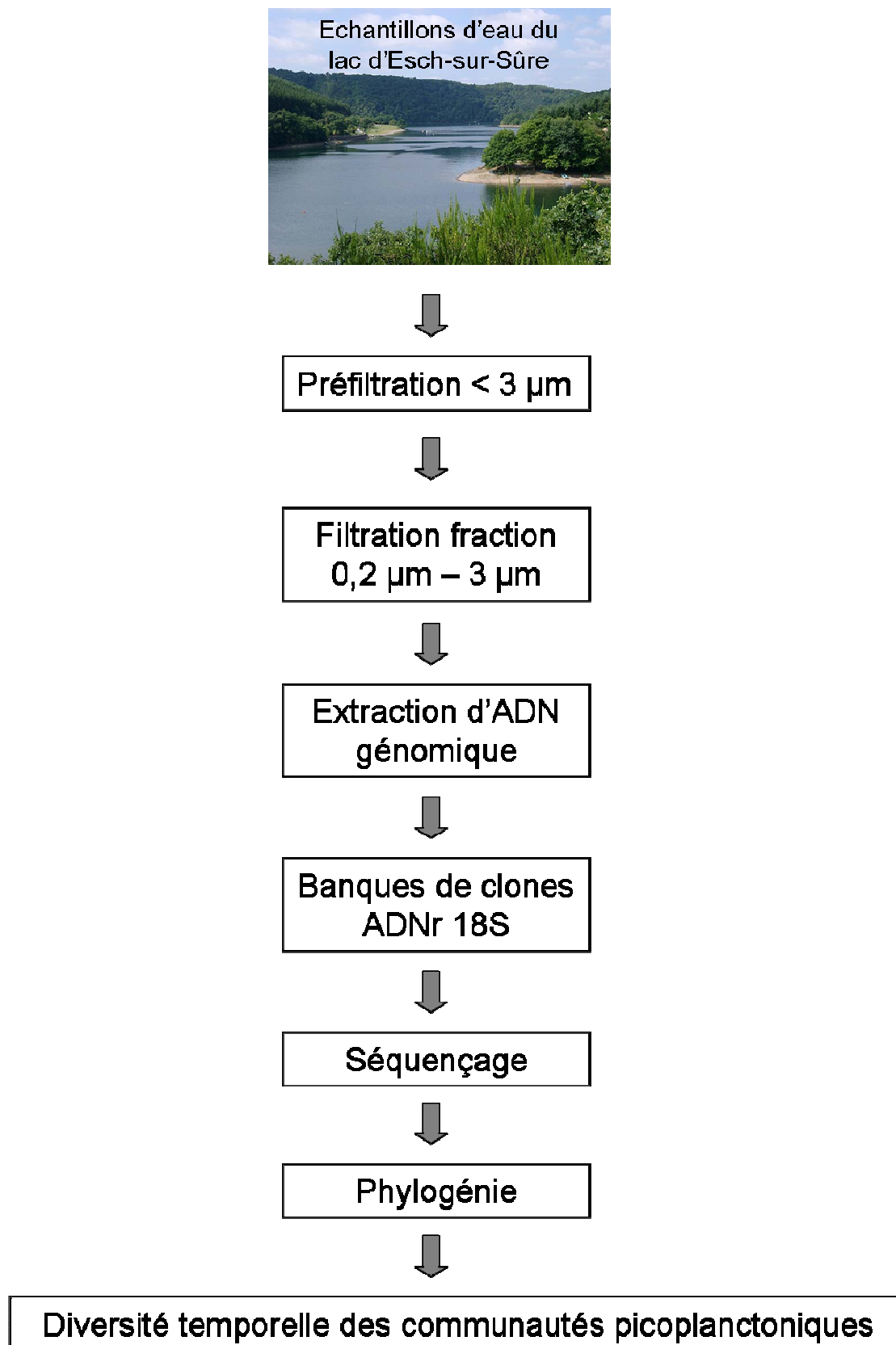
forme, la présence de deux flagelles et leur taille (10  $\mu\text{m}$  – 15  $\mu\text{m}$ ). Bien que des études réalisées dans divers milieux côtiers ont montré leur présence à de très faibles densités (< 50 cell  $\text{mL}^{-1}$ ) (Lim et al. 1999), les Chrysophyceae *Paraphysomonas* sp. sont rencontrés à la fois en eau douce et en milieu marin, particulièrement dans les eaux riches en nutriments. Le genre *Pycnococcus* a été isolé dans les différents milieux marins étudiés dans ce travail. Cependant, la fluorescence observée avec la sonde Pras04 sur la souche de *Pycnococcus provasolii* lors des tests était faible et n'était présente que sur une petite partie des cellules. La Chlorophyceae *Dunaliella* étant présente dans les eaux hypersalines, son hybridation avec la sonde Prym02 ne devait pas poser de problème dans le cadre de ce travail. Par contre, l'hybridation de la sonde Prym02 avec l'espèce marine *Bigelowiella natans* a pu provoquer une surestimation des Haptophyta lors de nos comptages car sa forme coccoïde et sa taille (5  $\mu\text{m}$ ) ne permettent pas de la différencier des haptophytes. Notons également que ces tests ont été réalisés sur un petit nombre de souches et que par conséquent, la présence de faux positifs n'est sans doute pas restreinte aux seules espèces testées.

La présence de ces faux positifs pourrait être due à la non-spécificité des sondes utilisées. Nous avons donc vérifié le nombre de différences (mismatches) entre la séquence des sondes utilisées et la séquences des organismes testés dans ce travail mais également d'autres séquences disponibles dans les bases de données. Les sondes Prym02 et Pras04 présentent au moins quatre différences situées aux extrémités et au centre de la zone homologue des séquences des organismes non ciblés. On peut donc penser que les faux positifs obtenus avec les sondes Prym 02 et Pras 04 ne sont pas dues à une non-spécificité de ces sondes. La sonde Chlo02 présente par contre seulement un ou deux différences avec les séquences de cultures testées, ce qui pourrait peut-être expliquer pourquoi on observe des hybridations avec certaines cultures.

Une deuxième hypothèse pourrait être l'accrochage non-spécifique des sondes à des endroits autres que l'ARNr. C'est ce qui semble se produire avec la souche de *Thalassiosira weissflogii* (Bacilliarophyceae) qui est la seule culture de diatomée à réagir positivement avec toutes les sondes testées. Nous avons aussi constaté l'hybridation de l'ensemble des sondes sur la frustule de diatomées (Figure A-5). Cela pourrait être dû à une réaction de la sonde avec la silice présente à la surface des diatomées lors de certains stades de croissance. Les diatomées étant facilement reconnaissable par leur forme et leur taille, elles ont été facilement discriminées lors des comptages en microscopie.

Dans d'autres cas, des hybridations attendues n'ont pas été observées (faux négatifs). C'est le cas pour 5 souches dont trois de Trebouxiophyceae pour lesquelles ni le mélange de sondes (Euk1209 + Chlo01 + NChlo01), ni la sonde Chlo02 ne montrent d'hybridation significative. Il semblerait que les Trebouxiophyceae soient réfractaires à l'hybridation. Des étapes supplémentaires de perméabilisation proposées par Pernthaler et al. (2004) ont été testées (incubation dans des solutions de SDS, de triton, de HCl et de DEPC (diéthylpyrocarbonate)) sans donner de résultats positifs sur les souches de Trebouxiophyceae. Certaines cellules de Trebouxiophyceae comme *Chlorella* ayant une paroi cellulaire composée de plusieurs couches de microfibrilles de sucre aminé (glucosamine) ou de glucose et mannose (Nemcova & Kalina 2000), la pénétration des sondes pourrait en être bloquée. Les Trebouxiophyceae sont présents principalement dans le sol (lichen) et en eau douce (Graham et Wilcox 2000). Ainsi, la plupart des espèces décrites de petits eucaryotes d'eau douce appartiennent aux Trebouxiophyceae (Tableau I-1). Les résultats de FISH-TSA obtenus en eau douce devront donc être interprétés de façon très critique. Peu d'espèces marines sont rencontrées dans cette classe. Cependant, des séquences de Trebouxiophyceae ont été trouvées dans des banques de clones réalisées en Mer du Nord et des cultures de *Nannochloris* sp. de la RCC ont été également isolées de la Mer du Nord (Vaulot et al. 2004, Valentin et al. 2005). Une sous estimation de l'abondance des Chlorophyta est donc possible au cours de nos comptages aussi bien en milieu marin qu'en milieu d'eau douce. Une des deux souches d'Eustigmatophyceae testées a montré une très faible hybridation avec le mélange de sondes (Euk1209 + Chlo01 + NChlo01). Les Eustigmatophyceae sont rencontrés en milieu marin (plus particulièrement en milieu côtier) mais également en milieu d'eau douce.

Globalement, une sous-estimation des eucaryotes totaux a pu avoir lieu au cours de nos comptages. Cependant, les comptages des eucaryotes marqués au DAPI nous a permis d'avoir une estimation de l'efficacité d'hybridation des sondes utilisées et ainsi pouvoir mieux interpréter nos résultats.



**Figure AI-6 :** Résumé des étapes réalisées pour l'étude temporelle de la diversité des communautés picoplanctoniques du lac d'Esch-sur-Sûre.

### A. III Clonage-séquençage du gène de l'ARNr 18S

Cette approche a été utilisée sur les échantillons du lac d'Esch-sur-Sûre afin d'étudier la diversité temporelle des communautés picoplanctoniques. Les principales étapes de la méthode sont résumées dans la figure A-6.

#### A. III.1 Echantillonnage

Les échantillons prélevés avec une bouteille Ruttner (1 L) ont été préfiltrés sur membranes de porosité 3  $\mu\text{m}$  (Whatman). Cette fraction est alors récupérée sur filtres de porosité 0,2  $\mu\text{m}$  (Gelman). Les filtres d'intérêts ont été placés dans des microtubes contenant du tampon de lyse (EDTA 20 mM, NaCl, 400 mM, sucrose 0,75 M, Tris 50 mM pH 9) et stockés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction d'ADN.

#### A. III.2 Extraction d'ADN

Une solution de lysozyme (concentration finale de  $500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a été ajoutée aux filtres qui ont ensuite été incubés à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant 20 minutes. Puis, des solutions de SDS (1,5 % final) et de protéinase K (concentration finale de  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ont été rajoutées et les filtres incubés à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant une heure. Après l'ajout d'un volume d'une solution de CTAB (cetyltriméthylammonium bromide) (CTAB 3 %, NaCl, 1,4 M, 2-mercaptoéthanol, 0,2 %, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8), les échantillons ont été incubés à  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 20 minutes. Les acides nucléiques ont été extraits avec un volume de solution chloroforme/isamyl alcool (24:1). La phase aqueuse contenant l'ADN a été précipitée par addition d'isopropanol (0,6 volume) et stockée à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant 12 heures. Après centrifugation, le culot d'ADN a été rincé avec de l'éthanol 80 % et remis en solution dans  $50\text{ }\mu\text{L}$  d'eau MQ stérile. La quantité d'ADN obtenue a été quantifiée par l'utilisation d'un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) et ensuite stocké à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse.

#### A. III.3 Amplification de l'ARNr 18S

L'ARNr 18s a été amplifié en utilisant les amorces eucaryotes générales Euk328f et Euk329r (Romari & Vaultot 2004). Le mélange PCR ( $50\text{ }\mu\text{L}$ ) contenait 10 ng d'ADN génomique,

200  $\mu$ M de chaque désoxynucléotide triphosphate, 2 mM de  $MgCl_2$ , 10 pmoles de chaque amorce, 1,5 unités de *Taq* DNA polymérase (Proméga) et le tampon 1X fourni avec l'enzyme. La réaction d'amplification a été réalisée avec un thermocycler (Applied Biosystems) selon le programme suivant : une dénaturation initiale à 95 °C durant 5 minutes ; 30 cycles comprenant une étape de dénaturation (95 °C durant 1 minute), une étape d'hybridation (57 °C durant 45 secondes) et une étape d'élongation (72 °C durant 1,5 minutes) ; une élongation finale à 72 °C durant 10 minutes. Les produits amplifiés ont été vérifiés par électrophorèse de 5  $\mu$ l de produit PCR sur gel d'agarose 1 % dans du tampon TAE (Tris-acétate EDTA) 1X.

#### A. III.4 Banques de clones

La ligation des produits PCR avec le vecteur pCR 2.1 du TOPO TA cloning kit (Invitrogen) a été réalisée à température ambiante durant 30 minutes. Après la transformation des cellules compétentes d'*Escherichia coli* (30 minutes dans la glace, 30 secondes à 42 °C, quelques secondes dans la glace), 250  $\mu$ L de S.O.C medium ont été ajoutés aux bactéries qui ont ensuite été incubées 1h30 à 37 °C sous agitation.

Après étalement et croissance durant 12 heures à 37 °C des bactéries transformées sur boîtes de LB-Agar-Ampicilline contenant du X-gal et de l'IPTG, les transformants positifs (colonies blanches) de chaque banque ont été sélectionnés. Une vérification de l'insert a été alors réalisée en utilisant les amorces du plasmide (M13f et M13r).

Les produits d'amplification présentant la taille attendue ont été sélectionnés et leur plasmide extrait avec le kit Montage<sup>TM</sup> Plasmide MiniprepHTS 96 (Millipore). Les réactions de séquençage ont été réalisées avec le kit BigDye<sup>®</sup> Terminator (Applied Biosystems) et passées sur séquenceur ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) au niveau de la plateforme séquençage génotypage Ouest-génotype<sup>®</sup> de la Station Biologique de Roscoff (<http://www.sb-roscoff.fr/SG/>).

#### A. III.5 Phylogénie

L'affiliation phylogénétique a été réalisée à partir des espèces les plus proches issues des bases de données de Genbank (Altschul et al. 1997) en utilisant l'outil de recherche BLAST.

Les séquences chimériques ont été détectées par l'utilisation des programmes Check Chimera (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimeras.cgi?su=SSU>) et KeyDNAtools

(<http://www.keydnatools.com> ; Guillou et al. 2008) et ont été exclues du jeu de données.

## **ANNEXE II**

# **Comparaison avec les lacs français**

# Contribution des Chlorophyta et Haptophyta dans différents milieux lacustres

## Introduction

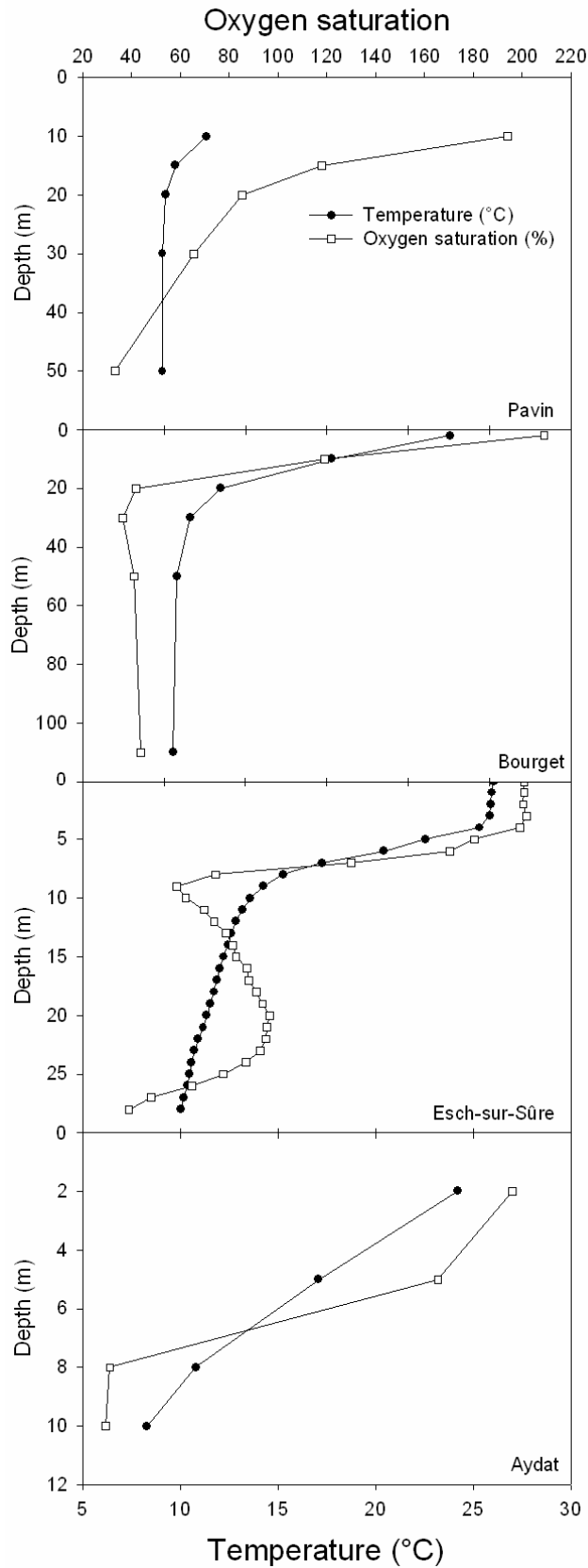
La plupart des études réalisées en milieu lacustre sur les eucaryotes de petite taille s'intéressent particulièrement à leur diversité (Lefranc et al. 2005 ; Šlapeta et al. 2005), en utilisant généralement la méthode de clonage-séquençage sur l'ARNr 18S.

Une étude réalisée sur la fraction  $< 5\mu\text{m}$  à partir de la méthode clonage-séquençage dans des milieux lacustres de statut trophique différent n'a permis de recenser qu'une seule séquence affiliée aux Chlorophyta dans le lac oligotrophe (Godivelle) et deux séquences affiliées aux Haptophyta dans le lac oligo-mésotrophe (Pavin) (Lefranc et al. 2005). Aucune séquence de Chlorophyta et d'Haptophyta n'avait été recensée dans le lac eutrophe (Aydat). Pourtant, une étude réalisée sur des lacs allemands de statut trophique différent à partir d'observations au microscope et d'analyse moléculaire après isolation des organismes, a permis de mettre en évidence la présence de picochlorophytes des genres *Choricystis* et *Pseudodictyosphaerium* dans chacun des lacs étudiés (Hepperle & Krienitz 2001).

L'étude réalisée sur le lac d'Esch-sur-Sûre (Chapitre II) ainsi que l'étude réalisée au lac du Bourget par Lepère et al. (2008) combinant la méthode d'hybridation *in situ* et de clonage-séquençage, ont permis de mettre en évidence une sous-estimation de l'importance des Chlorophyta et Haptophyta par cette dernière technique. La méthode FISH-TSA semblait donc être une bonne méthode pour avoir une meilleure évaluation de la contribution de ces deux groupes.

Au cours de ce travail, nous avons réalisé des hybridations avec les sondes spécifiques des Chlorophyta et Haptophyta sur des échantillons de lacs présentant des statuts trophiques différents. Nous avons également différencié 3 classes de tailles parmi les eucaryotes comptés ( $< 2\mu\text{m}$ , entre  $2\mu\text{m}$  et  $5\mu\text{m}$ , et  $> 5\mu\text{m}$ ) afin de voir si une distribution préférentielle dans l'une ou l'autre classe de taille était observée. Les lacs étudiés dans ce travail sont le lac d'Esch-sur-Sûre (mésio-eutrophe) et trois lacs français, Pavin (oligo-mésotrophe), du Bourget (mésotrophe) et Aydat (eutrophe).

**Les résultats obtenus pour ces trois derniers lacs feront l'objet d'un article en collaboration avec Cécile Lepère et Jean-François Mangot dans lequel les résultats avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques des Chrysophyceae, Perkinsea, Cercozoa et Champignons seront ajoutés.**



**Figure AII-1 :** Profils verticaux de la température (°C) et de la saturation en oxygène (%) pour les lacs Pavin, du Bourget, Esch-sur-Sûre et Aydat. Les axes des ordonnées ne sont pas à la même échelle.



## Matériel et méthodes

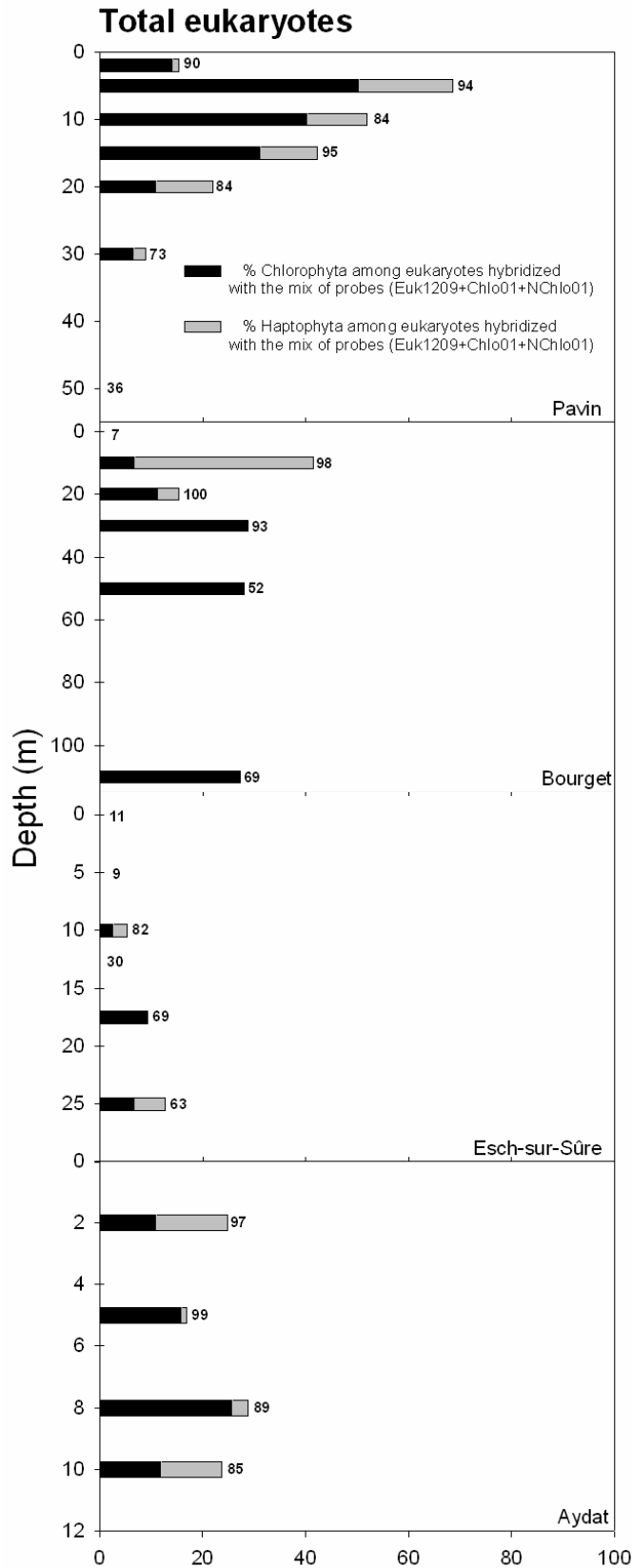
La description des sites ainsi que le protocole d'hybridation se trouvent dans la partie I. 4 de l'introduction générale et en annexe I, respectivement. Les sondes oligonucléotidiques Euk1209, Chlo01 et NChlo01 ont été utilisées en mélange afin de cibler tous les eucaryotes. Les sondes Chlo02 et Prym02 ont été utilisées afin de cibler les Chlorophyta et Haptophyta, respectivement.

Les échantillons du lac Pavin (de 40 mL à 50 mL) ont été prélevés le 04 juillet 2006 à 2 m, 5 m, 10 m, 15 m, 20 m, 30 m et 50 m. Les échantillons du lac du Bourget (50 mL) ont été prélevés le 26 juin 2006 à 2 m, 10 m, 20 m, 30 m, 50 m et 110 m. Les échantillons du lac Aydat (de 15 mL à 35 mL) ont été prélevés le 05 juillet 2006 à 2 m, 5 m, 8 m et 10 m.

## Résultats et discussion

Au cours de ce travail, nous avons comparé la contribution des Chlorophyta et Haptophyta entre des lacs de statut trophique différent mais nous nous sommes intéressés également à leur distribution verticale. C'est pourquoi, la comparaison s'est faite avec les échantillons du lac d'Esch-sur-Sûre prélevés le 27 juillet 2006 afin d'avoir une stratification de la température et de la saturation en oxygène comme dans les autres lacs (Fig. AII-1).

Notons également que les échantillons des lacs Pavin, du Bourget et Aydat ont été préfiltrés sur 5  $\mu\text{m}$  alors que les échantillons du lac d'Esch-sur-Sûre l'ont été sur 10  $\mu\text{m}$ . Malgré ça, des cellules de tailles supérieures à 5  $\mu\text{m}$  ont été comptées dans les échantillons des lacs français. Le passage de cellules de tailles supérieures à la taille nominale des filtres utilisés lors d'une préfiltration avait déjà été mis en évidence dans d'autres études (Carrias et al. 2001 ; Díez et al. 2001). En général, les eucaryotes supérieurs à 5  $\mu\text{m}$  comptaient pour 10 % à 15 % des eucaryotes totaux, sauf au niveau du lac Pavin où 65 %, 29 % et 35 % des cellules eucaryotes comptées à 2 m, 5 m et 10 m de profondeur, respectivement avaient des tailles supérieures à 5  $\mu\text{m}$ . La majorité (80 %) de ces cellules ont été identifiées comme diatomées dont la taille pouvait varier de 20  $\mu\text{m}$  à 200  $\mu\text{m}$  (données non montrées). Les diatomées pouvant atteindre 200  $\mu\text{m}$  de long, faisaient en général quelques microns de large, pouvant expliquer ainsi leur passage à travers le filtre de 5  $\mu\text{m}$ . Malgré la préfiltration sur 10  $\mu\text{m}$  des échantillons du lac luxembourgeois, les eucaryotes de taille supérieure à 5  $\mu\text{m}$  ne comptaient que pour 10 % à 20 % de l'ensemble des eucaryotes comptés (données non montrées).



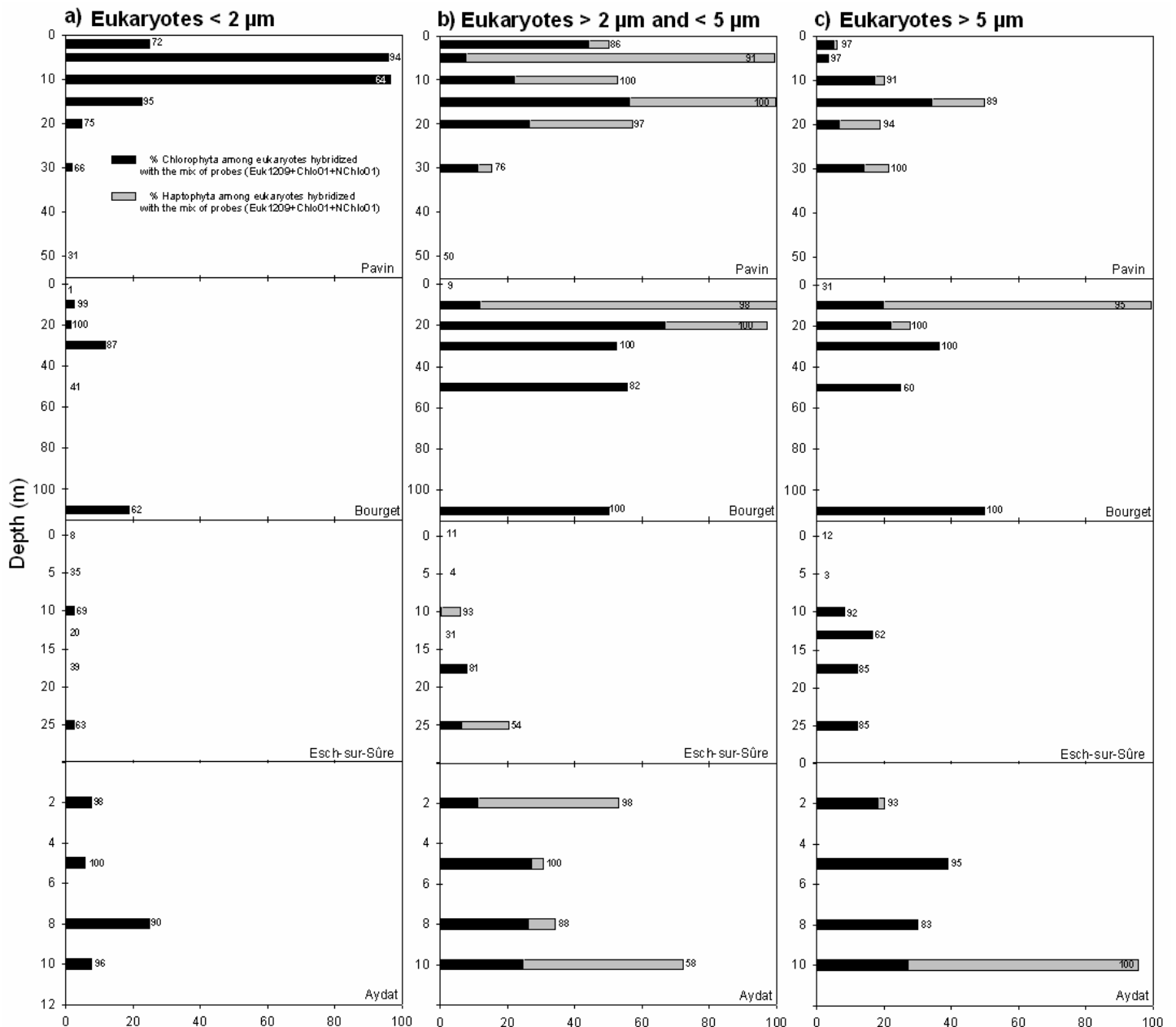
**Figure AII-2 :** Profils verticaux de la contribution (%) des Chlorophyta (en noir) et des Haptophyta (en gris) parmi l'ensemble des eucaryotes hybridés avec le mélange de sondes (Euk1209+Chlo01+NChlo01). Les nombres correspondent au pourcentage d'hybridation obtenus avec le mélange de sondes (Euk1209+Chlo01+NChlo01). La figure ne montre que les contributions des Chlorophyta et des Haptophyta pour les échantillons présentant une hybridation avec le mélange de sondes égale ou supérieure à 50 %. Les échelles des axes des ordonnées sont différentes pour chaque lac.

La comparaison du nombre de cellules eucaryotes hybridées avec le mélange de sondes (Euk1209+Chlo01+ NChlo01) et le nombre d'eucaryotes comptés par marquage DAPI donne des pourcentages d'hybridation variant de 7 % (2 m lac du Bourget) à 100 % (20 m lac du Bourget) pour les eucaryotes totaux (Fig. AII-2). Les pourcentages d'hybridation peuvent descendre jusque 1 % pour la fraction inférieure à 2  $\mu\text{m}$  à 2 m dans le lac du Bourget (Fig. AII-3a). Les causes possibles de ces faibles pourcentages d'hybridation ont déjà été discutées dans le chapitre II pour le lac d'Esch-sur-Sûre. Dans ce qui suit, nous n'avons pris en compte que les contributions des Chlorophyta et des Haptophyta pour les échantillons présentant une hybridation avec le mélange de sondes (Euk1209+Chlo01+ NChlo01) égale ou supérieure à 50 %.

Contrairement à Lefranc et al. (2005) qui n'avaient détecté qu'une seule séquence affiliée aux Chlorophyta dans le lac oligotrophe, la méthode FISH-TSA a permis de mettre en évidence la présence de chlorophytes dans tous les lacs étudiés (Fig. AII-2). Aucune relation claire entre la stratification et la distribution des contributions en chlorophytes n'a pu être mise en évidence. En moyenne, l'abondance relative des chlorophytes parmi l'ensemble des eucaryotes hybridés avec le mélange de sondes (Euk1209+Chlo01+ NChlo01) est la plus élevée dans les lacs oligo-mésotrophe et mésotrope avec 26 % et 27 %, respectivement. Les lacs méso-eutrophe et eutrophes présentent des contributions plus faibles de 5 % et 16%, respectivement.

La contribution moyenne des chlorophytes dans la fraction inférieure à 2  $\mu\text{m}$  varie de 3 % dans le lac d'Esch-sur-Sûre à 41 % dans le lac Pavin, avec des valeurs intermédiaires de 9 % et 11 % pour les lacs du Bourget et Aydat, respectivement (Fig. AII-3a). Dans le lac Pavin, les contributions plus élevées ont été observées dans les 10 premiers mètres. Il semblerait que les picochlorophytes montrent une contribution plus importante dans le lac oligo-mésotrophe par rapport aux lacs de statut trophique plus élevé, particulièrement dans les couches supérieures de la colonne d'eau. Cela semble être en accord avec Hepperle & Krienitz (2001) qui ont montré une contribution plus importante des picochlorophytes dans le lac oligotrophe Stechlin par rapport à d'autres lacs allemands de statut trophique plus élevé.

Pour la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$ , les chlorophytes présentent des contributions moyennes de 5 % dans le lac d'Esch-sur-Sûre à 47 % dans le lac du Bourget, avec des valeurs intermédiaires pour les lacs Pavin et Aydat de 28 % et 22 %, respectivement (Fig. AII-3b).



**Figure AII-3 :** Profils verticaux de la contribution (%) des Chlorophyta (en noir) et des Haptophyta (en gris) parmi les eucaryotes plus petits que 2 µm (a), les eucaryotes entre 2 µm et 5 µm (b), les eucaryotes plus grands que 5 µm (c) hybridés avec le mélange de sondes (Euk1209+Chlo01+NChlo01). Les nombres correspondent au pourcentage d'hybridation obtenu avec le mélange de sondes (Euk1209+Chlo01+NChlo01). La figure ne montre que les contributions des Chlorophyta et des Haptophyta pour les échantillons présentant une hybridation avec le mélange de sondes égale ou supérieure à 50 %. Les échelles des axes des ordonnées sont différentes pour chaque lac.

Alors qu'aucune tendance claire concernant leur répartition dans la colonne d'eau n'apparaît pour le lac Pavin, elle semble homogène dans les lacs Aydat et d'Esch-sur-Sûre. Pour le lac du Bourget, la contribution des chlorophytes dans la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  semble augmenter dans l'épilimnion pour ensuite être constante à partir de 30 m dans le reste de la colonne d'eau.

Pour la fraction supérieure à 5  $\mu\text{m}$ , les chlorophytes présentent des contributions moyennes de 12 % dans le lac d'Esch-sur-Sûre à 31 % dans le lac du Bourget, avec des valeurs intermédiaires pour les lacs Pavin et Aydat de 14 % et 29 %, respectivement (Fig. AII-3c). Leur distribution dans la colonne semble homogène pour tous les lacs, avec cependant un pic à 15 m dans le lac Pavin (34 %) et à 110 m dans le lac du Bourget (50%).

Alors que Lefranc et al. (2005) n'avaient détecté que deux séquences d'Haptophyta dans le lac oligo-mésotrophe, cette étude a permis de mettre en évidence la présence d'haptophytes dans tous les lacs étudiés. Cependant, leur présence semble limitée aux 20 ou 30 premiers mètres suivant les lacs (Fig. AII-2). En moyenne, la contribution des haptophytes est inférieure à celle des chlorophytes, quelque soit le lac considéré. Les plus faibles contributions des haptophytes ont été observées dans le lac méso-eutrophe (2 %) et le lac eutrophe (7 %), les haptophytes contribuant pour 8 % et 9 % de l'ensemble des eucaryotes hybridés avec le mélange de sondes (Euk1209+Chlo01+ NChlo01) dans les lacs mésotrophe et oligo-mésotrophe, respectivement. Il semble y avoir une faible décroissance des contributions d'haptophytes lorsque le statut trophique augmente.

Aucun haptophyte n'a été détecté dans la fraction inférieure à 2  $\mu\text{m}$  dans les lacs aux dates d'échantillonnage considérées (Fig. AII-3a), suggérant que les mois de juin et de juillet ne présentaient pas les conditions adéquates au développement des picohaptophytes, en particulier au niveau du lac d'Esch-sur-Sûre où ils ont été détectés à d'autres périodes de l'année (Chapitre II).

Pour la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$ , les haptophytes présentent des contributions moyennes de 7 % dans le lac d'Esch-sur-Sûre à 34 % dans le lac Pavin, avec des valeurs intermédiaires pour les lacs du Bourget et Aydat de 24 % et 25 %, respectivement (Fig. AII-3b). Pour cette fraction de taille, la contribution des Haptophyta peut être supérieure à celle des Chlorophyta mais reste inférieure à 50 % dans les lacs d'Esch-sur-Sûre et Aydat, alors qu'elle atteint 88 % et 92 % des eucaryotes entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  dans les lacs du Bourget et Pavin, respectivement. Dans le lac du Bourget, cela correspond à une contribution de plus de 30 % des haptophytes

pour l'ensemble des eucaryotes. Ceci peut suggérer un début ou une fin d'efflorescence d'haptophytes dans ce lac (Hansen et al. 1994).

Pour la fraction supérieure à 5  $\mu\text{m}$ , les haptophytes présentent des contributions moyennes de 6 % dans le lac Pavin à 18 % dans le lac Aydat, avec une contribution intermédiaire de 17 % pour le lac du Bourget (Fig. AII-3c). Aucun haptophyte supérieur à 5  $\mu\text{m}$  n'a été détecté dans le lac d'Esch-sur-Sûre. La contribution des haptophytes dans cette fraction de taille est en général plus faible que dans la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$ , même si elle atteint 79 % et 68 % dans les lacs du Bourget et Aydat à 10 m, respectivement. Ceci confirme des analyses précédentes réalisées avec des sondes spécifiques des haptophytes en milieu naturel montrant que la majorité d'entre eux présentent une taille  $\sim 4 \mu\text{m}$  (H. Liu, comm. pers).

En conclusion, l'hybridation *in situ* des sondes oligonucléotidiques spécifiques des Chlorophyta et Haptophyta nous a permis de mettre en évidence la présence de ces deux groupes dans tous les lacs étudiés.

Les chlorophytes semblent contribuer de façon plus importante à la population picoplanctonique eucaryote dans le lac de plus faible statut trophique (41 %), alors que pour la fraction entre 2  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  ils ont montré une contribution moyenne plus élevée dans le lac mésotrophe (47 %). Pour la fraction supérieure à 5  $\mu\text{m}$ , les chlorophytes ont montré des contributions équivalentes quelque soit le statut trophique.

Aucun haptophyte n'a été détecté dans la fraction inférieure à 2  $\mu\text{m}$ , quelque soit le lac considéré. La stratification semble avoir un effet plus important sur la distribution des haptophytes, particulièrement dans le lac du Bourget où ils ont été détectés uniquement dans l'épilimnion et où leur contribution dominait celle des chlorophytes parmi la population eucaryote supérieure à 2  $\mu\text{m}$ .

# **ANNEXE III**

## Nutrient limitation of primary productivity in the Southeast Pacific (BIOSOPE cruise)

S. Bonnet<sup>1</sup>, C. Guieu<sup>1</sup>, F. Bruyant<sup>2</sup>, O. Prášil<sup>3</sup>, F. Van Wambeke<sup>4</sup>, P. Raimbault<sup>4</sup>, T. Moutin<sup>4</sup>, C. Grob<sup>1</sup>, M. Y. Gorbunov<sup>5</sup>, J. P. Zehr<sup>6</sup>, S. M. Masquelier<sup>7</sup>, L. Garczarek<sup>7</sup>, and H. Claustre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, UMR 7093, CNRS and Université Pierre et Marie Curie, BP 08 06238 Villefranche sur mer Cedex, France

<sup>2</sup>Dalhousie University–Department of Oceanography, 1355 Oxford Street Halifax, NS, B3H 4J1, Canada

<sup>3</sup>Institute of Microbiology ASCR, Opatovický mlýn, 37981 Trebon and University of South Bohemia, Zámek, 37333 Nové Hrad, Czech Republic

<sup>4</sup>Centre d'Océanologie de Marseille - Campus de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, France

<sup>5</sup>Rutgers University, Institute of marine and Coastal Sciences, 71 Dudley road, New Brunswick, N. J. 08901-8521, USA

<sup>6</sup>University of California Santa Cruz, Ocean Sciences Department, 1156 high street, Santa Cruz, CA 95064, USA

<sup>7</sup>Station Biologique de Roscoff, UMR 7144, CNRS and Univ. Pierre et Marie Curie, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France

Received: 2 July 2007 – Published in Biogeosciences Discuss.: 9 August 2007

Revised: 19 November 2007 – Accepted: 11 January 2008 – Published: 20 February 2008

**Abstract.** Iron is an essential nutrient involved in a variety of biological processes in the ocean, including photosynthesis, respiration and dinitrogen fixation. Atmospheric deposition of aerosols is recognized as the main source of iron for the surface ocean. In high nutrient, low chlorophyll areas, it is now clearly established that iron limits phytoplankton productivity but its biogeochemical role in low nutrient, low chlorophyll environments has been poorly studied. We investigated this question in the unexplored southeast Pacific, arguably the most oligotrophic area of the global ocean. Situated far from any continental aerosol source, the atmospheric iron flux to this province is amongst the lowest of the world ocean. Here we report that, despite low dissolved iron concentrations ( $\sim 0.1 \text{ nmol l}^{-1}$ ) across the whole gyre (3 stations located in the center and at the western and the eastern edges), primary productivity are only limited by iron availability at the border of the gyre, but not in the center. The seasonal stability of the gyre has apparently allowed for the development of populations acclimated to these extreme oligotrophic conditions. Moreover, despite clear evidence of nitrogen limitation in the central gyre, we were unable to measure dinitrogen fixation in our experiments, even after iron and/or phosphate additions, and cyanobacterial *nifH* gene abundances were extremely low compared to the North Pacific Gyre. The South Pacific gyre is therefore unique with respect to the physiological status of its phytoplankton populations.

### 1 Introduction

The production of organic matter in the sea is sustained by a continuous supply of essential macro- (C, N, P) and micronutrients (metals, vitamins). The nutrients requirements vary among different phytoplanktonic species. According to the Liebig's law, organic matter production is controlled by the element that is available in the lowest concentration relative to the growth requirements. This simple view is now replaced by the realization that multiple resources simultaneously limit phytoplankton growth in some parts of the ocean (Arrigo, 2005). Global environmental forcings, including human-induced climate change, could potentially modify the nutrient delivery processes to the ocean, leading to fundamental changes in the diversity and functioning of the marine food web. It is thus fundamental to understand which nutrients control primary productivity in the open ocean to predict the biogeochemical consequences of global change. Representing 60% of the global ocean's area, the subtropical open-ocean ecosystems are the largest coherent biomes on our planet, and the biogeochemical processes they support are of global importance (Emerson et al., 1997; Karl, 2002). The development of permanent time series stations in the North tropical Atlantic and Pacific over the past two decades have led to a revolution in the understanding of the mechanisms and controls of nutrient dynamics in these remote environments. These oceanic gyres provide ideal ecological niche for the development of nitrogen-fixing organisms (e.g. Karl et al., 2002). In the North subtropical and tropical Atlantic and Pacific oceans, it has been estimated that dinitrogen fixation is equivalent to 50–180% of the flux

Correspondence to: S. Bonnet  
(sbonnet@usc.edu)



## RESUME

Les communautés microbiennes eucaryotes sont composées d'organismes faisant partie de toutes les lignées de protistes connues à ce jour. Les autotrophes de petite taille peuvent contribuer de façon significative à la biomasse et à la production primaire dans les eaux oligotrophes. Jusqu'à présent, environ 100 espèces marines et d'eau douce ont été formellement décrites dans la classe de taille picoplanctonique ( $< 3 \mu\text{m}$ ). Leur distribution et leur contribution à la biomasse chlorophyllienne commencent à être connues pour quelques espèces marines comme la Prasinophyceae *Micromonas pusilla*. Dans le but de mieux comprendre la diversité et l'écologie de ces petits eucaryotes, j'ai utilisé l'hybridation *in situ* fluorescente de sondes oligonucleotidiques (18S ARNr) associées à une amplification du signal (FISH-TSA) afin de quantifier des groupes taxinomiques spécifiques dans des échantillons naturels. En particulier, des sondes déjà existantes spécifiques des Chlorophyta et des Haptophyta ont été utilisées afin d'évaluer les distributions de ces deux grands groupes dans différents environnements. En parallèle, des observations en microscopie à épifluorescence sur des échantillons fixés au glutaraldéhyde ont permis de distinguer les organismes autotrophes des hétérotrophes.

Différents milieux marins caractérisés par des statuts trophiques différents ont été étudiés, tels que le Pacifique Sud-Est, la Manche et la Mer du Nord. Des échantillons d'eau douce provenant d'un lac méso-eutrophe au Luxembourg (une année d'échantillonnage) et de trois lacs français (méso-oligotrophe, mésotrophe et eutrophe) ont été également étudiés.

La contribution hétérotrophe de la communauté eucaryotique atteignait 75 % de la population picoplanctonique dans les zones oligotrophes du Pacifique Sud-Est et 50 % dans les zones mésotrophes et eutrophes du Pacifique et de Mer du Nord. La contribution des Chlorophyta parmi les eucaryotes autotrophes atteignait son maximum dans la Manche au niveau de la fraction picoplanctonique (jusqu'à 100 %) alors que les Haptophyta avaient une contribution maximale dans la fraction de taille entre  $2 \mu\text{m}$  et  $5 \mu\text{m}$  en Mer du Nord (jusqu'à 100 %). Les Chlorophyta étaient principalement composés de Mamiellales pour la fraction picoplanctonique avec une dominance de l'espèce *Micromonas pusilla* dans la Manche.

Les échantillons d'eau douce ont montré des contributions des Chlorophyta et des Haptophyta généralement plus basses que les échantillons marins et ce quelque soit le statut trophique du lac (de 5 % à 27 % en moyenne pour les Chlorophyta et de 2 % à 9 % pour les Haptophyta en été pour les quatre lacs étudiés). Alors qu'aucune tendance claire n'a pas été mise en évidence pour les Haptophyta, la contribution des Chlorophyta dans la fraction inférieure à  $2 \mu\text{m}$  semble décroître dans les eaux plus eutrophes. L'étude annuelle du lac d'Esch-sur-Sûre (Luxembourg) a montré que la plus importante contribution des Chlorophyta (99 %) et des Haptophyta (9 %) est atteinte pour la fraction  $5-10 \mu\text{m}$  durant la phase d'eau claire et en automne, respectivement. Les banques de clones (18S ARNr) réalisées aux quatre saisons au lac d'Esch-sur-Sûre tendent à confirmer la dominance des eucaryotes hétérotrophes parmi la population picoplanctonique, en particulier les ciliés. En été, les Chlorophyta représentaient 12 % des phylotypes identifiés.

Cette étude a confirmé la dominance de la « lignée rouge » dans la fraction supérieure à  $5 \mu\text{m}$  en été quelque soit le milieu considéré. La « lignée verte » dominait la fraction picoplanctonique uniquement en Manche et en Mer du Nord. Cependant, durant la phase d'eau claire dans le lac d'Esch-sur-Sûre, elle dominait également la fraction  $5-10 \mu\text{m}$ .

Mots clés : Picoplancton – Hybridation *in situ* fluorescente – Chlorophyta – Haptophyta – Marin – Eau douce

## ABSTRACT

Marine and freshwater eukaryotic microbial communities are composed of organisms found in all protist lineages known to date. The smaller autotrophs can significantly contribute to both biomass and primary production in oligotrophic waters. Until now, about 100 marine and freshwater species have been formally described in the picoplanktonic size range (< 3  $\mu\text{m}$ ). Their distribution and their contribution to chlorophyll biomass begin to be known for some marine species such as the Prasinophyceae *Micromonas pusilla*. In order to better understand the diversity and ecology of these small eukaryotes, I used fluorescent *in situ* hybridization of 18S rRNA oligonucleotide probes coupled with signal amplification (TSA-FISH) to quantify specific taxonomic groups in natural samples. In particular, existing probes targeting Chlorophyta and Haptophyta were used in order to evaluate the distribution of these two major groups in different environments. In parallel, epifluorescence microscopy observations on glutaraldehyde fixed samples were achieved to distinguish autotrophic from heterotrophic organisms.

Various marine regions were investigated, exhibiting very different trophic status such as the South-East Pacific, the English Channel and the North Sea. Freshwater samples came from a meso-eutrophic lake in Luxemburg (one year long sampling) and from three French lakes (meso-oligotrophic, mesotrophic and eutrophic).

The contribution of heterotrophic part of the eukaryote community reached 75 % for the pico size fraction in the oligotrophic zones of the South-East Pacific and 50 % in the Pacific meso and eutrophic zones as well as in the North Sea. The contribution of Chlorophyta among autotrophic eukaryotes reached its maximum in the English Channel within the pico size fraction (up to 100 %) while the Haptophyta contribution was maximal for the size fraction between 2  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$  in the North Sea (up to 100 %). Chlorophyta populations were principally composed of Mamiellales for the pico size fraction with a dominance of the species *Micromonas pusilla* in the English Channel.

Freshwater samples showed contributions of Chlorophyta and Haptophyta generally lower than in marine samples whatever the trophic status of the lake (from 5 % to 27 % on average for Chlorophyta and from 2 % to 9 % for Haptophyta in summer for the four lakes investigated). While no clear pattern was found for Haptophyta, Chlorophyta contribution for the fraction smaller than 2  $\mu\text{m}$  seemed to decrease in more eutrophic waters. Annual monitoring of the Esch-sur-Sure Lake (Luxemburg) showed that the highest contribution of Chlorophyta (99 %) and Haptophyta (9 %) occurred in the larger than 5  $\mu\text{m}$  fraction during the clear water phase and in autumn, respectively. Clone libraries of the 18S rRNA gene obtained at four seasons in the Esch-sur-Sure Lake tends to confirm the dominance of heterotrophic eukaryotes among the pico population in particular ciliates. In summer, Chlorophyta represented 12 % of the identified phylotypes.

The present study confirmed the dominance of the “red lineage” for the larger than 5  $\mu\text{m}$  fraction whatever the environment considered. The “green lineage” dominated the picoplanktonic fraction only in the English Channel and the North Sea. However, during the clear water phase in the Esch-sur-Sûre Lake, it dominated the larger than 5  $\mu\text{m}$  fraction.

Keywords: Picoplankton – Fluorescent *in situ* Hybridization - Chlorophyta – Haptophyta – Marine - Freshwater