

2013 - **Domaine** Evolution, fonctionnement et évaluation des écosystèmes littoraux
Action 3 Indice Composition

Comparaison des résultats obtenus avec différentes techniques d'évaluation du phytoplancton antérieurement à 2013

Action 3. Indice Composition. Livrable n° A II

Rapport final, 13 novembre 2014

**Luis Felipe ARTIGAS (ULCO), Morgane DIDRY (CNRS-ULCO),
Luis LAMPERT (IFREMER), Mathias BROUTIN (CNRS-ULCO),
Simon BONATO (ULCO), Fabrice LIZON (UL1), Alain LEFEBVRE
(IFREMER)**

Novembre 2014

AUTEURS

Luis Felipe ARTIGAS, Maître de Conférences (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale), Felipe.Artigas@univ-littoral.fr

Morgane DIDRY, assistante ingénieur (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale), Morgane.Didry@univ-littoral.fr

Luis LAMPERT, cadre de recherche (IFREMER DYNECO/VIGIES), Luis.Lampert@ifremer.fr

Vanille BARTHELEMY, stagiaire (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale)

Simon BONATO, doctorant (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale), Simon.Bonato@univ-littoral.fr

Fabrice LIZON, Maître de Conférences (CNRS UMR 8187 LOG – Université de Lille 1), Fabrice.Lizon@univ-lille1.fr

Mathias BROUTIN, ingénieur d'études (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale), Communication.dymaphy@univ-littoral.fr

Alain LEFEBVRE, cadre de recherche (IFREMER LER/BL), Alain.Lefebvre@ifremer.fr

CORRESPONDANTS

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

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

AUTRES CONTRIBUTEURS

Vincent CORNILLE, technicien (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale), Vincent.Cornille@univ-littoral.fr

Eric LECUYER, technicien (CNRS UMR 8187 LOG), Eric.Lecuyer@univ-lille1.fr

Jessica CHICHEPORTICHE, assistante ingénieur (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale)

Vincent DUQUESNE, technicien (IFREMER LER/BL), Vincent.Duquesne@ifremer.fr

Camille BLONDEL, technicienne (IFREMER LER/BL), Camille.Blondel@ifremer.fr

Melilotus THYSSEN, post-doctorante (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale) – Chargée de Recherche CNRS au M.I.O., melilotus.thyssen@univ-amu.fr

Droits d'usage :

Niveau géographique :

Couverture géographique : nationale

Niveau de lecture :

RESUME

L'élément de qualité phytoplancton doit être évalué dans le cadre de la Directive Cadre sur L'Eau grâce à trois indices : biomasse, abondance et composition. Les deux premiers indices, biomasse et abondance, ont déjà été définis. L'indice composition a quant à lui fait l'objet d'une proposition précise en Méditerranée, mais pas en Manche - Atlantique.

Les travaux antérieurs montrent que la construction d'un indice de composition doit tenir compte de la diversité de l'ensemble du phytoplancton. Or, les comptages microscopiques ne concernent en général que le micro-phytoplancton. Il est donc nécessaire de prendre en compte des informations supplémentaires qui tiennent compte du nano- et du pico-phytoplancton, dont l'importance dans la diversité du phytoplancton est cruciale.

Afin d'appréhender la diversité du phytoplancton dans toutes ses composantes, il est donc proposé de ne pas se limiter au microphytoplancton, mais de considérer également les autres composants du phytoplancton, tels que le nano- et le pico-phytoplancton. Ceux-ci peuvent être mesurés par différentes techniques, qui sont complémentaires : cytométrie en flux traditionnelle ou cytométrie en flux permettant d'enregistrer le profil optique de chaque particule, analyse des pigments par HPLC, fluorescence spectrale, FlowCAM / Phytolmage, biodiversité génétique.

Par ailleurs, pour prendre en compte la dynamique du compartiment phytoplanctonique dans l'ensemble des eaux marines (en vue de définir les indicateurs pour la Directive Cadre Stratégie Milieu Marin (DCSMM), des mesures à haute résolution deviennent indispensables et possibles grâce au développement de nouveaux capteurs et systèmes d'analyse des résultats.

Les différentes actions du présent livrable ont été principalement réalisées en collaboration entre l'UMR LOG de Wimereux et le laboratoire IFREMER LER/Boulogne avec participation des laboratoires DYNECO/PELAGOS, DYNECO/VIGIES d'IFREMER, du LISIC-ULCO de Calais et les partenaires du projet DYMAPHY. Plus particulièrement, il s'agissait de comparer des résultats obtenus à partir de différentes techniques innovantes, dont la cytométrie en flux de type scanning et la fluorimétrie spectrale. Pour ce faire, l'analyse des premières comparaisons de mesures réalisées dans le cadre du projet INTERREG IVA « 2 Mers » DYMAPHY à la fois lors de campagnes communes et au niveau des sites d'observation et de surveillance en Manche Orientale seront présentées. Les données disponibles impliquant également, comme référence, des comptages microscopiques et des analyses pigmentaires seront également analysées en tant que référence (méthodes traditionnelles pour le suivi du phytoplancton).

Le suivi combiné de la distribution spatiale phytoplanctonique à haute résolution (kilométrique ou sub-kilométrique) au cours de campagnes océanographiques internationales ou au cours de campagnes d'observation régulières réalisées à haute résolution temporelle (hebdomadaire et parfois journalière) a permis de mettre en évidence, par des techniques complémentaires aux comptages microscopiques, de la complexité des proliférations/accumulation, des changements de dominance d'un groupe phytoplanctonique à un autre, répondant à des changements des conditions du milieu et d'avancée de la saison. Les analyses pigmentaires ont permis de compléter les données de référence auxquelles les techniques semi-automatisées telles que la cytométrie en flux de type scanning (CytoSense) et la fluorimétrie spectrale ont pu être comparées.

Ces techniques, de par la possibilité de les utiliser à haute résolution, permettent de mieux appréhender la diversité du phytoplancton et devraient donc permettre non seulement de construire un indice de composition pour la DCE, mais également d'apporter des informations cruciales, qui pourraient être utilisées pour estimer le bon état écologique des eaux marines du point de vue du phytoplancton dans le cadre de la DCSMM.

MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

Manche Orientale - Groupes phytoplanctoniques – Cytométrie en Flux de type Scanning – Fluorimétrie spectrale – Analyse CHEMTAX – Projet DYMAPHY

SYNTHESE POUR L'ACTION OPERAT IONNELLE

Afin d'appréhender la diversité du phytoplancton dans toutes ses composantes, il est donc proposé de ne pas se limiter au micro-phytoplancton, mais de considérer également les autres composants du phytoplancton, tels que le nano- et le pico-phytoplancton. Ceux-ci peuvent être mesurés par différentes techniques, qui sont complémentaires : cytométrie en flux traditionnelle ou cytométrie en flux permettant d'enregistrer le profil optique de chaque particule, analyse des pigments par HPLC, fluorescence spectrale, FlowCAM / Phytolmage, biodiversité génétique. Ces données complémentaires aux comptages microscopiques, en fournissant les éléments pour mieux appréhender la diversité du phytoplancton, devraient permettre non seulement de construire un indice de composition pour la DCE, mais aussi d'apporter des informations cruciales, qui pourraient être utilisées pour estimer le bon état écologique du point de vue du phytoplancton dans le cadre de la DCSMM.

Les différentes actions du présent livrable ont été principalement réalisées en collaboration entre l'UMR LOG de Wimereux et le laboratoire IFREMER LER/Boulogne avec participation des laboratoires DYNECO/PELAGOS, DYNECO/VIGIES d'IFREMER, du LISIC-ULCO de Calais et les partenaires du projet DYMAPHY. Plus particulièrement, il s'agissait de comparer des résultats obtenus à partir de différentes techniques innovantes, dont la cytométrie en flux, la fluorimétrie spectrale. Pour ce faire, l'analyse des premières comparaisons de mesures réalisées dans le cadre du projet INTERREG IVA « 2 Mers » DYMAPHY à la fois lors de campagnes communes et au niveau des sites d'observation et de surveillance en Manche Orientale seront présentées. Les données disponibles impliquant également, comme référence, des comptages microscopiques et des analyses pigmentaires seront également analysées en tant que référence (méthodes traditionnelles pour le suivi du phytoplancton).

En Manche Orientale et baie sud Mer du Nord, le suivi du phytoplancton s'organise autour de trois programmes ou réseaux :

- Le réseau de surveillance de la qualité des eaux marines côtières (Suivi Régional Des Nutriments SRN – Réseau des phytoplancton et phycotoxines REPHY, IFREMER), avec trois stations en face de Boulogne-sur-Mer, trois stations en face de Dunkerque et cinq stations en Baie de Somme
- Le Service d'Observation Littorale SOMLIT de l'INSU, avec une station côtière et une station au Sud de Boulogne sur Mer
- Le transect côte-large proche du Détroit du Pas-de-Calais (Radiale de la Baie Saint Jean – Wimereux-Slack), constitué de neuf points (R0 à R4) et s'étendant sur 9,7km (5.25 milles nautiques).

Concernant la radiale Saint-Jean, les prélèvements ont été réalisés entre février et novembre 2012, à savoir sur 16 radiales complètes de 9 points et 5 radiales de 3 à 7 points. Des mesures de fluorescence spectrale et de cytométrie en flux, ainsi que quelques analyses pigmentaires (HPLC) et des comptages phytoplanctoniques associés ont été réalisés.

En ce qui concerne les analyses réalisées sur des échantillons du réseau de surveillance de la qualité des eaux marines côtières (SRN-REPHY Ifremer), des mesures cytométriques, complémentaires aux comptages phytoplanctoniques, ainsi que des analyses de pigments (HPLC) ont été réalisées sur les sites de Dunkerque (9 x 3 points de février à novembre 2012), de Boulogne sur Mer (9 x 3 points de janvier à août 2012) et en Baie de Somme (10 x 5 points de janvier à novembre).

Finalement, les prélèvements sur les stations côte et/ou large du réseau d'observation INSU SOMLIT ont été réalisés de janvier à novembre 2012 (15 fois, dont 8 sur des échantillons à la fois côte et large), en parallèle avec des mesures cytométriques classiques (nano- et picoplancton) et des comptages microscopiques.

Lors des campagnes DYPHYMA, les scientifiques du projet DYMAPHY ont embarqué à bord du navire océanographique « Côtes de la Manche » (INSU-CNRS) du 19 au 30 avril et du 31 mai au 4 juin 2012 (Figure 2) afin de suivre les blooms de phytoplancton printaniers. Des mesures ont été effectuées à haute résolution spatiale et temporelle le long des gradients côte large et est-ouest des deux côtés de la Manche. Des enregistrements en continu, toutes les 1 à 10 minutes ont été réalisés dans les eaux de surface, à partir d'un système « Pocket Ferrybox ». L'abondance et la diversité des assemblages de phytoplancton ont été déterminés in vivo et in situ par le couplage de la fluorimétrie spectrale (AOA) et d'un cytomètre en flux de type CytoSense au PFB, et en complément des profils de sonde (Fluoroprobe). En complément, des prélèvements discrets ont été réalisés pour des comptages microscopiques et analyse pigmentaires. Des mesures ont été faites par fluorimétrie variable (Pulse Amplitude Modulated – PAM) afin de déterminer l'état physiologique des assemblages phytoplanctoniques étudiés. De nombreux capteurs optiques (LISST, ACS, TRIOS) ont permis de caractériser les propriétés optiques des particules et du dissous, ainsi que la réflectance de la surface des eaux marines. L'ensemble de ces mesures permettront de calibrer les mesures satellites qui suivent depuis l'espace la couleur de l'eau.

Le Fluoroprobe (bbe-Moldaenke©, Kiel, Allemagne) est un fluorimètre spectral utilisable en paillasse, mais également sous forme de sonde-profileur. Il permet de déterminer la biomasse phytoplanctonique par groupes d'algues à partir de leurs spectres d'excitation de fluorescence (Beutler et al., 2002). Il fonctionne en excitant les pigments accessoires des antennes du photosystème II grâce à 5 diodes d'émission de lumière (LED) de longueurs d'onde différentes. Ces pigments transfèrent l'énergie à la chlorophylle a, dont l'intensité relative de fluorescence est ensuite détectée à 680nm. Une fluorescence est attribuée à un type spécifique de pigment accessoire, caractéristique d'un certain groupe phytoplanctonique.

Le Fluoroprobe est capable de distinguer d'emblée quatre groupes spectraux :

- les « algues vertes » (Chlorobiontes),
- les « algues bleu-vert » (Cyanobactéries à phycocyanine majoritaire),
- les « algues brunes » (Straménopiles (dont Bacillariophyceae ou Diatomées), Haptobiontes, Dinobiontes)
- groupe mixte « cryptophytes » (Cryptobiontes, Rhodobiontes et Cyanobactéries à phycoérythrine majoritaire).

Les travaux de Houliez et al. (2012) ont permis la différenciation des Haptobiontes et en particulier l'espèce *Phaeocystis globosa*.

Les spectres de référence sont enregistrés à partir de cultures des algues et sont stockés dans l'appareil : ce sont les empreintes pigmentaires de référence. Pour les échantillons inconnus, le spectre d'excitation obtenu est comparé aux spectres de référence et par déconvolution, le signal de fluorescence est assigné aux différentes classes. La concentration relative de chaque groupe, ainsi que le total sont alors exprimés en terme de quantité équivalente de chlorophylle a par litre.

L'AOA (bbe-Moldaenke©, Kiel, Allemagne) mesure en continu et en temps réel la fluorescence chlorophyllienne des micro-algues. Le principe de la mesure est basé sur la détermination du spectre de fluorescence et de la cinétique de fluorescence des algues.

Afin de faciliter le déploiement en mer d'un système compact de mesures à haute résolution intégrant l'information relative aux groupes spectraux du phytoplancton mais aussi aux paramètres supports à la biologie, l'AOA a été intégré à un Pocket Ferry Box (4H-JENA©). Une description simplifiée du système Pocket Ferry Box a été faite par Schroeder et al.,

2008. L'eau entre dans le système grâce à une pompe de 12 V de débit 3-4 litre/min. Les unités de mesures (jusqu'à six unités) sont raccordées entre elles par des tuyaux de PVC ou de téflon et afin de réduire le volume mort, l'eau entre par le haut de l'unité et en sort par le bas. Ceci permet également d'éviter l'entrée massive d'air dans le système. Différentes unités peuvent être mises en place en fonction des objectifs de l'utilisateur. Le système Ifremer présente les unités suivantes : oxygène, température, salinité, pH, CDOM et fluorimètre spectrale AOA

La cytométrie en flux de type Scanning Flow Cytometry est une technique qui permet ainsi d'analyser séparément les particules ou cellules qui sont présentes dans un échantillon liquide. Cette méthode est basée sur la diffusion/diffraction des rayons lumineux issus d'un laser qui vont à la fois fournir des informations sur la taille et la structure de la particule, mais aussi sur leur fluorescence propre. Elle permet ainsi d'analyser un grand nombre de cellules en peu de temps, contrairement à la microscopie optique. Il est possible de classer les cellules en fonction de leur taille, de leur structure, de leur forme et de leur contenu pigmentaire.

Le cytomètre en flux Cytosense (Cytobuoy BV©, Pays-Bas) permet d'analyser individuellement des particules en suspension dans un milieu liquide (Dubelaar et al., 1999). Les cellules phytoplanctoniques, individualisées par un flux laminaire, passent une à une devant un faisceau laser de longueur d'onde définie (couleur bleue). Il en résulte une diffraction et une diffusion de la lumière, accompagnées éventuellement d'une émission de fluorescence suite à l'excitation d'un pigment photosynthétique. La principale particularité de ce Scanning Flow Cytometer est la capacité d'enregistrer les profils optiques de chaque particule de manière individuelle, et de pouvoir consulter par la suite chaque signature. Tout les renseignements issus de la rencontre entre le laser et les cellules sont traduits en cytogrammes contenant de nombreux profils et, en cas de couplage avec un système d'acquisition d'images, des photos associées.

En Manche Orientale, différents groupes ont été détectés depuis 2011 lors des surveillances régulières comme pendant les campagnes océanographiques conjointes, définis à partir des premiers travaux menés au moyen d'analyses cytométriques dans la zone (Guiselin 2010 ; Guiselin et al., 2010), en Mer du Nord (Rutten et al., 2005) ou ailleurs (Thyssen et al., 2008, 2010) : i) Picoplancton (0-3µm) : cyanobactéries du type *Synechococcus*, pico-eucaryotes, cellules pico-nano-planctoniques non identifiées à forte teneur en chlorophylle a (haut niveau en fluorescence rouge), ii) nanoplancton (3 µm – 10 µm) : d'un à trois groupes de *Phaeocystis globosa* (comportant différents stades de vie, grosses cellules diploïdes coloniales, cellules flagellées haploïdes de différentes tailles), Cryptophytes, Coccolithoporidés, iii) : microplancton : un à deux groupes, le groupe composite des « diatomées » (diatomées majoritaires, solitaires ou coloniales, colonies de *Phaeocystis* et dinoflagellés à forte teneur en chlorophylle a (fortes valeurs de fluorescence rouge), diatomées pennées (principalement du genre *Pseudonitzschia*) à faible contenu en chlorophylle a (donc, à faible fluorescence rouge associée).

Le suivi combiné de la distribution spatiale phytoplanctonique à haute résolution (kilométrique ou sub-kilométrique) au cours de campagnes océanographiques internationales ou au cours de campagnes d'observation régulières réalisées à haute résolution temporelle (hebdomadaire et parfois journalière) a permis de mettre en évidence, par des techniques complémentaires aux comptages microscopiques, de la complexité des proliférations/accumulation, des changements de dominance d'un groupe phytoplanctonique à un autre, répondant à des changements des conditions du milieu et d'avancée de la saison. Les analyses pigmentaires ont permis de compléter les données de référence auxquelles les techniques semi-automatisées telles que la cytométrie en flux de type scanning (CytoSense) et la fluorimétrie spectrale ont pu être comparées.

Ces techniques, de par la possibilité de les utiliser à haute résolution, permettent de mieux appréhender la diversité du phytoplancton et devraient donc permettre non seulement de construire un indice de composition pour la DCE, mais également d'apporter des informations cruciales, qui pourraient être utilisées pour estimer le bon état écologique des eaux marines du point de vue du phytoplancton dans le cadre de la DCSMM.



Rapport Final

**Participation à la définition d'un indice composition pour
le phytoplancton en Manche - Atlantique
Action Indice Composition. Livrable n° A II**

***Comparaison des résultats obtenus avec différentes
techniques d'évaluation du phytoplancton
antérieurement à 2013***

Février 2014

Luis Felipe ARTIGAS
Morgane DIDRY
Luis LAMPERT
Mathias BROUTIN
Simon BONATO
Fabrice LIZON
Alain LEFEBVRE



Table des matières

I) Contexte de l'action.....	3
II) Description de l'action.....	4
III) Matériel et méthodes.....	5
1) Aire d'échantillonnage régulier en Manche Orientale et Mer du Nord	5
2) Campagnes océanographiques côtières DYPHYMA I et II	6
3) La fluorescence spectrale	8
4) La cytométrie en flux de type « Scanning Flow Cytometry »	12
5) L'approche chémotaxonomique par HPLC (extrait de Lampert, 2014)	14
III) Résultats	17
1) Distribution du phytoplancton - Campagnes DYPHYMA	17
a) Analyses pigmentaires chémotaxonomiques	17
b) Analyses cytométriques en continu.....	20
d) Comparaison comptages cellulaires par cytométrie en flux et par microscopie.....	26
e) Comparaison des déterminations des groupes spectraux par cytométrie en flux, fluorescence spectrale et analyse pigmentaire	28
2) Dynamique saisonnière et distribution du phytoplancton en Manche Orientale (Station côtière R1 – Radiale Baie Saint Jean)	30
3) Dynamique de la distribution spatiale du phytoplancton en Manche Orientale (Radiale Baie Saint Jean) au printemps 2012	32
VI) Conclusion – Perspectives.....	34
Bibliographie	35
ANNEXES.....	38

I) Contexte de l'action

Les micro-organismes phytoplanctoniques, à la base de la plus grande partie des réseaux alimentaires marins, sont capables d'intégrer des perturbations naturelles ou induites par l'homme, en modifiant leur physiologie, leur taux de croissance et/ou en conduisant à la dominance d'une espèce ou groupe fonctionnel (modification de la biodiversité). Ils peuvent par conséquent être utilisés comme indicateurs de changements à court et long terme de la qualité de l'eau. De plus, le phytoplancton peut représenter une menace lorsqu'il est responsable de floraisons nuisibles.

Ces efflorescences peuvent provoquer des colorations des eaux, l'asphyxie ou le déclin de la végétation. Les aérosols qui s'en dégagent peuvent avoir des conséquences directes sur la santé humaine. Les écumes et mucus associés peuvent s'accumuler sur les rives et obstruer les filets des scientifiques. Les coquillages peuvent être contaminés par les toxines algales et les poissons et invertébrés tués lors de ces efflorescences toxiques. La détection précoce de ces événements est essentielle pour déclencher les procédures d'alertes et pour la diffusion de l'information auprès des institutions, des professionnels, des centres d'aquacultures, des fermes d'élevage, des autorités et du grand public.

L'élément de qualité phytoplancton doit être évalué dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau grâce à trois indices : biomasse, abondance et composition. Les deux premiers indices, biomasse et abondance, ont déjà été définis. L'indice composition a, quant à lui, fait l'objet d'une proposition précise en Méditerranée, mais pas en Manche - Atlantique. Les travaux antérieurs montrent que la construction d'un indice de composition doit tenir compte de la diversité de l'ensemble du phytoplancton. Or, les comptages microscopiques ne concernent en général que le micro-phytoplancton. Il est donc nécessaire de prendre en compte des informations supplémentaires qui tiennent compte du nano- et du pico-phytoplancton, dont l'importance dans la diversité du phytoplancton est cruciale. Par ailleurs, pour prendre en compte la dynamique du compartiment phytoplanctonique dans l'ensemble des eaux marines (en vue de définir les indicateurs pour la Directive Cadre Stratégie Milieu Marin (DCSMM), des mesures à haute résolution deviennent indispensables et possibles grâce au développement de nouveaux capteurs et systèmes d'analyse des résultats.

Dans ce contexte, le projet INTERREG IV A « 2 Mers » DYMAPHY (Développement d'un système d'observation DYnamique pour la détermination de la qualité des eaux MARines, basé sur l'analyse du PHYtoplancton), co-financé par des fonds FEDER entre 2010 et 2014, visait à améliorer les connaissances et l'évaluation des eaux marines de La Manche et de la Mer du Nord à travers le compartiment phytoplanctonique et ses paramètres complémentaires (<http://www.dymaphy.eu>).

La caractéristique essentielle de ce projet a été le couplage des méthodes traditionnelles avec des méthodes innovantes semi-automatisées permettant d'accéder à un échantillonnage à haute résolution, ainsi que la mise en place des traitements de données qui en découlent.

Convention ONEMA-Ifremer 2013

Il a rallié 6 partenaires institutionnels et académiques des pays riverains des 2 Mers (Manche orientale et Mer du Nord) autour du même souci de l'amélioration du suivi opérationnel de la qualité des eaux marines :

- Université du Littoral Côte d'Opale (LISIC Calais, LOG Wimereux et Dunkerque, France)
- Cefas (Suffolk, Royaume Uni)
- Rijkswaterstaat (Zeeland, Pays-Bas)
- Ifremer (LER - Boulogne sur Mer, France)
- Université Lille 1 (LOG Wimereux et Villeneuve d'Ascq, France)
- CNRS (LOG Wimereux et Lille, France)

II) Description de l'action

Afin d'appréhender la diversité du phytoplancton dans toutes ses composantes, il est donc proposé de ne pas se limiter au micro-phytoplancton, mais de considérer également les autres composants du phytoplancton, tels que le nano- et le pico-phytoplancton.

Ceux-ci peuvent être mesurés par différentes techniques, qui sont complémentaires : cytométrie en flux traditionnelle ou cytométrie en flux permettant d'enregistrer le profil optique de chaque particule, analyse des pigments par HPLC, fluorescence spectrale, FlowCAM / PhytoImage, biodiversité génétique.

Ces données complémentaires aux comptages microscopiques, en fournissant les éléments pour mieux appréhender la diversité du phytoplancton, devraient permettre non seulement de construire un indice de composition pour la DCE, mais aussi d'apporter des informations cruciales, qui pourraient être utilisées pour estimer le bon état écologique du point de vue du phytoplancton dans le cadre de la DCSMM.

Les différentes actions du présent livrable ont été principalement réalisées en collaboration entre l'UMR LOG de Wimereux et le laboratoire IFREMER LER/Boulogne avec participation des laboratoires DYNECO/PELAGOS, DYNECO/VIGIES d'IFREMER, du LISIC-ULCO de Calais et les partenaires du projet DYMAPHY.

Plus particulièrement, il s'agissait de comparer des résultats obtenus à partir de différentes techniques innovantes, dont la cytométrie en flux, la fluorimétrie spectrale. Pour ce faire, l'analyse des premières comparaisons de mesures réalisées dans le cadre du projet INTERREG IVA « 2 Mers » DYMAPHY à la fois lors de campagnes communes et au niveau des sites d'observation et de surveillance en Manche Orientale seront présentées.

Les données disponibles impliquant également, comme référence, des comptages microscopiques et des analyses pigmentaires seront également analysées en tant que référence (méthodes traditionnelles pour le suivi du phytoplancton).

III) Matériel et méthodes

1) Aire d'échantillonnage régulier en Manche Orientale et Mer du Nord

En Manche Orientale et baie sud Mer du Nord, le suivi du phytoplancton s'organise autour de trois programmes ou réseaux (Figure 1):

- Le réseau de surveillance de la qualité des eaux marines côtières (Suivi Régional Des Nutriments SRN – Réseau du phytoplancton et des phycotoxines REPHY, IFREMER), avec trois stations en face de Boulogne-sur-Mer, trois stations en face de Dunkerque et cinq stations en Bais de Somme
- Le Service d'Observation Littorale SOMLIT du CNRS-INSU, avec une station côtière et une station au Sud de Boulogne sur Mer
- Le transect côte-large proche du Détroit du Pas-de-Calais (Radiale de la Baie Saint Jean – Wimereux-Slack), constitué de neuf points (R0 à R4) et s'étendant sur 9,7km (5.25 milles nautiques), réseau d'observation à haute résolution de l'UMR LOG – RESOMAR et du projet DYMAPHY.

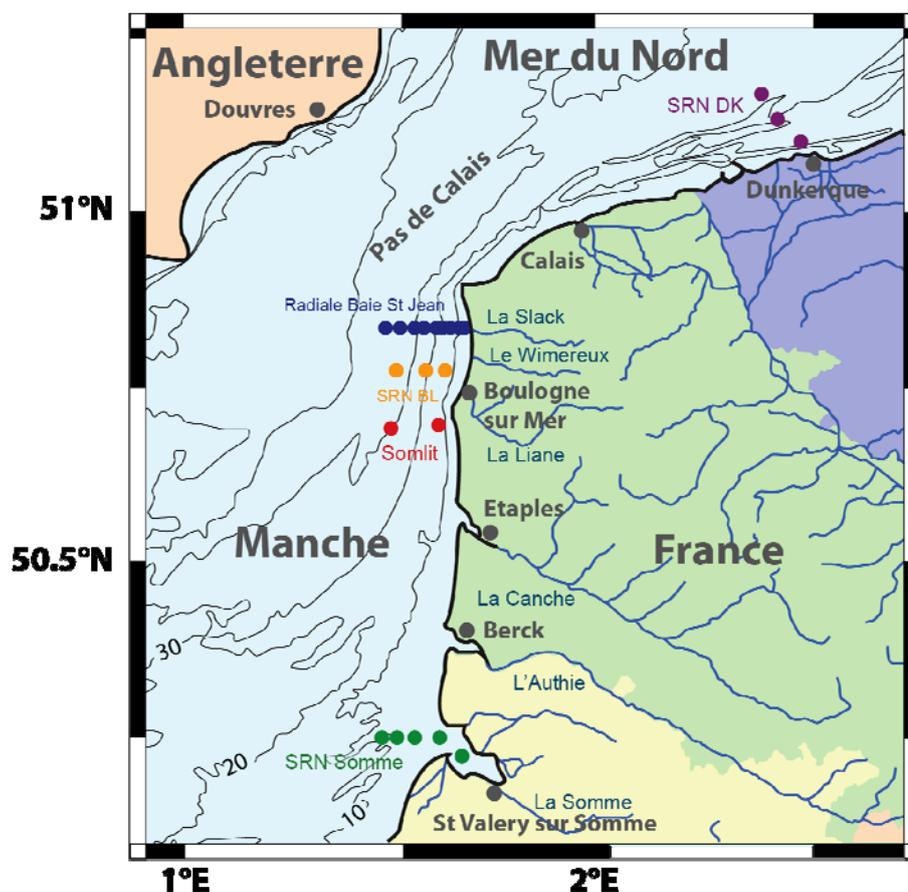


Figure 1 : Localisation des sites d'observation/surveillance du phytoplancton en Manche Orientale et baie sur Mer du Nord (SRN-IFREMER, SOMLIT-INSU, Radiale Baie St Jean – RESOMAR – DYMAPHY).

Concernant la radiale Saint-Jean, les prélèvements ont été réalisés entre février et juin 2012, à savoir sur 11 radiales complètes de 9 points et 3 radiales de 3 à 7 points. Des mesures de fluorescence spectrale et de cytométrie en flux, ainsi que quelques analyses pigmentaires (HPLC) et des comptages phytoplanctoniques associés ont été réalisés. Des prélèvements des réseaux de surveillance (REPHY/SRN-IFREMER) et d'observation (SOMLIT-INSU) ont également été analysés, mais seront traités ultérieurement.

2) Campagnes océanographiques côtières DYPHYMA I et II

Lors des campagnes DYPHYMA, les scientifiques du projet DYMAPHY ont embarqué à bord du navire océanographique « Côtes de la Manche » (INSU-CNRS) du 19 au 30 avril et du 31 mai au 4 juin 2012 (Figure 2) afin de suivre les blooms de phytoplancton printaniers. Des mesures ont été effectuées à haute résolution spatiale et temporelle le long des gradients côte large et est-ouest des deux côtés de la Manche. Des enregistrements en continu, toutes les 1 à 10 minutes ont été réalisés dans les eaux de surface, à partir d'un système « Pocket Ferrybox ». L'abondance et la diversité des assemblages de phytoplancton ont été déterminés *in vivo* et *in situ* par le couplage de la fluorimétrie spectrale (AOA) et d'un cytomètre en flux de type CytoSense au PFB, et en complément des profils de sonde (Fluoroprobe). En complément, des prélèvements discrets ont été réalisés pour des comptages microscopiques et analyse pigmentaires. Des mesures ont été faites par fluorimétrie variable (Pulse Amplitude Modulated – PAM) afin de déterminer l'état physiologique des assemblages phytoplanctoniques étudiés. De nombreux capteurs optiques (LIST, ACS, TRIOS) ont permis de caractériser les propriétés optiques des particules et du dissous, ainsi que la réflectance de la surface des eaux marines. L'ensemble de ces mesures permettront de calibrer les mesures satellites qui suivent depuis l'espace la couleur de l'eau.

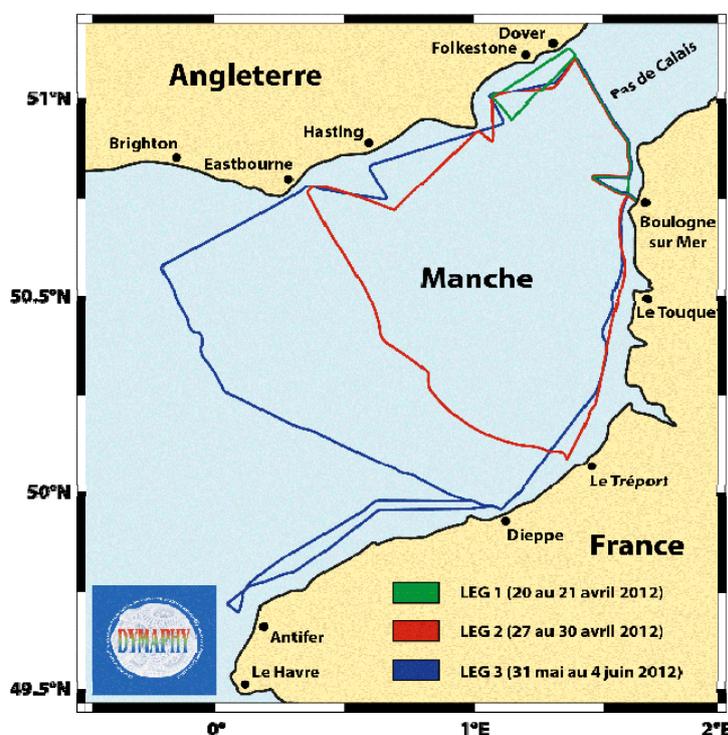
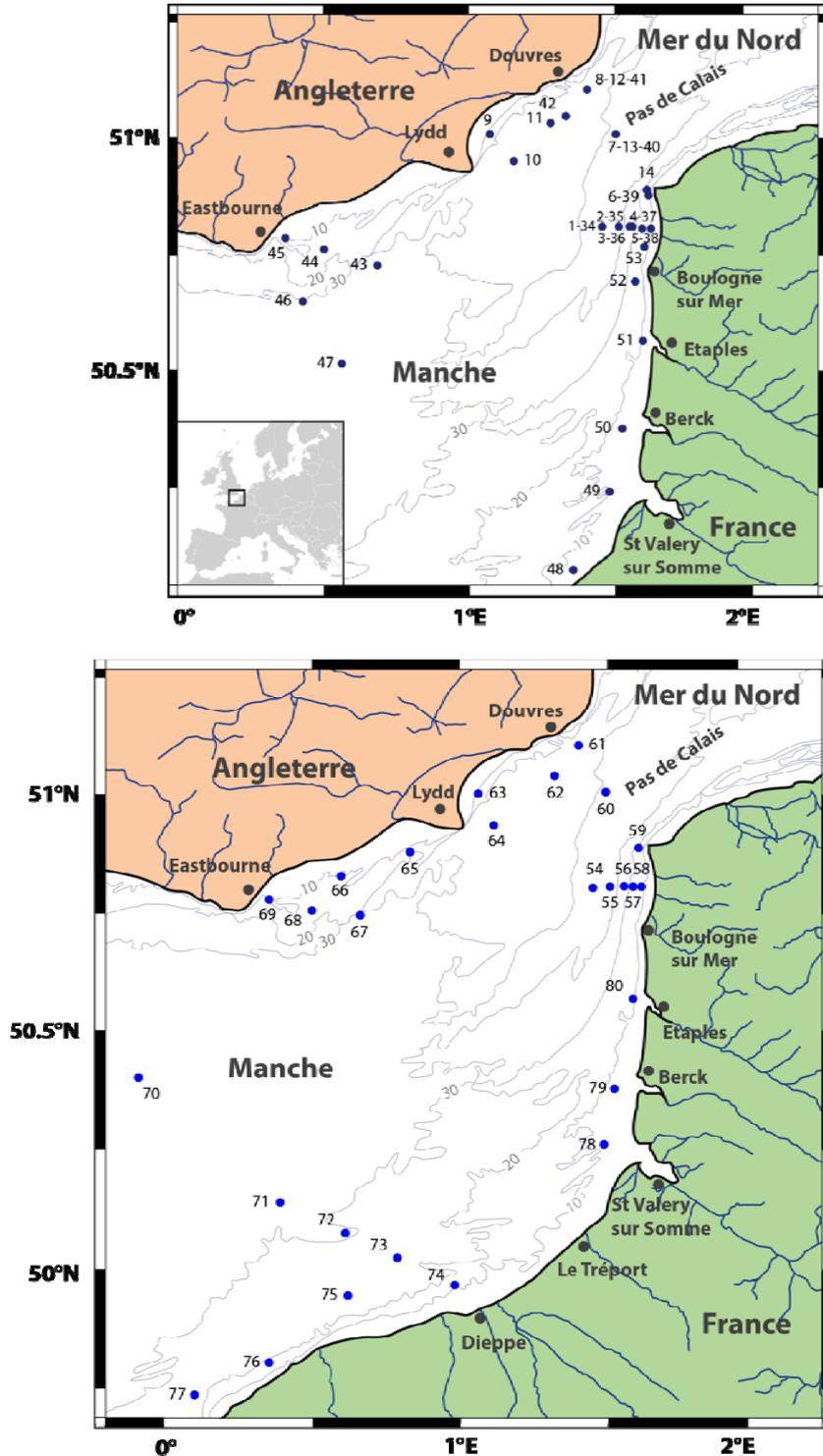


Figure 2 : Trajet des trois Legs des campagnes DYPHYMA I et II (printemps 2012) – Projet INTERREG IVA « 2 Mers » DYMAPHY

Convention ONEMA-Ifremer 2013

L'ensemble des échantillons ont été réalisés sur deux périodes distinctes (Figure 3) :

- Stations DPM 1 à DPM 53 : entre le 20 et le 29 avril 2012
- Stations DPM 54 à DPM 80 : entre le 31 mai et le 4 juin 2012



3) La fluorescence spectrale

Les masses d'eau côtières sont composées d'une grande diversité phytoplanctonique représentée par différents groupes pigmentaires/taxinomiques de micro-algues, les plus communes étant les algues « bleu-vert » (Cyanobactéries), les « vertes » (Chlorophytes et autres groupes), les « rouges » (Rhodophytes, Cryptophytes) et les « jaune-marron » (contenant entre autres les Bacillariophytes ou Diatomées, les Haptophytes dont les Prymnésiophycées telles que *Phaeocystis* sp. et les Coccolithophoridés et les Dynophytes ou Dinoflagellés). Il a été établi que la fluorescence est majoritairement émise par la chlorophylle *a* contenue dans le Photosystème II (PSII) des individus phytoplanctoniques (Beutler *et al.*, 2002). Par ailleurs, chacun des groupes est caractérisé par des pigments photosynthétiques différents accessoires et ont donc des spectres de fluorescence distincts, ce qui permet de révéler la structure de la communauté phytoplanctonique étudiée. Ce sont ces propriétés qui ont été exploitées pour le développement de l'**Algae Online Analyser (AOA)** et du **Fluoroprobe** par bbe-Moldaenke[®] (<http://www.bbe-moldaenke.de/>).

Contrairement à l'approche conventionnelle par microscopie qui nécessite plusieurs heures pour analyser un échantillon de phytoplancton, la fluorescence spectrale produit rapidement un résultat quant au contenu en chlorophylle totale et à la répartition des principaux groupes spectraux (associés aux groupes pigmentaires); le niveau de précision est bien entendu différent mais permet d'avoir une approche taxonomique préliminaire en quelques minutes. Pour la différenciation des différentes classes d'algues, le spectre d'un mélange d'algues est enregistré et les différentes classes peuvent ainsi être définies grâce à une procédure arithmétique statistique développée dans Beutler *et al.*, 2002 et Ruser *et al.*, 1999. Le logiciel de l'AOA et du Fluoroprobe identifie alors la distribution des différentes classes d'algues au regard du « contenu en équivalents de chlorophylle *a* » totale. Ce système est adaptable à de nouvelles empreintes ajoutées à la bibliothèque à partir de mesures *in situ* ou de cultures. Toutes les mesures de l'AOA et du Fluoroprobe sont basées sur les caractéristiques de fluorescence de la chlorophylle *a* et des autres pigments algaux. Les algues peuvent être différenciées par leurs pigments qui, excités par différentes longueurs d'onde, émettent différentes réponses de fluorescence. Chaque classe d'algue a ainsi sa propre empreinte, qui correspond à un schéma spécial selon lequel elle va réagir à ces différentes longueurs d'ondes d'excitation (450, 525, 570, 590 and 610 nm). Suivant une phase d'adaptation au noir, une lumière pulsée de l'analyseur spectral va exciter les pigments de l'algue. Les signaux de fluorescence sont collectés par un système photomultiplicateur et utilisés pour le calcul des classes d'algues. Afin de compenser les effets de l'influence de la turbidité sur la mesure de la fluorescence, une mesure de la transmission est faite à 370 nm. En effet, la mesure des substances jaunes (CDOM) introduit une nouvelle source de fluorescence (surtout pour de faibles concentrations en chlorophylle *a*) que l'AOA et le Fluoroprobe corrigent automatiquement.

Le Fluoroprobe (bbe-Moldaenke[®], Kiel, Allemagne) est un fluorimètre spectral utilisable en paillasse, mais également sous forme de sonde-profileur. Il permet de déterminer la biomasse phytoplanctonique par groupes d'algues à partir de leurs spectres d'excitation de fluorescence (Beutler *et al.*, 2002). Il fonctionne en excitant les pigments accessoires des antennes du photosystème II grâce à 5 diodes d'émission de lumière (LED) de longueurs d'onde différentes. Ces pigments transfèrent l'énergie à la chlorophylle *a*, dont

Convention ONEMA-Ifremer 2013

l'intensité relative de fluorescence est ensuite détectée à 680nm. Une fluorescence est attribuée à un type spécifique de pigment accessoire, caractéristique d'un certain groupe phytoplanctonique.

Le Fluoroprobe est capable de distinguer d'emblée quatre groupes spectraux :

- les « algues vertes » (Chlorobiontes),
- les « algues bleu-vert » (Cyanobactéries à phycocyanine majoritaire),
- les « algues brunes » (Straménopiles (dont Bacillaryophyceae ou Diatomées), Haptobiontes, Dinobiontes)
- groupe mixte « cryptophytes » (Cryptobiontes, Rhodobiontes et Cyanobactéries à phycoérythrine majoritaire).

Les travaux de Houliez *et al.* (2012) ont permis la différenciation des Haptobiontes et en particulier l'espèce *Phaeocystis globosa*.

Les spectres de référence sont enregistrés à partir de cultures des algues et sont stockés dans l'appareil : ce sont les empreintes pigmentaires de référence. Pour les échantillons inconnus, le spectre d'excitation obtenu est comparé aux spectres de référence et par déconvolution, le signal de fluorescence est assigné aux différentes classes. La concentration relative de chaque groupe, ainsi que le total sont alors exprimés en terme de quantité équivalente de chlorophylle *a* par litre.

L'AOA (bbe-Moldaenke[®], Kiel, Allemagne) mesure en continu et en temps réel la fluorescence chlorophyllienne des micro-algues. Le principe de la mesure est basé sur la détermination du spectre de fluorescence et de la cinétique de fluorescence des algues (même dispositif et même capacité de discrimination que le Fluoroprobe).

Afin de faciliter le déploiement en mer d'un système compact de mesures à haute résolution intégrant l'information relative aux groupes spectraux du phytoplancton mais aussi aux paramètres supports à la biologie, l'AOA a été intégré à un **Pocket Ferry Box** (4H-JENA[®]). Une description simplifiée du système Pocket Ferry Box a été faite par Schroeder *et al.*, 2008. L'eau entre dans le système grâce à une pompe de 12 V de débit 3-4 litre/min. Les unités de mesures (jusqu'à six unités) sont raccordées entre elles par des tuyaux de PVC ou de téflon et afin de réduire le volume mort, l'eau entre par le haut de l'unité et en sort par le bas. Ceci permet également d'éviter l'entrée massive d'air dans le système. Différentes unités peuvent être mises en place en fonction des objectifs de l'utilisateur. Le système Ifremer présente les unités suivantes : oxygène, température, salinité, pH, CDOM et fluorimètre spectrale AOA (Tableau 1).

Tableau 1 : Principales caractéristiques des capteurs équipant le Pocket Ferry Box

Nom de capteurs	Paramètres mesurés	Gamme	Incertitude/Précision
Meinsberg	pH	0 à 14	0,05
	Température	-5 à 80 °C	0,01 °C
Optode	Oxygène dissous	0 à 500 µmol.L ⁻¹	< 0,1 µmol.L ⁻¹
Conductivité	Salinité	0 à 75 mS.cm ⁻¹	0,05 mS.cm ⁻¹
	Température	-5 à 40 °C	0,01 °C
Cyclops	Matière organique dissoute colorée (CDOM)	0 à 2500 ppb	0,2 ppb

Puisque l'objectif est de pouvoir obtenir une acquisition à haute résolution spatiale et/ou temporelle, l'Ifremer a développé une unité de prélèvement (échantillonnage en subsurface) afin de pouvoir mettre en oeuvre le système sur des embarcations ne possédant pas d'alimentation directe en eau de mer et permettant une navigation à une vitesse de l'ordre de 7 nœuds (Figure 4). La position du bateau, et donc de l'échantillon, est sauvegardée automatiquement par un GPS couplé au Pocket Ferry Box. Toutes les commandes du Pocket Ferry Box ainsi que l'accès aux données se font via un PC tactile étanche intégré au système.



Figure 4 : Le système de prélèvement lors d'un déploiement en mer. Le système est relié au bateau par un câble lié au tuyau d'alimentation en eau. La pompe est à bord du bateau.

Le système de mesures à haute résolution spatiale et temporelle déployé lors des campagnes communes du projet Interreg IV A « 2 Mers » DYMAPHY est présenté dans sa configuration définitive sur les figures 5, 6 et 7. Ce dispositif permet de coupler, en dérivation un Cytomètre en Flux de type Scanning Flow Cytometer (CytoSense, CytoBuoy[®]).

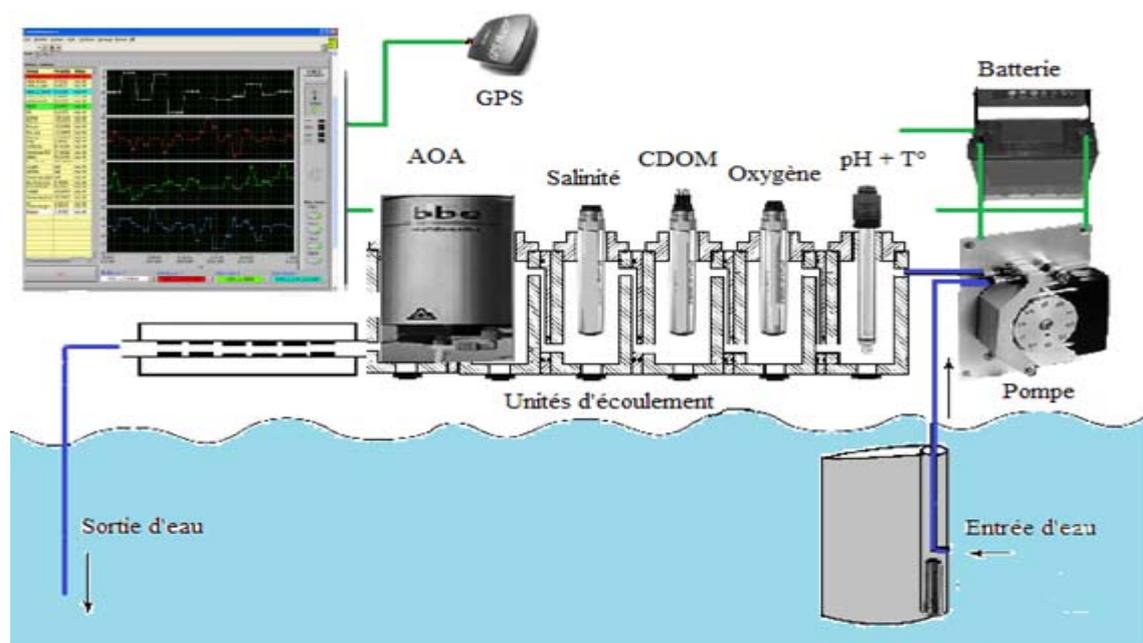


Figure 5 : Schéma de circulation de l'eau de mer dans le Pocket Ferry Box et écran de contrôle et de visualisation des résultats (en haut à gauche).

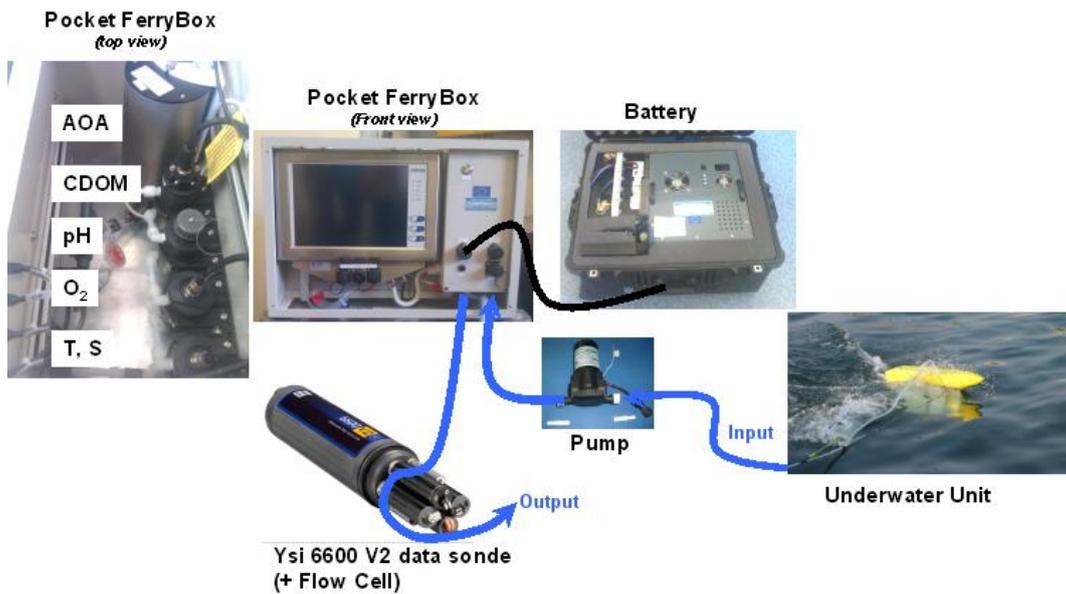


Figure 6 : Le système de mesure à haute résolution spatiale et temporelle dans sa configuration définitive et tel que déployé lors des campagnes océanographiques du projet Interreg IV A « 2 Mers » DYMAPHY à partir d'embarcations ne possédant pas de système intégré d'alimentation en eau de mer.

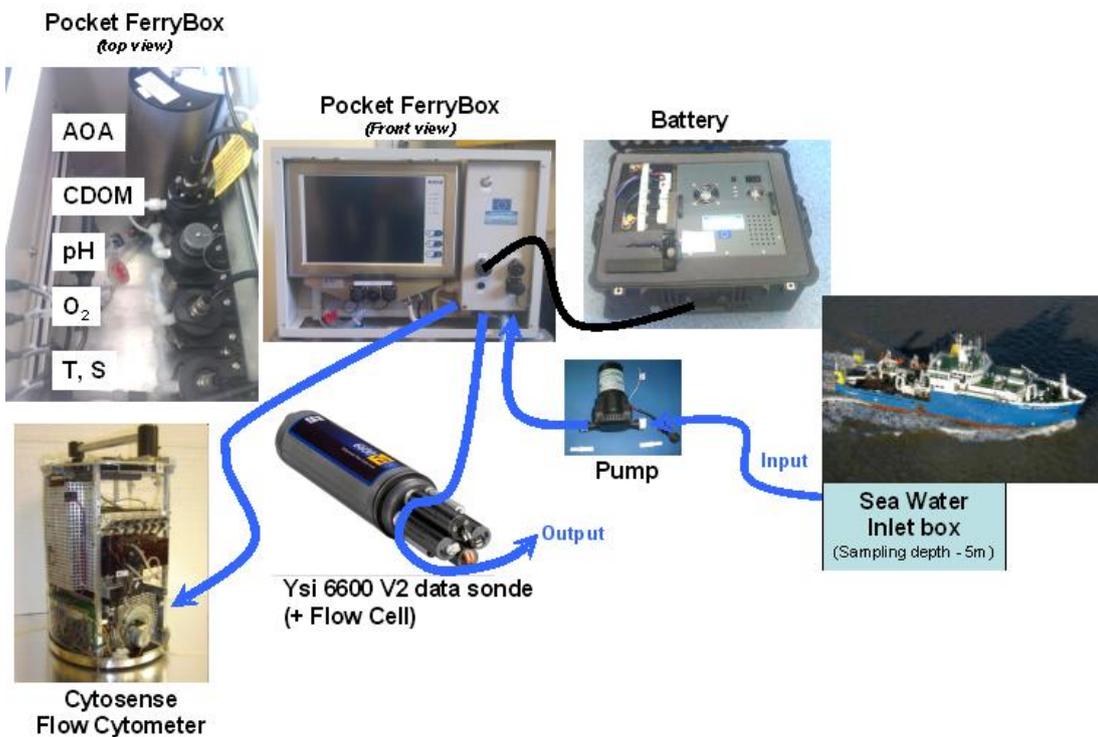


Figure 7 : Le système de mesure à haute résolution spatiale et temporelle dans sa configuration définitive et tel que déployé lors des campagnes océanographiques du projet DYMAPHY à partir d'embarcation possédant un système intégré d'alimentation en eau de mer.

4) La cytométrie en flux de type « Scanning Flow Cytometry »

Durant les 20 dernières années, la cytométrie en flux a été reconnue comme un instrument puissant pour l'étude de l'écologie microbienne. Cette technique est particulièrement pertinente pour compter et mesurer rapidement des cellules individuelles isolées ou pour discriminer des sous-populations homogènes sur des critères de fluorescence et de taille (Olson *et al.* 1993). Une nouvelle génération de cytomètres en flux (Scanning Flow Cytometer-SFCM), permettant d'enregistrer le profil optique de chaque particule à vu le jour, couplée à de l'analyse d'image ou pas, depuis une dizaine d'années (Sosik & Olson 2007; Thyssen *et al.*, 2008, 2010). Cette technique permet ainsi d'analyser séparément les particules ou cellules qui sont présentes dans un échantillon liquide. Cette méthode est basée sur la diffusion/diffraction des rayons lumineux issus d'un laser qui vont à la fois fournir des informations sur la taille et la structure de la particule, mais aussi sur leur fluorescence propre. Elle permet ainsi d'analyser un grand nombre de cellules en peu de temps, contrairement à la microscopie optique. Il est possible de classer les cellules en fonction de leur taille, de leur structure, de leur forme et de leur contenu pigmentaire (Figure 8).

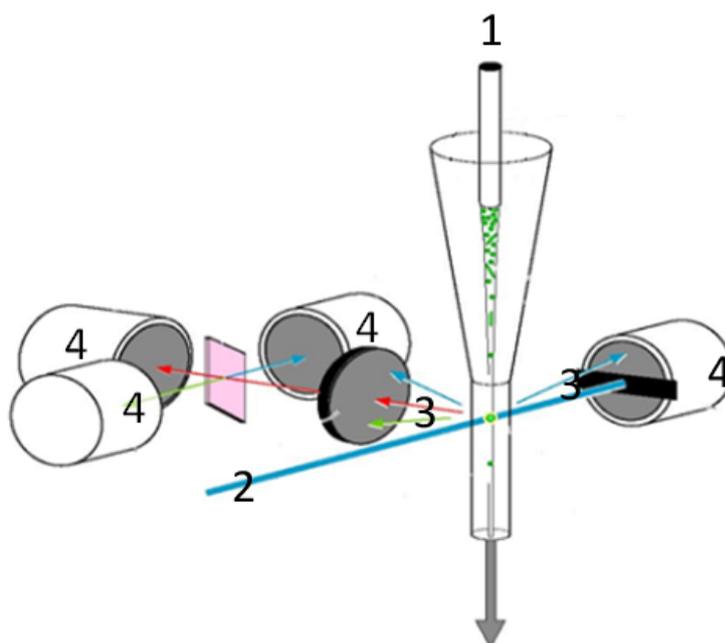


Figure 8 : Principe de fonctionnement du cytomètre en flux : L'échantillon liquide (1) est entraîné puis réduit à un filet d'eau très mince permettant aux cellules de passer les unes après les autres devant le faisceau du laser (2). Les phénomènes de diffusion et d'émission (3) de lumière induits vont être collectés par les photorécepteurs (4) et nous donner des renseignements sur la structure, la morphologie et la composition pigmentaire du phytoplancton.

Le cytomètre en flux Cytosense (Cytobuoy BV[®], Pays-Bas) est un Scanning Flow Cytometer permettant d'analyser individuellement des particules en suspension dans un milieu liquide (Dubelaar *et al.*, 1999). Il a été tout particulièrement utilisé pour suivre les communautés phytoplanctoniques en Manche Orientale (Guiselin 2010 ; Guiselin *et al.*, 2009), permettant d'analyser une gamme de tailles étendue allant de 1 à 800µm de diamètre

et plusieurs mm de longueur (pour les chaînes). Les cellules phytoplanctoniques, individualisées par un flux laminaire, passent une à une devant un faisceau laser de longueur d'onde définie (couleur bleue). Il en résulte une diffraction et une diffusion de la lumière, accompagnées éventuellement d'une émission de fluorescence suite à l'excitation d'un pigment photosynthétique.

La principale particularité de ce cytomètre est la capacité d'enregistrer les profils optiques de chaque particule de manière individuelle, et de pouvoir consulter par la suite chaque signature. Tous les renseignements issus de la rencontre entre le laser et les cellules sont traduits en cytogrammes contenant de nombreux profils et, en cas de couplage avec un système d'acquisition d'images, des photos associées (Figure 9)

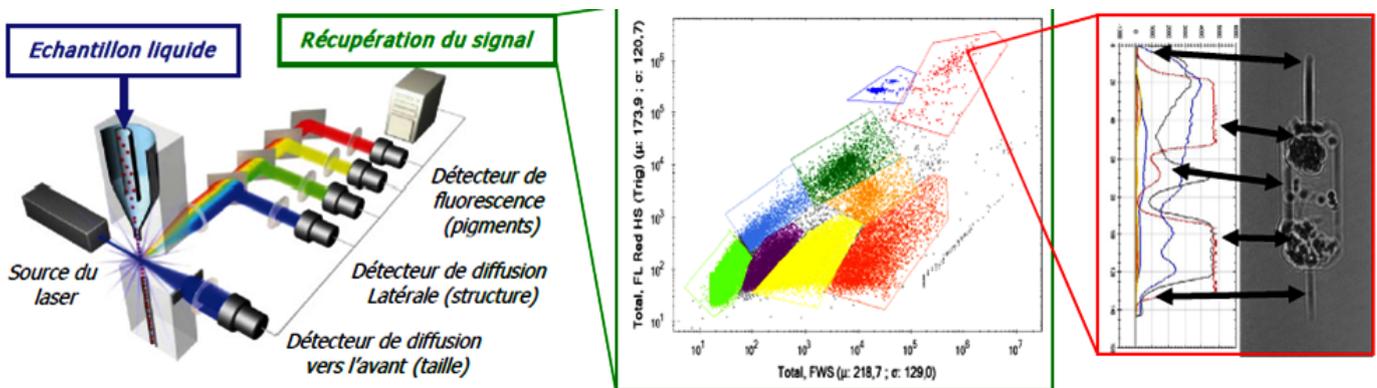


Figure 9 : Diagramme fonctionnel d'un cytomètre en flux (CytoSense – gauche). Exemple d'un cytogramme (au centre, chaque groupe ou cluster représente un groupe phytoplanctonique et chaque point, une cellule ou colonie). Le détail d'un profil optique d'une cellule de diatomée (*Ditylum brightwellii*, droite), associé à une photo prise par une caméra couplée au cytomètre en flux.

En Manche Orientale, différents groupes ont été détectés depuis 2011 lors des surveillances régulières comme pendant les campagnes océanographiques conjointes, définis à partir des premiers travaux menés au moyen d'analyses cytométriques dans la zone (Guiselin 2010 ; Guiselin *et al.*, 2009), en Mer du Nord (Rutten *et al.*, 2005) ou ailleurs (Thyssen *et al.*, 2008, 2010) : i) Picoplancton (0-3µm) : cyanobactéries du type *Synechococcus*, pico-eucaryotes, cellules pico-nano-planctoniques non identifiées à forte teneur en chlorophylle *a* (haut niveau en fluorescence rouge), ii) nanoplancton (3 µm – 10 µm) : d'un à trois groupes de *Phaeocystis globosa* (comportant différents stades de vie, grosses cellules diploïdes coloniales, cellules flagellées haploïdes de différentes tailles), Cryptophytes, Coccolithoporidés, iii) : microplancton (> 20 µm) : un à deux groupes, le groupe composite des « diatomées » (diatomées majoritaires, solitaires ou coloniales, colonies de *Phaeocystis* et dinoflagellés) à forte teneur en chlorophylle *a* (fortes valeurs de fluorescence rouge) et celui des diatomées pennées (principalement du genre *Pseudonitzschia*) à faible contenu en chlorophylle *a* (donc, à faible fluorescence rouge associée).

5) L'approche chémotaxonomique par HPLC (extrait de Lampert, 2014)

Pour pallier aux inconvénients de l'approche microscopique traditionnelle (reproductibilité des résultats dépendant fortement de l'expérience de l'opérateur, très consommateur de temps et impossibilité d'évaluer les classes de taille nano et picophytoplanctoniques), Jeffrey a suggéré pour la première fois l'utilisation des pigments pour l'étude taxonomique du phytoplancton en utilisant la chromatographie à couche mince (Jeffrey 1961; Jeffrey 1968). Les études de la structure des communautés phytoplanctoniques des années suivantes ont intégré davantage l'utilisation des pigments (TLC et HPLC) pour expliquer leur distribution dans la mer. L'identification de nouveaux pigments à partir des souches algales isolées ont mis en évidence le rapport entre groupes phytoplanctoniques et pigments ; ainsi chaque année la liste de nouveaux pigments s'allonge, permettant l'identification de nouveaux groupes. Il a alors été possible de définir des biomarqueurs capables de représenter des catégories taxonomiques ou fonctionnelles qui soient suffisamment spécifiques et discriminantes d'une classe algale. Ainsi des nouveaux groupes phytoplanctoniques, parmi lesquels nous pouvons citer le prasincoxanthine pour les Pranisophycées (Foss *et al.* (1984)), la 19BF pour les Pélagophycées (Andersen *et al.* (1993)) ou la DV-chla pour les Prochlorophycées (Goericke et Repeta (1992)) ont pu être ajoutés à la liste de classes algales.

Les analyses pigmentaires par HPLC ont été réalisées principalement sur les échantillons des campagnes DYPHYMA, par le laboratoire LOG de Wimereux, avec la méthode mise au point par Zapata (Zapata *et al.*, 2000), et les analyses des données pigmentaires ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire DYNECO/PELAGOS d'IFREMER (résultats détaillés dans le rapport de Lampert, 2014).

La matrice de corrélations effectuée sur l'ensemble de pigments montre la chl a fortement corrélée à la fucoxanthine, suggérant que les fortes biomasses sont en relation avec les diatomées et/ou *Phaeocystis*. Une première analyse chémotaxonomique par régressions multiples a été réalisée avec des rapports uni-pigmentaires. La présence de *Phaeocystis* provoque une surestimation des diatomées et une sous-estimation des Haptophytes, ce qui rend cette méthode difficilement applicable dans notre cas. Nous appliquons donc la méthode CHEMTAX pour mieux discriminer les classes algales par des rapports multi-pigmentaires. Pour éviter les problèmes de valeurs négatives et incohérentes qui peuvent être obtenues par les régressions multiples, Mackey *et al.* (1996) ont développé CHEMTAX (CHEMical TAXonomy) sous environnement Matlab[®], puis sous Excel pour la version Chemtax 1.95. Ce programme d'analyse factorielle permet d'obtenir la contribution de chaque classe algale par rapport à la biomasse totale. La matrice de pigments [S] est factorisée en une matrice de rapports pigmentaires [F] et une autre matrice qui donne l'abondance de chaque classe algale par échantillon [C]. Une matrice initiale de rapports pigmentaires [Fo] issus de la littérature est donnée afin de commencer les calculs itératifs. Il est essentiel d'ajuster au mieux les rapports initiaux [Fo] de ceux qui sont susceptibles d'être rencontrés dans les échantillons, donc avoir la meilleure connaissance possible des classes algales dominantes et leurs rapports pigmentaires. Il est toujours préférable de disposer des échantillons d'eau de mer pour connaître les espèces présentes dans les échantillons avant de définir la matrice de rapports pigmentaires Fo (Irigoien *et al.* 2004) ainsi que l'environnement physico-chimique dans lequel ont évolué les espèces.

Matrice pigmentaire initiale Fo : De l'étude des dénombrements phytoplanctoniques par microscopie nous retenons la présence des fortes abondances de *Phaeocystis* sp. lors des campagnes du mois d'avril. Nous en avons tenu compte pour la définition de la matrice Fo. En fonction des pigments présents dans l'échantillon nous avons retenu les classes algales suivantes pour la matrice Fo : Diatomées, Dinoflagellés, algues vertes (Chlorophycées), Cyanophycées, Cryptophycées, Haptophytes type 6 (Coccolithophoridées), Haptophytes type 8 (*Phaeocystis* sp) et Chrysophycées (probablement des Pélagophycées). Pour le choix des rapports pigmentaire liés à ces classes algales (Tableau 2), nous avons pris en considération le travail réalisé par Muylaert sur les côtes belges (Muylaert *et al.* 2006) et des rapports pigmentaires issus de la bibliographie (Higgins, Wright, et Schlüter 2011).

Tableau 2 : Matrice de rapports pigmentaires initiaux Fo
(c3 = chlorophylle c3, peri = périidine, BF = 19'butanoyloxyfucoxanthine, fuco = fucoxanthine, viola = violaxanthine, allo = alloxanthine, D+D = diadinoxanthine+diatoxanthine, zea = zéaxanthine, chla = chlorophylle a)

	c3	peri	BF	fuco	viola	allo	D+D	zea	chla
Chloros	0	0	0	0	0.078	0	0	0.034	1
Cyanos	0	0	0	0	0	0	0	0.215	1
Diatos	0	0	0	0.378	0	0	0.043	0	1
Dinos	0	0.366	0	0	0	0	0.152	0	1
Cryptos	0	0	0	0	0	0.253	0	0	1
Hapto6	0.146	0	0	0.195	0	0	0.109	0	1
Hapto8	0.075	0	0	0.387	0	0	0.013	0	1
Chrysos	0	0	0.847	0.365	0	0	0	0	1

Calculs CHEMTAX : Pour optimiser les calculs sur CHEMTAX il est préférable de scinder la matrice de données [S] en fractions homogènes. Ceci peut être en fonction de la période d'échantillonnage, du secteur géographique ou selon la composition pigmentaire elle-même. Nous adoptons une première approche en réalisant une analyse par groupements hiérarchiques (clusters) sur la matrice pigmentaire totale en utilisant la distance euclidienne D1 (Legendre et Legendre 1998) afin de détecter de discontinuités dans le pool pigmentaire (Not *et al.* 2008). Cette méthode, qui permet d'améliorer l'inférence chénotaxonomique, a abouti à deux sous-ensembles distincts (figures 10 et 11).

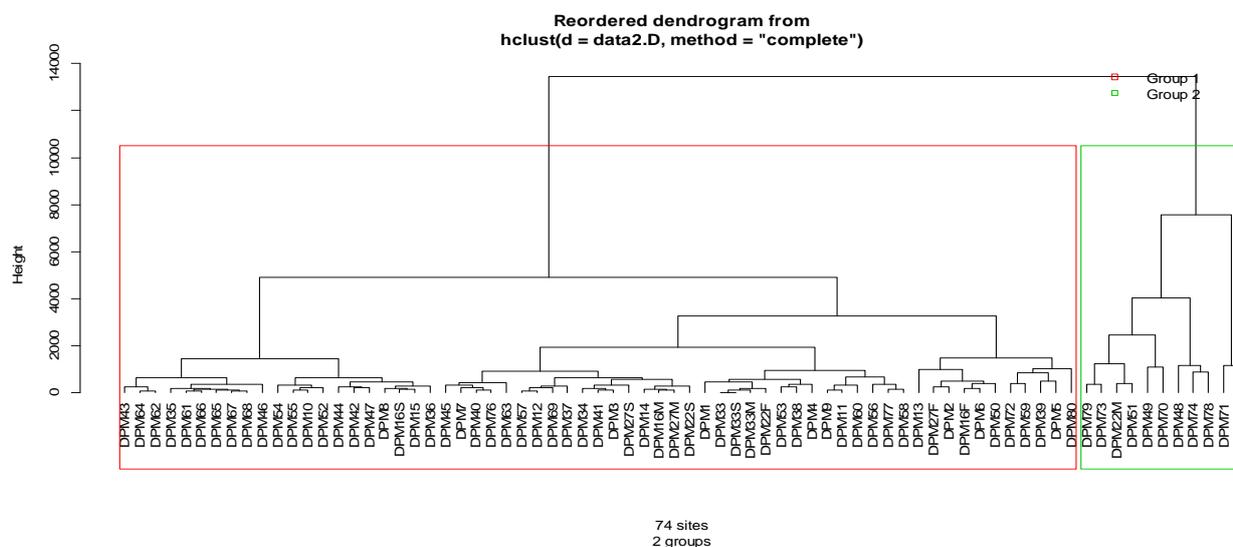


Figure 10 : Résultat du groupement hiérarchique mené sur la matrice pigmentaire totale avec la distance euclidienne D1

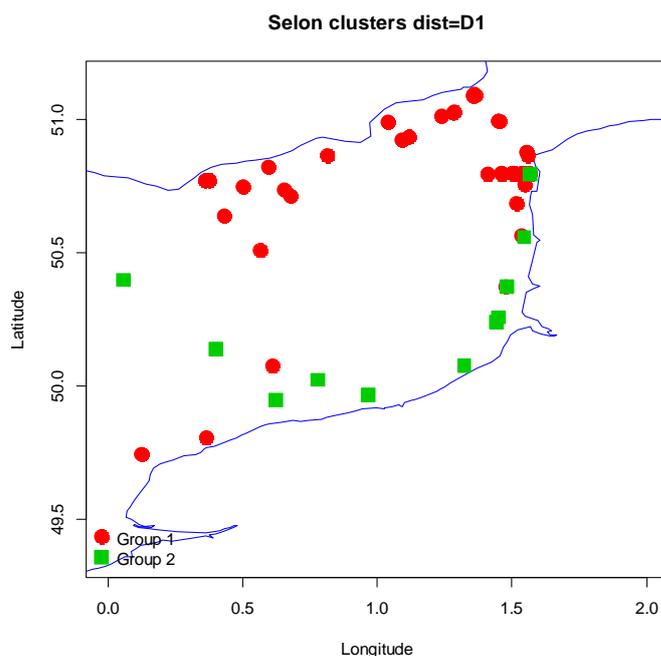


Figure 11 : Distribution géographique des stations réparties selon les deux groupes hiérarchiques

Optimisation de CHEMTAX : Une première série de calculs permet de fixer les bons paramètres et les meilleures combinaisons tout en aillant un résultat adéquat de la distribution des classes algales. Cependant, il se peut que le calcul soit tombé dans un minimum local et que les résultats ne soient pas les meilleurs. Ce problème est envisagé avec la version CHEMTAX 1.95, qui permet de réaliser plusieurs calculs en utilisant des matrices de rapports pigmentaires Fo de départ différents. Sont alors créés 61 matrices aléatoires Fo sur une variation contrôlée de ces valeurs d'environ 35%. Ces points de départ divers permettent de s'assurer que le résultat n'est pas victime d'un minimum local d'une part, et d'autre part d'obtenir une vision de la dispersion des résultats autour d'une moyenne sur les six ou dix meilleurs résultats. La matrice de rapports pigmentaires Fo est alors recalculée en aboutissant à la matrice ajustée F1 (tableau 3).

Tableau 3 : Matrice finale de rapports pigmentaires F1 après optimisation (moyenne des 6 meilleurs résultats)

	c3	peri	BF	fuco	viola	allo	D+D	zea	chla
Chloros	0	0	0	0	0.078	0	0	0.026	1
Cyanos	0	0	0	0	0	0	0	0.193	1
Diatos	0	0	0	0.438	0	0	0.031	0	1
Dinos	0	0.859	0	0	0	0	0.254	0	1
Cryptos	0	0	0	0	0	0.319	0	0	1
Hapto6	0.337	0	0	0.948	0	0	0.642	0	1
Hapto8	0.162	0	0	0.298	0	0	0.020	0	1
Chrysos	0	0	0.880	0.404	0	0	0	0	1

Ces résultats restent dans la fourchette des valeurs observées dans la littérature (Higgins, Wright, et Schlüter 2011), sauf pour les Haptophytes Hapto6 (Coccolitophoridées), qui présentent des rapports pigmentaires c3/chla et fuco/chla légèrement au-dessus des valeurs publiés. Après quelques calculs supplémentaires de CHEMTAX, nous optons pour garder les valeurs de la table 3, qui donnent des résultats plus homogènes. Cependant ceci peut avoir comme conséquence une sous-estimation des Hapto6 de 1 ou 2% maximum.

III) Résultats

1) Distribution du phytoplancton - Campagnes DYPHYMA

a) Analyses pigmentaires chémotaxonomiques

Le tableau 4 et la figure 12 présentent les résultats obtenus avec CHEMTAX. Il s'agit des pourcentages de chaque classe algale sur la biomasse totale (dominance) en fonction de leurs distributions temporelle (campagnes d'avril et mai-juin 2012) et spatiale (côte française, anglaise ou eaux de transition). L'essentiel de la biomasse chlorophyllienne est représenté par les diatomées et les Haptophytes du type 8 (*Phaeocystis*). Lors de la campagne d'avril, les diatomées représentaient environ 19% de la biomasse autotrophe sur les eaux françaises, tandis que du côté anglais elles étaient majoritaires avec 61% de la biomasse totale. Pour *Phaeocystis* c'était la situation inverse, avec 70% de dominance dans les eaux françaises, contre 29% sur les côtes anglaises.

Tableau 4 : Pourcentages de dominance des classes algales sur la biomasse chlorophyllienne totale en fonction des campagnes et de la zone, puis synthèse des moyennes par secteur

Campagne Avril - France								
St	chloro	cyanos	diatos	dinos	cryptos	Hapto6	Hapto8	Chrysos
DPM1	1	0	0	0	0	3	94	2
DPM2	0	4	4	0	0	5	86	2
DPM3	2	0	17	0	0	4	75	1
DPM4	0	0	4	1	0	6	88	2
DPM5	0	1	3	1	0	6	88	2
DPM6	1	0	21	0	0	4	73	1
DPM14	0	0	3	0	0	5	90	2
DPM15	0	0	20	0	0	8	72	1
DPM33	1	0	14	1	0	4	79	1
DPM34	3	0	31	0	5	4	57	0
DPM35	0	0	13	5	5	6	69	2
DPM36	0	2	30	6	6	6	48	1
DPM37	0	0	49	6	6	5	34	1
DPM38	0	0	28	7	2	4	59	1
DPM39	0	0	26	6	2	4	61	1
DPM50	0	1	19	10	2	1	67	1
DPM52	0	6	21	13	0	0	60	0
DPM53	0	2	22	7	0	0	67	1
DPM48	2	1	41	0	2	4	50	0
DPM49	0	1	28	1	3	2	64	1
DPM51	0	1	3	7	2	1	84	1
	0	1	19	3	2	4	70	1
Campagne Avril - Angleterre								
St	chloro	cyanos	diatos	dinos	cryptos	Hapto6	Hapto8	Chrysos
DPM8	0	0	67	0	5	4	23	0
DPM9	1	0	76	0	4	2	16	0
DPM10	0	0	71	0	6	3	20	0
DPM11	1	0	74	0	2	3	19	0
DPM12	0	0	82	0	3	5	11	0
DPM41	1	0	28	2	3	2	63	1
DPM42	2	0	70	2	4	0	21	0
DPM43	1	0	76	5	16	2	0	0
DPM44	2	0	9	0	2	3	83	1
DPM45	1	1	41	0	2	4	49	1
DPM46	10	0	73	0	5	0	12	0
	2	0	61	1	5	3	29	0

Convention ONEMA-Ifremer 2013

Campagne Mai - France

St	chloro	cyanos	diatos	dinos	cryptos	Hapto6	Hapto8	Chrysos
DPM54	0	2	76	2	1	5	14	0
DPM55	5	2	83	1	0	3	5	0
DPM56	2	0	91	0	1	3	3	0
DPM57	1	2	90	0	1	3	3	0
DPM58	3	1	88	0	0	2	5	0
DPM59	4	0	90	0	1	2	2	0
DPM72	0	1	82	0	0	6	10	0
DPM76	0	0	69	3	6	1	20	0
DPM77	1	0	88	2	1	6	1	0
DPM80	2	1	87	1	0	5	4	0
DPM71	11	0	71	0	0	1	16	0
DPM73	7	0	76	0	1	5	11	0
DPM74	7	0	70	0	1	4	18	0
DPM75	9	0	75	0	1	1	14	0
DPM78	0	0	81	1	1	4	13	0
DPM79	12	0	81	1	0	7	0	0
	4	1	81	1	1	4	9	0

Campagne Mai - Angleterre

St	chloro	cyanos	diatos	dinos	cryptos	Hapto6	Hapto8	Chrysos
DPM61	6	1	69	2	0	12	10	0
DPM62	6	0	60	6	0	7	21	1
DPM63	5	0	82	1	2	7	3	0
DPM64	14	4	60	3	6	12	0	0
DPM65	13	5	64	2	3	13	0	0
DPM66	12	0	77	2	0	9	0	0
DPM67	21	0	53	11	3	11	0	1
DPM68	11	0	57	7	3	3	19	0
DPM69	6	0	80	3	1	3	7	0
	11	1	67	4	2	9	7	0

Campagnes Avril-Mai Eaux de Transition

mois	St	chloro	cyanos	diatos	dinos	cryptos	Hapto6	Hapto8	Chrysos
avr	DPM7	1	0	38	0	3	2	55	1
avr	DPM13	2	0	27	0	2	2	66	1
avr	DPM40	1	0	83	2	5	2	8	0
avr	DPM47	4	6	62	2	9	0	18	0
mai	DPM60	6	0	76	0	0	2	16	0
mai	DPM70	16	0	69	1	1	0	13	0
		5	1	59	1	3	1	29	0

Moyennes de dominances (%) selon campagne et zone									
		chloro	cyanos	diatos	dinos	cryptos	Hapto6	Hapto8	Chrysos
France	avril	0	1	19	3	2	4	70	1
France	mai	2	0	61	1	5	3	9	0
Angleterre	avril	4	1	81	1	1	4	29	0
Angleterre	mai	11	1	67	4	2	9	7	0
Transition	avr/mai	5	1	59	1	3	1	29	0

Cette forte dominance s'explique par le bloom printanier de *Phaeocystis globosa* au large des côtes françaises en Manche orientale. Au début du mois de juin, la dominance de *Phaeocystis* n'est que de 9% du côté français et 7% dans les eaux anglaises. Dans ce début du mois de juin, ce sont les diatomées qui dominent le peuplement phytoplanctonique, avec 81% et 67% respectivement sur les eaux françaises et anglaises. Les dominances moyennes des dinoflagellés n'ont pas dépassé 4% (Angleterre en mai-juin). Cependant des valeurs isolées supérieures à 5% sont présentes au niveau des côtes françaises en avril et des côtes anglaises en mai-juin. La plus forte valeur étant de 13% à la station DPM52 en avril dans les eaux françaises. Les Coccolitophoridées sont répartis de façon homogène au large des côtes françaises en avril et mai-juin avec des dominances moyennes de 4%. Sur les côtes anglaises nous les trouvons avec 3 et 9% respectivement en avril et mai-juin. Les valeurs maximales sont comprises entre 10 et 13% sur les côtes anglaises en mai-juin. Les Cryptophytes représentent par secteur entre 1 et 5% de la biomasse autotrophe. Les plus fortes moyennes se situent sur les côtes anglaises lors de la campagne du mois d'avril, où la plus forte valeur individuelle est identifiée à la station DPM43 avec 16% de dominance.

Convention ONEMA-Ifremer 2013

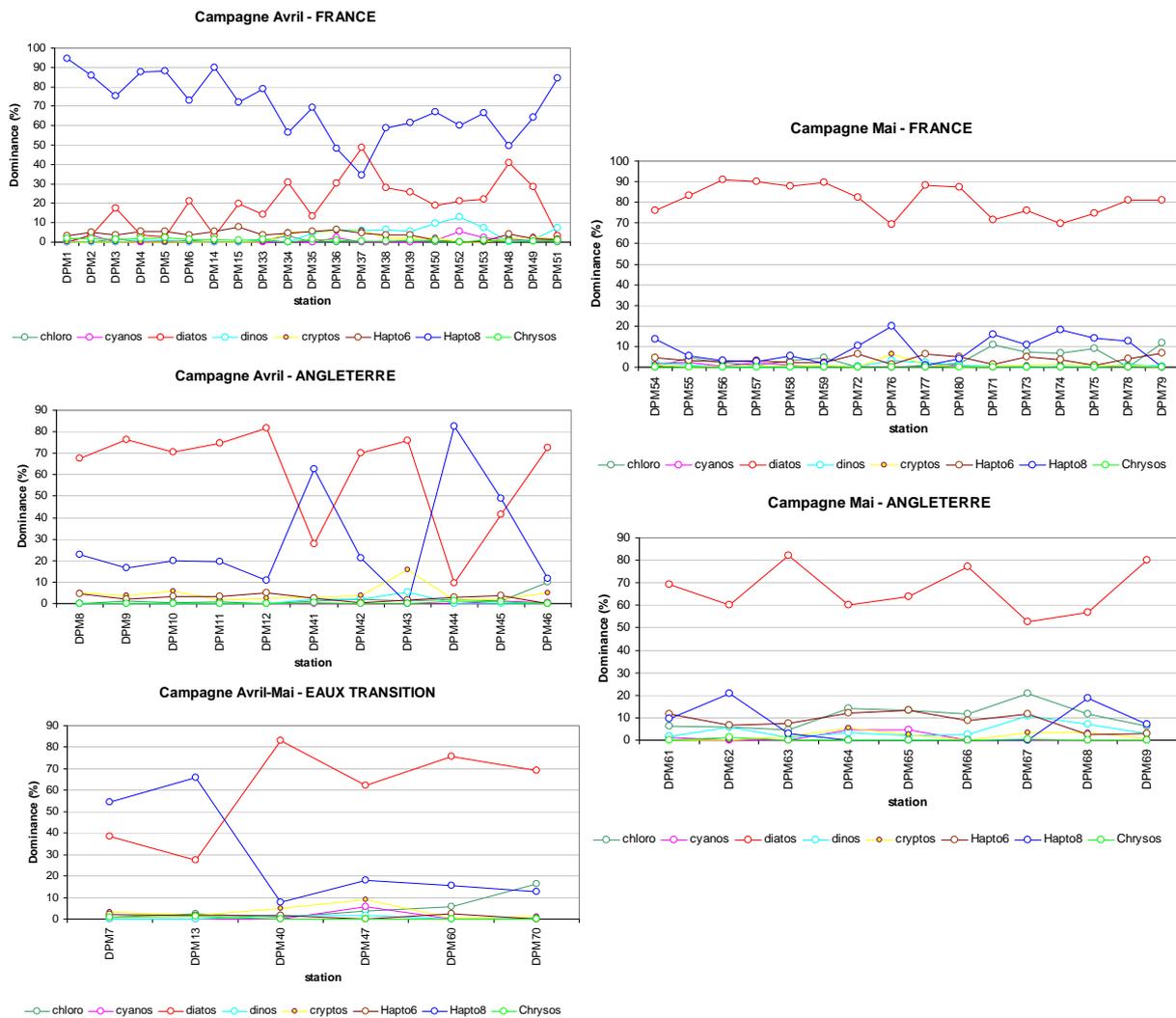


Figure 12 : Evolution des dominances par classe algale et par station dans les eaux françaises, anglaises et de transition.

Les algues vertes, probablement des Chlorophycées, suivent la même évolution temporelle que les dinoflagellés. Elles augmentent leur dominance d'avril vers mai-juin avec des valeurs moyennes qui atteignent 4% en mai-juin sur les côtes françaises et jusqu'à 11% sur les côtes anglaises. Les plus fortes valeurs individuelles sont présentes en mai-juin en Angleterre avec un maximum de 21% à la station DPM67. Les Cyanophycées restent très minoritaires avec des dominances de l'ordre de 1% sur l'ensemble des eaux échantillonnées et avec des dominances maximales individuelles de 4 à 6% sur quelques stations. Les Chrysophycées restent les moins représentées avec des valeurs maximales par station qui atteignent au mieux 2% dans les eaux françaises en avril. Les stations de transition présentent un profil de dominance semblable à celui des eaux françaises des mois de mai-juin. Une forte variabilité est observée entre les dominances individuelles par station sur les classes des diatomées, chlorophycées et *Phaeocystis* (Hapto8). Il se dégage de ces résultats la nette dominance de *Phaeocystis globosa* lors du bloom printanier d'avril sur les côtes françaises, tandis que sur les eaux anglaises ce sont les diatomées qui restent dominantes. Un mois plus tard, la situation a changé radicalement, avec une très forte dominance des diatomées dans les eaux françaises et anglaises. Les autres classes algales restent très minoritaires face aux diatomées et *Phaeocystis*, avec des valeurs de dominances inférieures à 10%.

b) Analyses cytométriques en continu

Les mesures à haute fréquence (toutes les 10 minutes) réalisées au cours des trois Legs de la campagne DYPHYMA, à la vitesse moyenne de 5 nœuds, ont permis d'atteindre une résolution d'environ 1,5 km.

Au cours du Leg1 (Figure 13), comprenant la traversée de la Manche aller-retour au niveau du détroit du Pas de Calais les 20-21 avril 2012 (écourcée pour cause de mauvais temps), il fut possible de caractériser les eaux marines puis côtières de la radiale De la Baie Saint Jean, puis le Cap Gris Nez, avec des valeurs maximales dépassant les $3,5 \cdot 10^4$ cell.ml⁻¹ et les $5,5 \cdot 10^8$ a.u.ml⁻¹ de fluorescence chlorophyllienne totale, essentiellement dû aux différentes formes de vie de l'espèce d'Haptophyte *Phaeocystis globosa*).

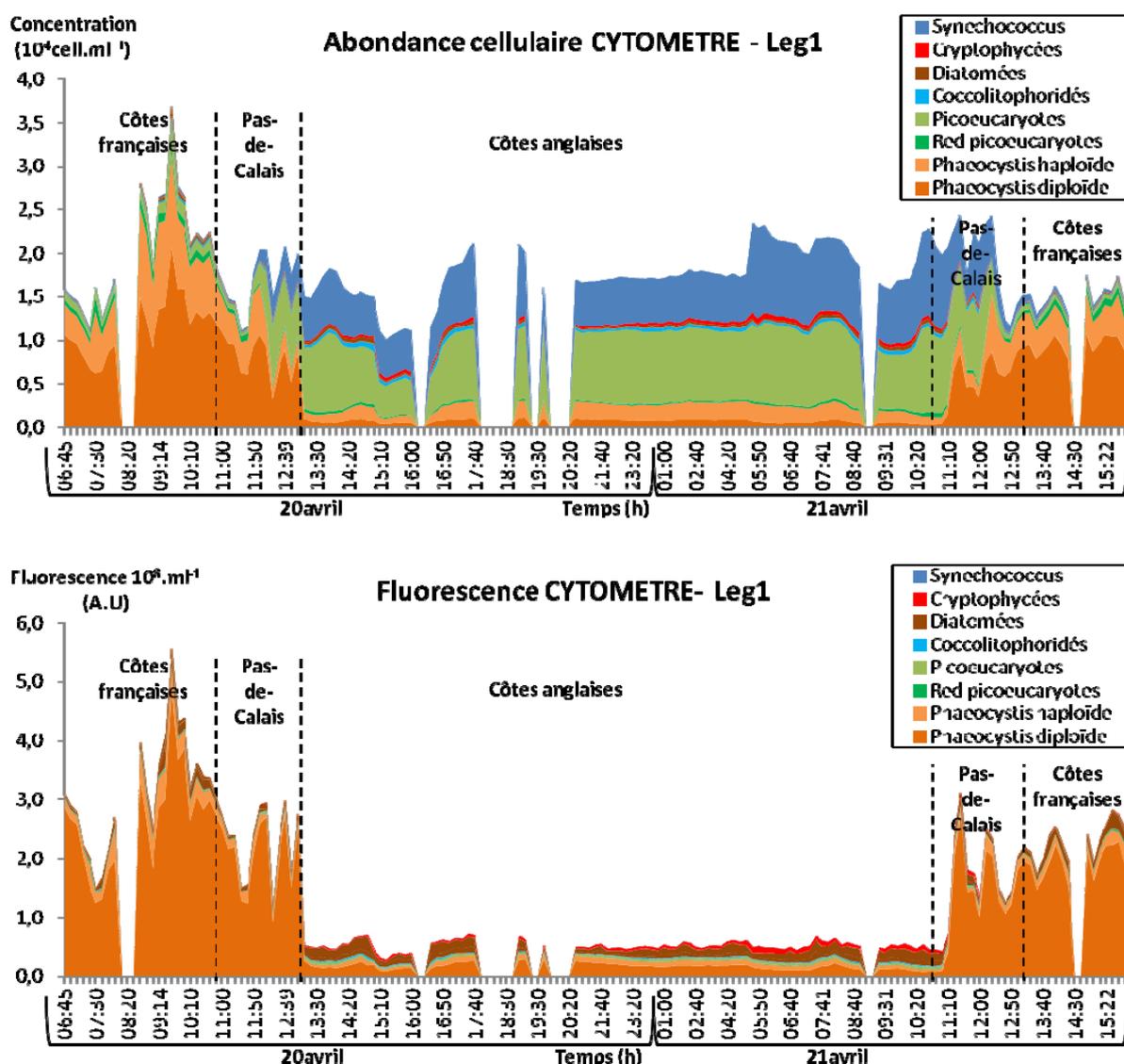


Figure 13 : Enregistrement en continu de l'abondance et la fluorescence des groupes phytoplanctoniques déterminés par cytométrie en flux de type Scanning Flow Cytometry – Campagne DYPHYMA – Leg 1, détroit du Pas de Calais, 20-21 avril 2012.

Une diminution de l'abondance et surtout de la fluorescence totale caractérisent la traversée du détroit du Pas de Calais. Du côté anglais, les niveaux enregistrés sont assez stables (autour de $1,5 \cdot 10^6$ cell.l⁻¹ et de $0,5 \cdot 10^8$ a.u.ml⁻¹). Les groupes majoritaires en abondance sont représentés par les cellules picoplanctoniques (Cyanobactéries du type *Synechococcus* et picoeucaryotes), avec une faible représentation (constante) des Cryptophytes et de *Phaeocystis*. En termes de fluorescence (estimation de la biomasse), diatomées et *Phaeocystis* sont majoritaires, et un gradient spatio-temporel a été mis en évidence avec une proportion croissante d'Haptophytes, puis une décroissance au profit des diatomées, des Cryptophytes et, en moindre mesure, des coccolithophoridés et pico-eucaryotes avant la traversée en retour vers la France, où *Phaeocystis* devient majoritaire en termes d'abondance et fluorescence.

Au cours du Leg2 (Figure 14), comprenant la traversée de la Manche au niveau du détroit du Pas de Calais et le retour au niveau de Eastbourne (Sussex) et le Tréport (Normandie) du 27 au 29 avril 2012, nous retrouvons des gradients d'abondance et entre les eaux marines puis côtières au large de la radiale de la Baie Saint Jean et le Cap Gris Nez, maximum autour des $3,5 \cdot 10^4$ cell.ml⁻¹ essentiellement dû aux différentes formes de vie de l'espèce d'Haptophyte *Phaeocystis globosa* à la côte et aux cellules picoplanctoniques au large de la Slack et du Cap Gris-Nez. Le maximum de fluorescence correspond uniquement aux eaux côtières en début de traversée du Déroit, atteignant $4 \cdot 10^8$ a.u.ml⁻¹. Au niveau de la traversée du détroit du Pas de Calais, les valeurs de fluorescence et, en moindre mesure, les concentrations cellulaires décroissent. Les abondances oscillent entre 0,5 et $1,5 \cdot 10^4$ cell.ml⁻¹, les micro-organismes picoplanctoniques étant les plus représentés en termes d'abondance, suivis par *Phaeocystis*, puis en moindre proportion, par les Cryptophytes et Coccolithophoridés. Une remontée d'abondance et de fluorescence est enregistrée près de Eastbourne, avant d'entamer la traversée vers Le Tréport : micro-organismes pico- et nanoplanctoniques sont majoritairement représentés en termes d'abondance, ces derniers étant largement majoritaires en termes de fluorescence. Dans les eaux du large, cellules pico-planctoniques sont majoritaires en termes d'abondance, alors qu'en termes de fluorescence tous les groupes sont représentés, les diatomées contribuant majoritairement, puis à parts égales avec les autres groupes nanoplanctoniques et les picoeucaryotes.

En eaux côtières face au Tréport, les espèces nanoplanctoniques *Phaeocystis globosa* redevient largement majoritaire, avec importante contribution des deux groupes de picoeucaryotes (dont picoeucaryotes à fort contenu en chlorophylle ou « red-picoeucaryotes » de part leur forte fluorescence dans le rouge), pour des abondances totales comprises entre 1 et $1,5 \cdot 10^4$ cell.ml⁻¹. Toutefois, les diatomées montrent une forte fluorescence (cellules microplanctoniques) et arrivent à représenter, aux alentours de la Baie de Somme, jusqu'à 50% de la fluorescence totale (l'autre dominance étant attribuée aux cellules de *Phaeocystis*), dont les niveaux atteignent jusqu'à $7 \cdot 10^8$ a.u.ml⁻¹. Cette importance décroît par la suite en remontant de la Baie de Somme jusqu'au boulonnais en fin de parcours, ainsi que les niveaux de fluorescence et d'abondance totales qui eux atteignent un

Convention ONEMA-Ifremer 2013

nouveau sommet près de la Canche, largement dominés par *Phaeocystis*, enregistrant en toute fin de campagne une remontée des niveaux d'abondance du picoplancton, au large de Boulogne (sans grande incidence en termes de fluorescence).

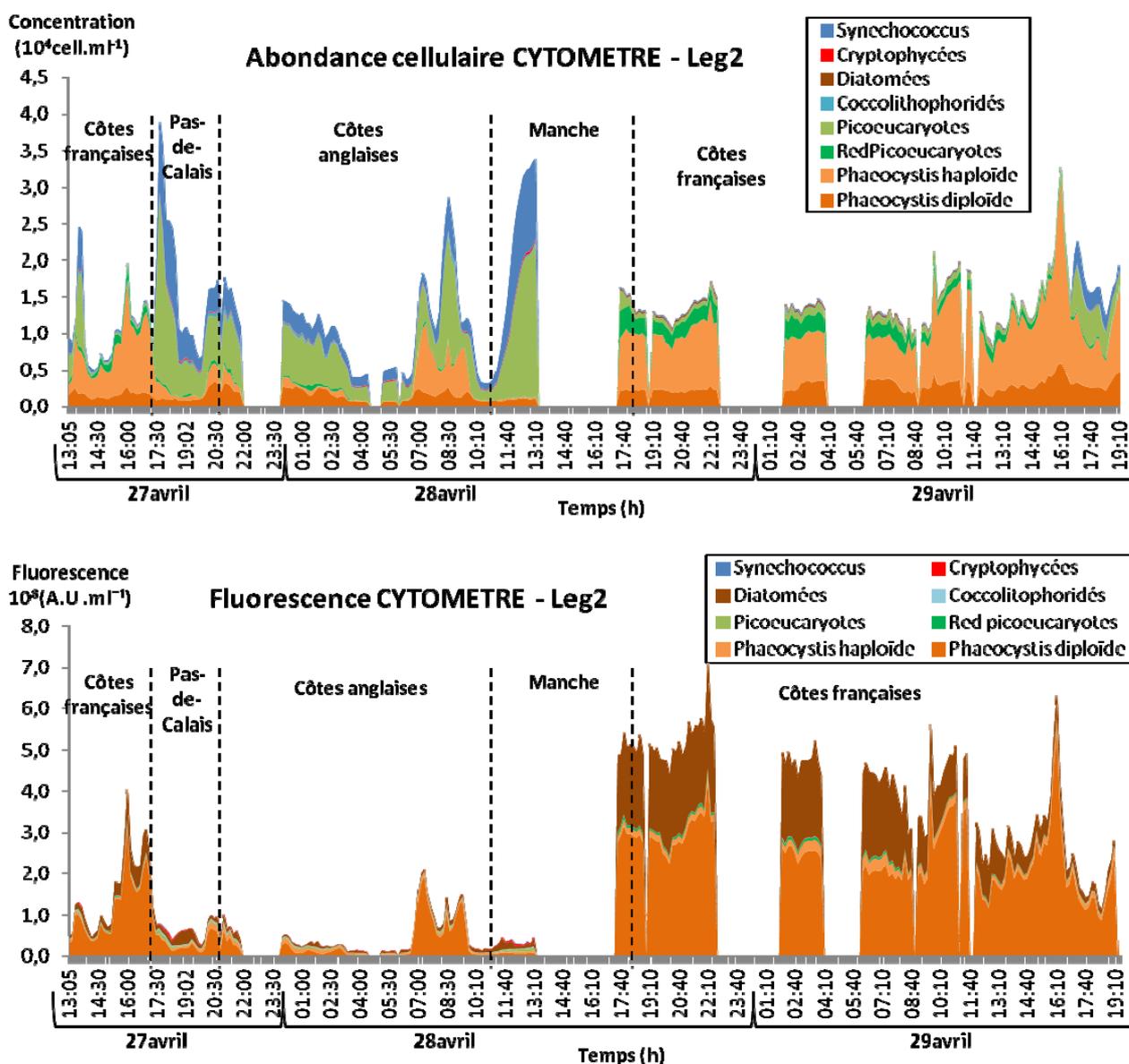


Figure 14: Enregistrement en continu de l'abondance et la fluorescence des groupes phytoplanctoniques déterminés par cytométrie en flux de type Scanning Flow Cytometry – Campagne DYPHYMA – Leg 2, Manche Orientale, 27-29 avril 2012.

Le Leg3 (Figure 15), a compris une traversée de la Manche en partant toujours du détroit du Pas de Calais et une étendue jusqu'au large de Brighton pour une traversée retour de la Manche au niveau de Dieppe (incluant un rapprochement jusqu'Antifer pour enregistrement en eaux du panache de la Seine) du 31 mai au 4 juin 2012.

Un mois après la fin du Leg2, les niveaux totaux d'abondance sont moins prononcés que fin avril (atteignant au plus des pics de $5.10^3 \text{ cell.mL}^{-1}$) et ne montrent pas de gradient significatif

Convention ONEMA-Ifremer 2013

entre la côte et le large à proximité du Cap Gris-Nez (dominance des organismes nanoplanctoniques (*Phaeocystis globosa* et « red-nanoplanton »). Toutefois, un très fort gradient existe en termes de biomasse dont les niveaux, bien moins élevés qu'en avril (en dessous de 1.10^8 a.u.ml⁻¹) sont plus de 4 fois plus élevés à la côte à proximité du détroit, (fluorescence quasi exclusivement due aux diatomées). La traversée du détroit n'a pu être enregistrée complètement. Un gradient croissant d'abondance avec des valeurs atteignant des niveaux supérieurs à 3.10^4 cell.ml⁻¹ (majoritairement composé de cellules picoplanctoniques) est mis en évidence alors que les niveaux de fluorescence décroissent autour de 2.10^7 a.u.ml⁻¹, avec une représentation importante, en dehors des diatomées, de cellules nanoplanctoniques et également des picoeucaryotes.

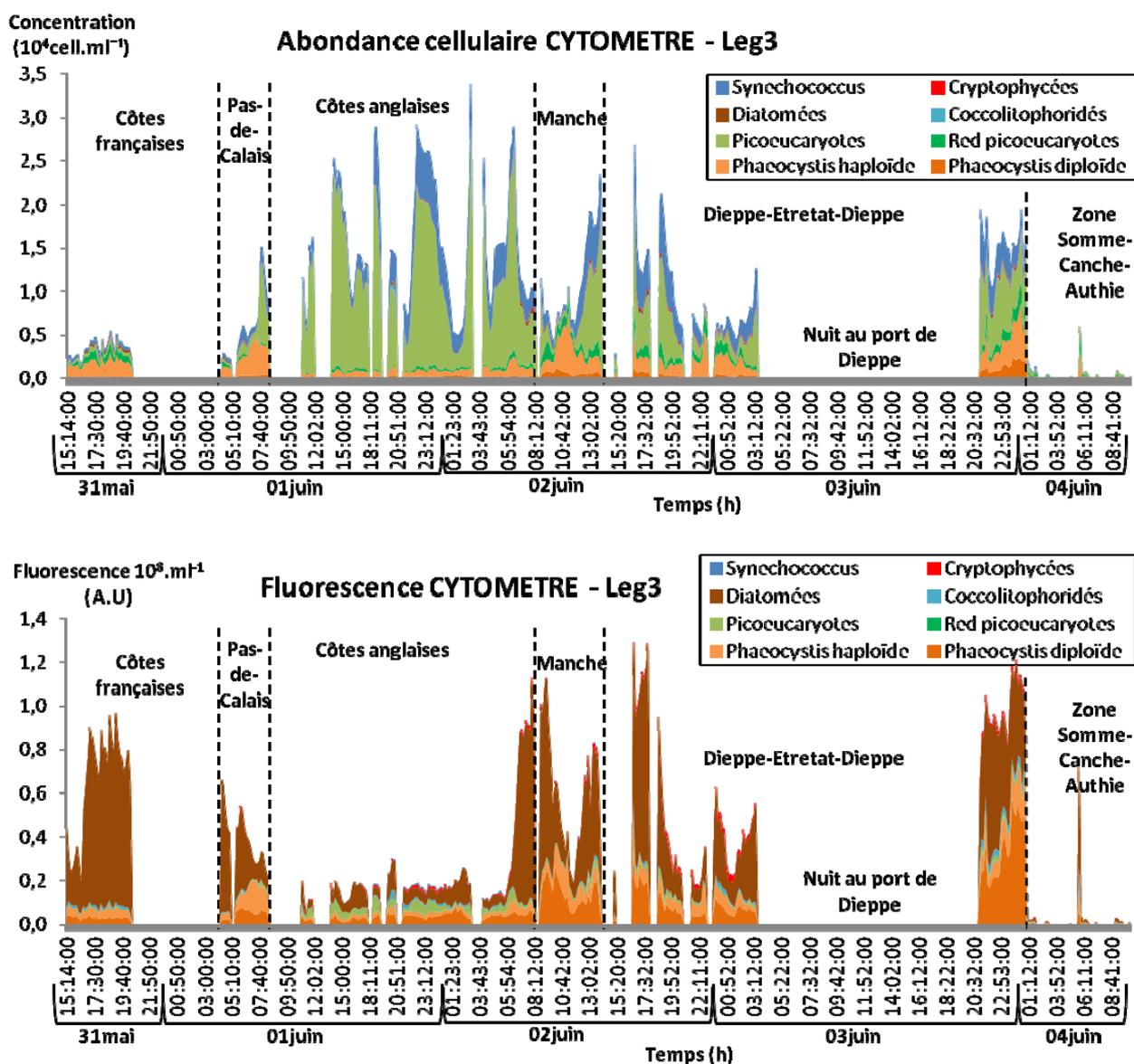


Figure 15: Enregistrement en continu de l'abondance et la fluorescence des groupes phytoplanctoniques déterminés par cytométrie en flux de type Scanning Flow Cytometry – Campagne DYPHYMA – Leg 3 (DYPHYMA II), Manche Orientale, 31 mai – 04 juin 2012.

La traversée de la Manche entre Brighton et Dieppe s'est accompagnée d'un renversement de ces gradients, une remontée importante des fluorescences totales dépassant les $1,2 \cdot 10^8$ a.u.ml⁻¹, puis fluctuant proche des côtes normandes (principalement dues aux diatomées et aux cellules nanoplanctoniques du type *Phaeocystis*) et à des niveaux d'abondance fluctuant également, dominés par les groupes picoplanctoniques eucaryotes ou par des groupes nanoplanctoniques et picoplanctoniques. Finalement, le début de remontée vers le Nord depuis Dieppe a été caractérisé par des abondances cellulaires atteignant des pics de $2 \cdot 10^4$ cell.ml⁻¹ caractérisées par un début de gradient croissant d'importance du nanoplancton au détriment du picoplancton majoritaire, et des fluorescences de jusqu'à $1,2 \cdot 10^8$ a.u.ml⁻¹, dues à parts égales aux diatomées et au nanoplancton de type *Phaeocystis*. Le long des côtes normandes, cryptophytes et coccolithophoridés sont mieux représentés en termes de fluorescence. En fin de campagne, de très mauvaises conditions météorologiques ont perturbé l'acquisition des données (4 juin).

c) Comparaison analyses cytométriques et fluorométriques en continu

Nous présentons dans cette section la comparaison entre les données des enregistrements en continu, au cours du Leg 2 de la campagne océanographique DYPHYMA, du cytomètre en flux, permettant une analyse au niveau cellulaire ou particulaire (groupes calculés en calculant abondance et fluorescence totale de l'ensemble des cellules ou particules de chaque groupe) et du fluorimètre spectral Algae Online Analyser (A.O.A., bbe Moldaenke[®]) permettant une analyse de la réponse de l'ensemble de la communauté à des excitations différentielles. Pour ce faire, nous avons regroupés les deux stades de vie attribués à l'espèce *Phaeocystis globosa* en un seul groupe cytométrique et une empreinte spectrale de *Phaeocystis globosa* a été enregistrée en laboratoire avec l'A.O.A., permettant ainsi de discriminer ce groupe par la suite.

La délimitation (Figure 16) des zones échantillonnées au cours des trois jours de campagne souligne les différences en amplitude et en composition des communautés phytoplanctoniques en termes d'abondance, ainsi que les gradients décrits dans la section correspondante. Les abondances enregistrées d'une rive à l'autre de la Manche, de même magnitude, correspondent à des groupes phytoplanctoniques et classes de taille différents (plutôt picoplancton au large des côtes du Kent et du Sussex et dans les eaux de milieu de la Manche, du nanoplancton au large des côtes normande, picarde et du Pas de Calais), même si ponctuellement nous avons pu enregistrer des situations intermédiaires de part et d'autre de la Manche.

Cette différence s'accroît en termes de fluorescence totale, présentant à la fois des gradients côte-large et également, et un gradient décroissant depuis la haute Normandie vers le Pas de Calais, essentiellement dû à l'importance décroissante des diatomées.

Ce même patron de distribution est mis en évidence avec les enregistrements de fluorescence spectrale (A.O.A.), avec toutefois une moindre importance relative des diatomées. Cette différence entre les enregistrements réalisés par les deux techniques peut s'expliquer par d'une part, une surestimation du groupe majoritaire par la technique fluorimétrique étant d'avantage sensible au groupe majoritaire (*Phaeocystis*), et, d'autre part, par l'inclusion, dans le groupe cytométrique assimilé aux diatomées, de colonies de *Phaeocystis*, dans le groupe microphytoplanctonique assimilé majoritairement aux diatomées.

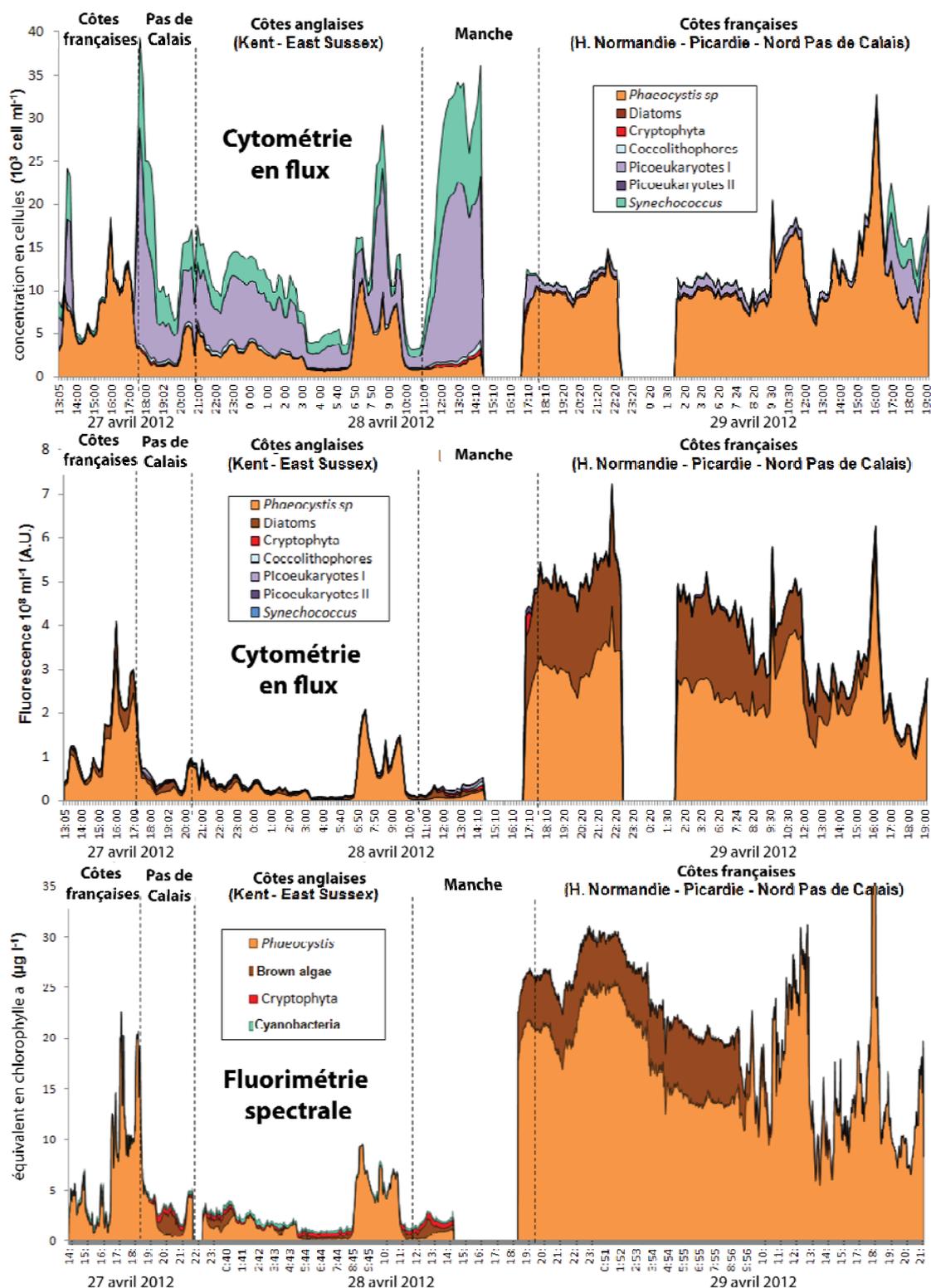


Figure 16 : Distribution des groupes phytoplanctoniques enregistrés en continu, exprimés en concentration cellulaire et fluorescence relative à chaque (cytométrie en flux, haut et centre) et en équivalents de chlorophylle a (Fluorimétrie spectrale, bas) – campagne DYPHYMA – Leg 2, Manche orientale, 27-29 avril 2012.

d) Comparaison comptages cellulaires par cytométrie en flux et par microscopie

Dans cette section nous proposons de comparer les résultats issus des techniques innovantes avec ceux de techniques de référence pour le suivi de la dynamique du phytoplancton, comme la microscopie optique à inversion et les analyses pigmentaires par HPLC.

En premier lieu, nous constatons que les abondances cellulaires totales sont la plupart du temps sous-estimées par la technique microscopique (Figures 17 et 18), en raison de la difficulté de compter correctement les micro-organismes nanoplanctoniques et l'impossibilité de détecter le picoplancton (Cyanobactéries ou Eucaryotes).

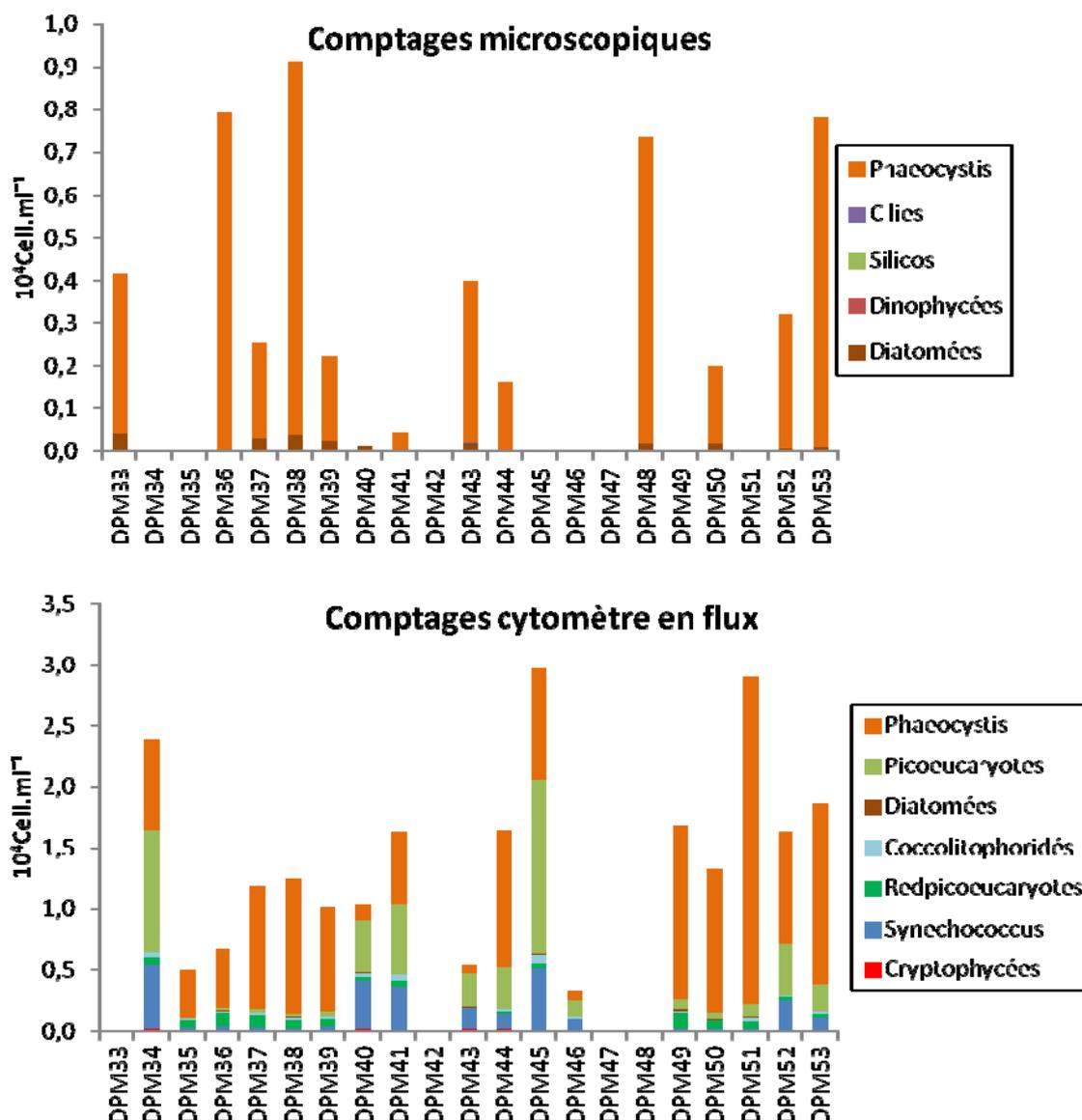


Figure 17 : Abondances cellulaires des groupes phytoplanctoniques résolus par microscopie (haut) et cytométrie en flux à scanning (bas) – campagne DYPHYMA – Leg 2, Manche orientale, 27-29 avril 2012.

Toutefois, en ce qui concerne *Phaeocystis globosa* au cours du Leg2 (Figure 17), les abondances obtenues par les deux méthodes sont souvent du même ordre de grandeur. Au niveau qualitatif, les stations du large et proches des côtes anglaises n'ont pas présenté de

différences importantes au niveau des grands groupes déterminés par comptages microscopiques (sans compter l'aspect spécifique, résolution non comparée avec la cytométrie en flux), alors qu'en cytométrie en flux ces stations montraient des proportions importantes en groupes picoplanctoniques.

La situation du Leg 3 de la campagne DYPHYMA a confirmé la sous-estimation (d'un ordre de grandeur) des abondances cellulaires obtenues par comptages microscopique, de par la non prise en compte des cellules picoplanctoniques et l'imprécision quant au comptage des petites cellules nanoplanctoniques. Par contre, elle a mis en évidence la sous-estimation des comptages cytométriques des diatomées, ce qui peut être expliqué par le fait que le cytomètre en flux utilisé (CytoSense) permet à la base d'estimer un nombre de particules mais ne peut pas, avec le logiciel d'exploitation fourni avec l'instrument, réaliser un comptage des cellules au sein des colonies. La concentration cellulaire des espèces coloniales est ainsi sous-estimée par cette méthode.

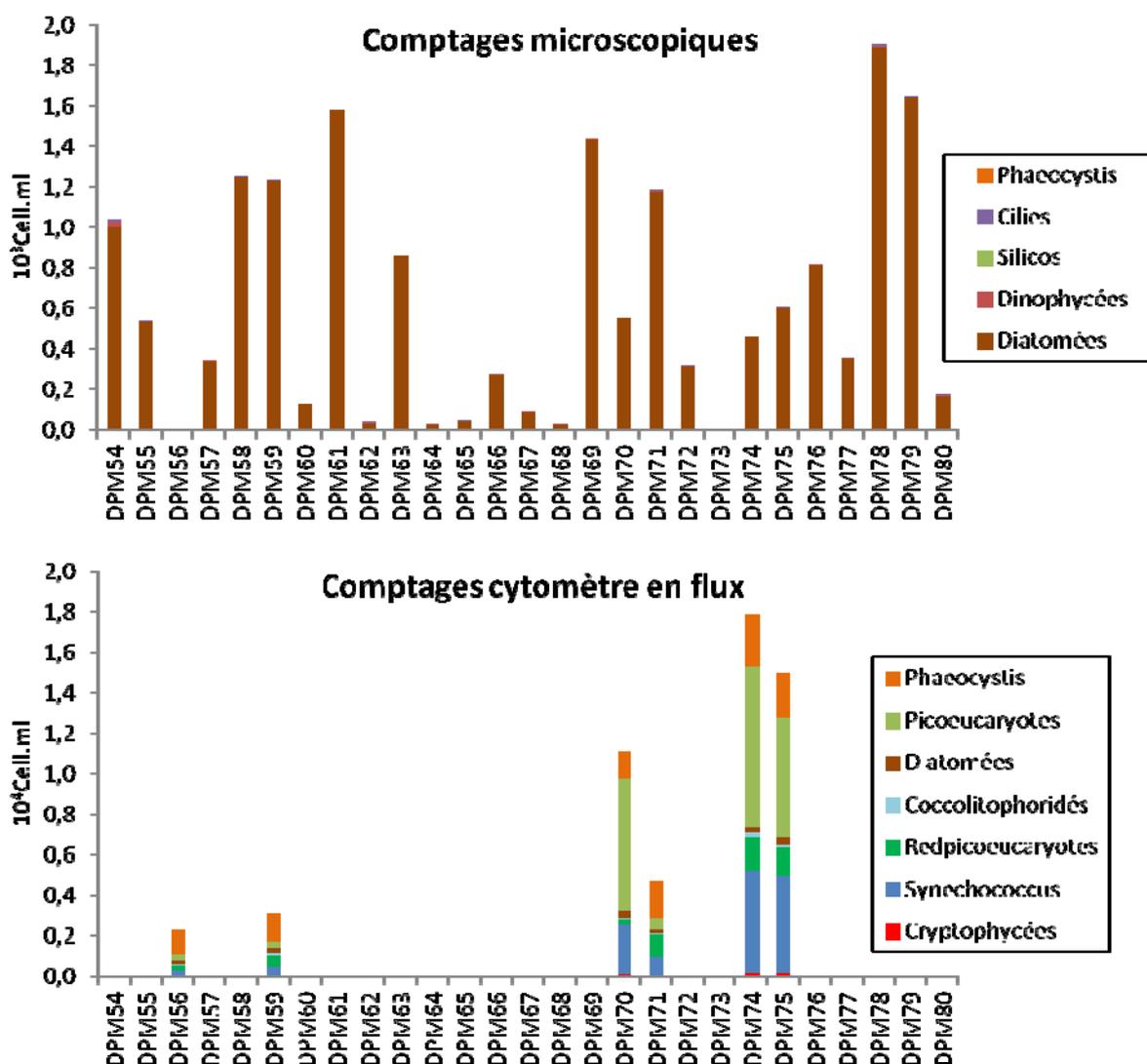


Figure 18 : Abondances cellulaires des groupes phytoplanctoniques résolus par microscopie (haut) et cytométrie en flux à scanning (bas) – campagne DYPHYMA – Leg 3, Manche orientale, 31 mai – 04 juin 2012.

e) Comparaison des déterminations des groupes spectraux par cytométrie en flux, fluorescence spectrale et analyse pigmentaire

La détection de la fluorescence des groupes spectraux (par excitations ou émissions différentielles) est basée sur les différences des contenus pigmentaires des groupes phytoplanctoniques. Ainsi, sur des échantillons discrets nous avons tout d'abord pu mettre en évidence une bonne corrélation entre les estimations de fluorescence totale par cytométrie en flux et par fluorimétrie spectrale, et une bonne corrélation entre ces deux techniques et les estimations en chlorophylle a (corrélation significative).

Une bonne concordance a été mise en évidence entre les proportions relatives des différents groupes estimés par HPLC, cytométrie en flux et fluorescence spectrale (Figure 19 et 20), avec toute fois une sous-estimation de la proportion des diatomées par ces deux techniques comparées aux analyses pigmentaires.

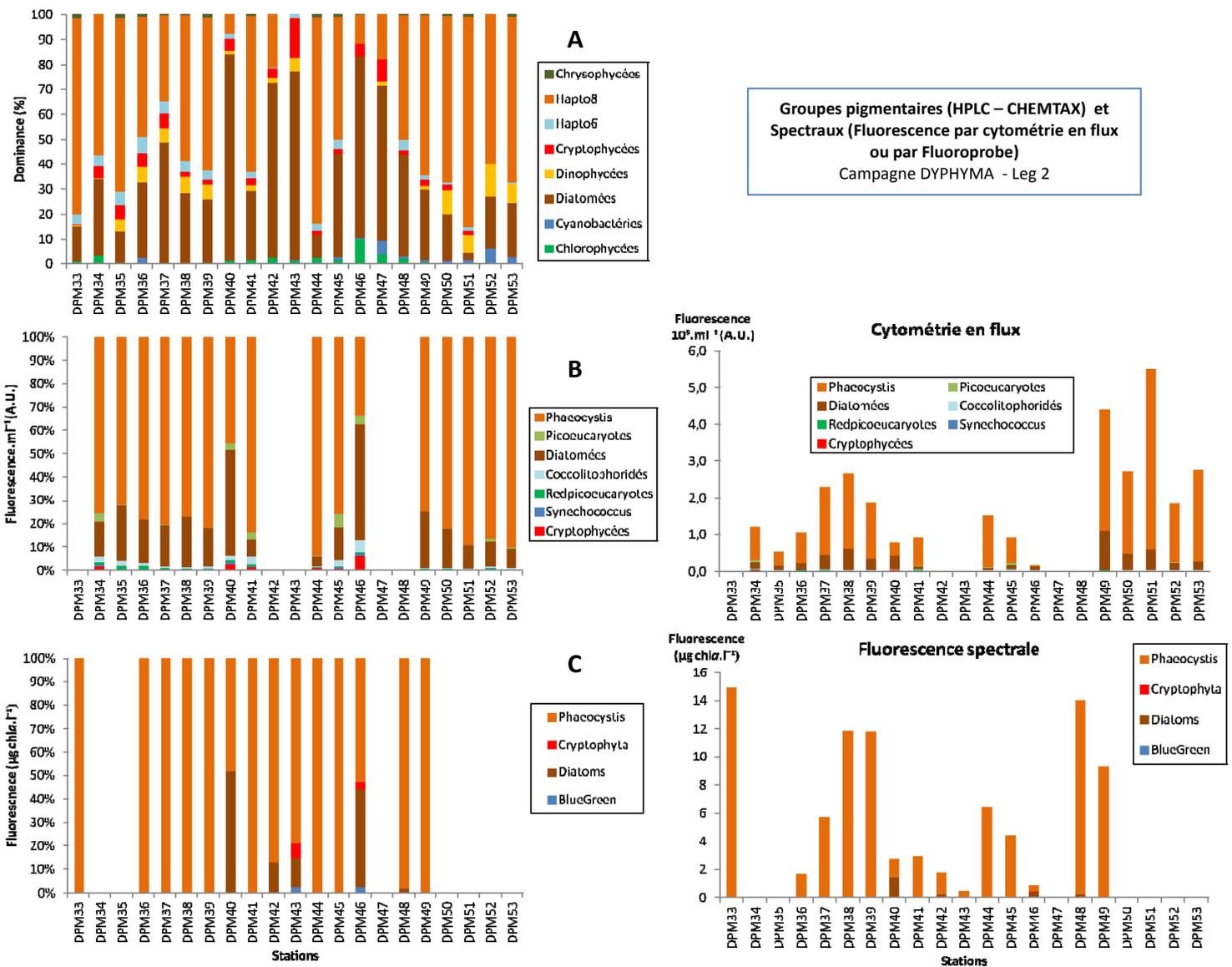


Figure 19 : Importance relative (gauche) et absolue (droite) des groupes pigmentaires déterminés par HPLC-CHEMTAX (A) et spectraux déterminés par cytométrie en flux – CytoSense (B) et par fluorimétrie spectrale- Fluoroprobe (C) au cours du Leg 2 - campagne DYPHYMA (27 au 29 avril 2012).

Convention ONEMA-Ifremer 2013

Les stations à dominance de Phaeocystis ou diatomées sont concordantes (lorsqu'échantillonnées) pour les trois techniques. De même, la détection des Cryptophytes et Coccolithophoridés a été effective par cytométrie en flux. Etant donné que nous avons utilisé le logiciel pourvu avec le Fluoroprobe, il ne nous a pas été possible de distinguer plus de 4 groupes (ayant choisi 4 empreintes en fonction des espèces majoritaires présentes). Coccolithophoridés et nano et pico eucaryotes à forte teneur en chlorophylle (Chrysophytes et Chlorophytes) n'ont pas pu être détectés par cette dernière technique.

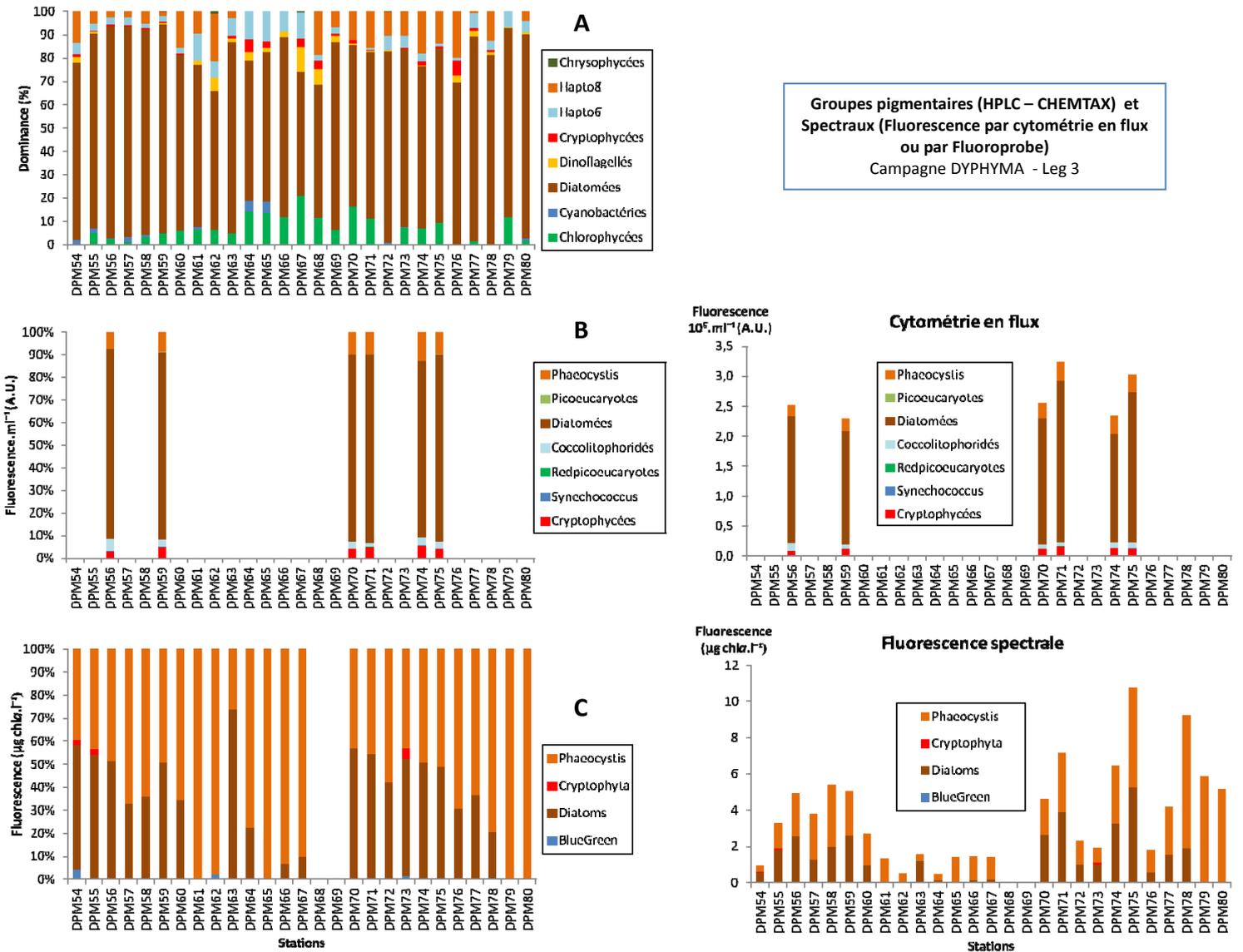


Figure 20 : Importance relative (gauche) et absolue (droite) des groupes pigmentaires déterminés par HPLC-CHEMTAX (A) et spectraux déterminés par cytométrie en flux – CytoSense (B) et par fluorimétrie spectrale- Fluoroprobe (C) au cours du Leg 3 - campagne DYPHYMA (31 mai – 04 juin 2012).

2) Dynamique saisonnière et distribution du phytoplancton en Manche Orientale (Station côtière R1 – Radiale Baie Saint Jean)

La dynamique saisonnière du phytoplancton a été suivie à haute résolution temporelle (toutes les semaines ou plusieurs fois par semaine lorsque possible) par les techniques de cytométrie en flux et de fluorescence. La comparaison des deux techniques a été possible uniquement pour ce qui est de la fluorescence par groupe cytométrique.

Au **printemps 2011** (Figure 21), la comparaison n’a pu porter que sur quelques dates étant donné des problèmes techniques avec le cytomètre en flux. Malgré cela, le démarrage ainsi qu’un pic tardif du bloom de *Phaeocystis globosa* a bien pu être caractérisé par les deux techniques.

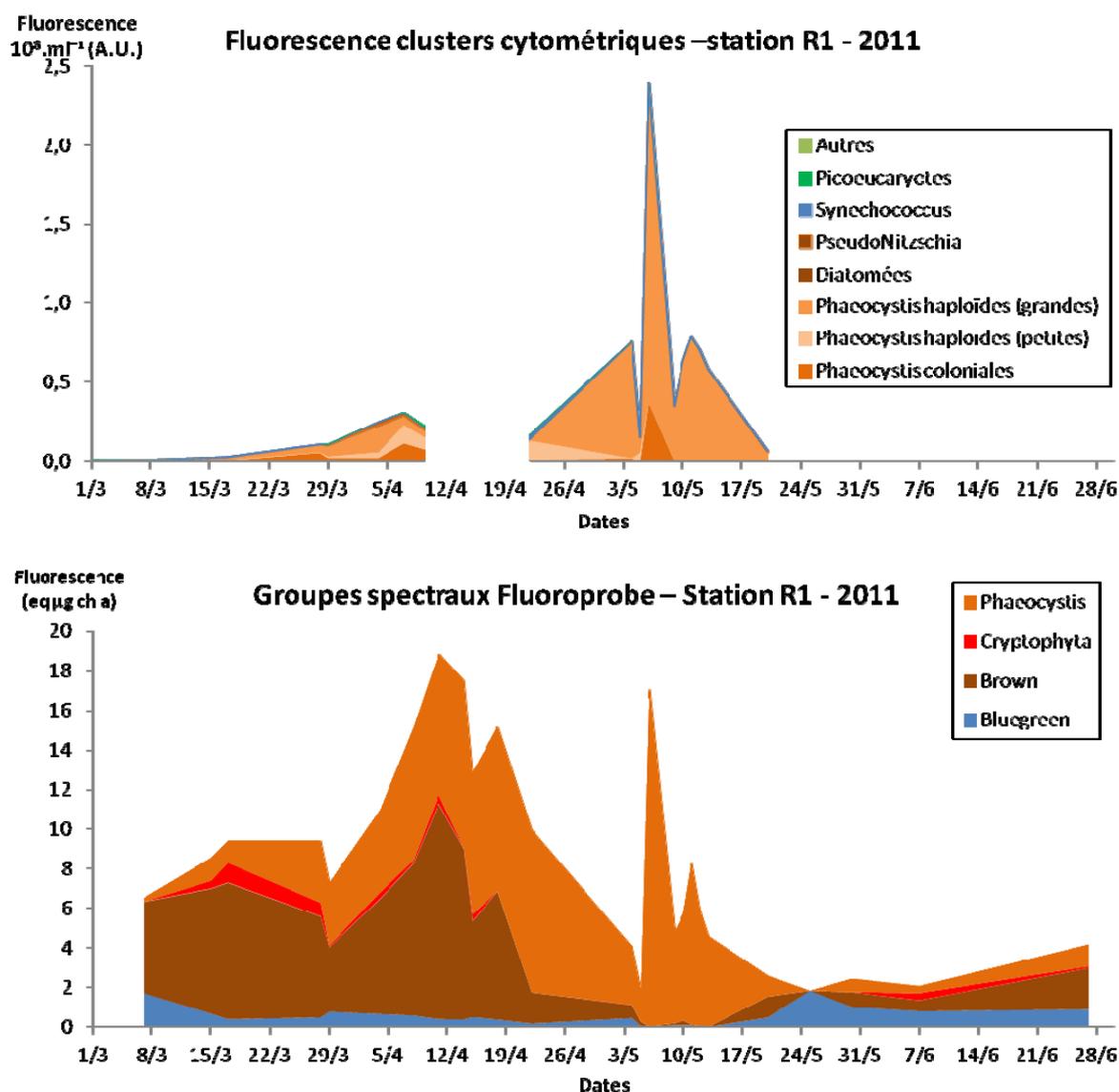


Figure 21: Dynamique saisonnière des groupes spectraux phytoplanctoniques déterminés par cytométrie en flux – CytoSense (haut) et par fluorimétrie spectrale- Fluoroprobe (bas) au cours du printemps 2011 – Station, R1 (radiale Baie Saint Jean)

Toutefois, probablement en raison d’un niveau seuil trop bas, il n’y a eu que peu de diatomées estimées par cytométrie, alors que la fluorescence spectrale rendait compte d’un

bloom précoce de diatomées (précédé par des cyanobactéries et accompagné par des Cryptophytes ou cyanovactéries à phycoérythrine) suivi d'un bloom printanier de diatomées et *Phaeocystis*, puis d'un pic de *Phaeocystis* en mai pour une reprise des diatomées, cyanobactéries et en moindre mesure cryptophytes à la fin du printemps.

Au **printemps 2012** (Figure 22), les deux techniques mettent en évidence le démarrage à la fin de l'hiver d'un bloom de diatomées, puis la mise en place d'un bloom de *Phaeocystis globosa* et diatomées. La fluorescence spectrale met en évidence une chute de la fluorescence due aux diatomées, alors qu'en cytométrie en flux leur importance reste stable et prend de l'ampleur du fin de printemps début de l'été, en même temps qu'une remontée des valeurs dues aux cryptophytes. Il y aurait cette fois une surestimation de l'importance des Haptophytes (*Phaeocystis*, en l'occurrence) par la méthode de fluorescence spectrale.

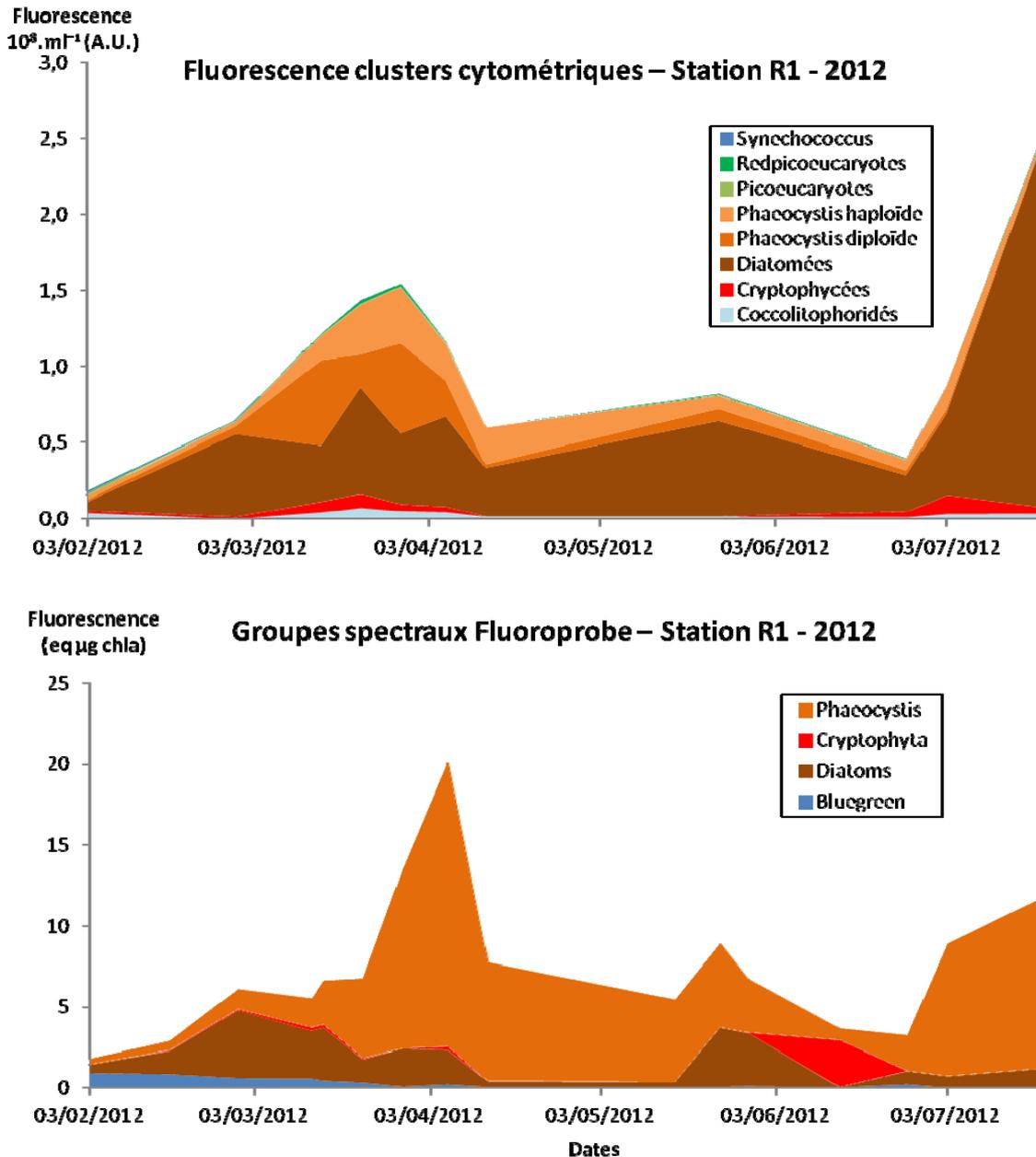


Figure 22 : Dynamique saisonnière des groupes spectraux phytoplanctoniques déterminés par cytométrie en flux – CytoSense (haut) et par fluorimétrie spectrale- Fluoroprobe (bas) au cours du printemps 2011 – Station, R1 (radiale Baie Saint Jean)

3) Dynamique de la distribution spatiale du phytoplancton en Manche Orientale (Radiale Baie Saint Jean) au printemps 2012

L'examen de la distribution spatiale des groupes phytoplanctoniques a été réalisé en référence à la répartition des concentrations en chlorophylle *a* totale, en termes de fluorescence à la fois par cytométrie en flux et par fluorescence spectrale à différents moments du printemps 2012 (Figures 23 et 24), représentant des périodes distinctes de la mise en place, déroulement ou déclin des blooms phytoplanctoniques au sein d'un gradient côte-large proche du détroit du Pas de Calais (radiale de la Baie Saint Jean), à haute résolution spatiale (résolution infra-kilométrique).

En fin d'hiver, une décroissance progressive a été enregistrée en termes de fluorescence par les deux techniques et par les mesures des concentrations pigmentaires (chlorophylle *a*). Les valeurs absolues de ces dernières dépassent les $8\mu\text{g.l}^{-1}$ à la côte. Les diatomées sont largement majoritaires, suivies par les groupes nanoplanctoniques et picoplanctoniques. Les cyanobactéries sont d'avantage représentées en fluorimétrie spectrale.

Au début du printemps, le gradient des fluorescences totales est toujours présent même si par cytométrie en flux comme par concentrations pigmentaires deux niveaux sont plutôt mis en évidence, de part et d'autre du front encadrant le « fleuve côtier » (Brylinski *et al.*, 1991) au niveau des stations R2'. Les diatomées sont d'avantage représentées à la côte, mais *Phaeocystis* représente environ 50% de la fluorescence totale à la côte et/ou au large, selon les méthodes.

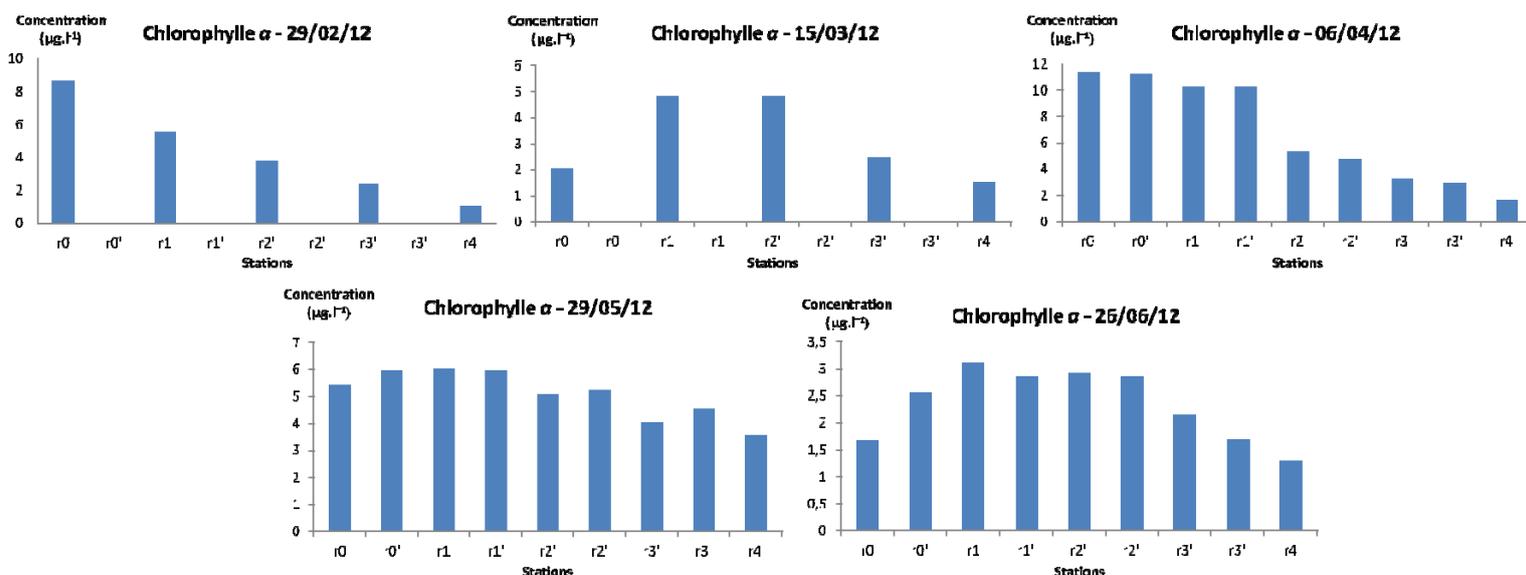


Figure 23: Dynamique de la concentration en chlorophylle a totale, déterminée par la technique d'extraction de chlorophylle a, au cours du printemps 2012 – Radiale Baie Saint Jean (depuis la côte, R0, vers le large, R4)

Par la suite, le bloom printanier atteint ses niveaux maximum de concentration chlorophyllienne et de fluorescence, avec une séparation encore plus nette entre les stations côtières et les stations (limite à la station R1') et les stations du large où une décroissance progressive des valeurs est décelée. Cette fois-ci, on constate une différence importante en termes de fluorescence entre les estimations faites par cytométrie en flux qui mettent en évidence une dominance partagée entre diatomées et *Phaeocystis* (et autres espèces nanoplanctoniques minoritaires) et les estimations par fluorimétrie spectrale qui témoignent d'une large dominance de *Phaeocystis* surtout en eaux côtières, décroissant vers le large.

Convention ONEMA-Ifremer 2013

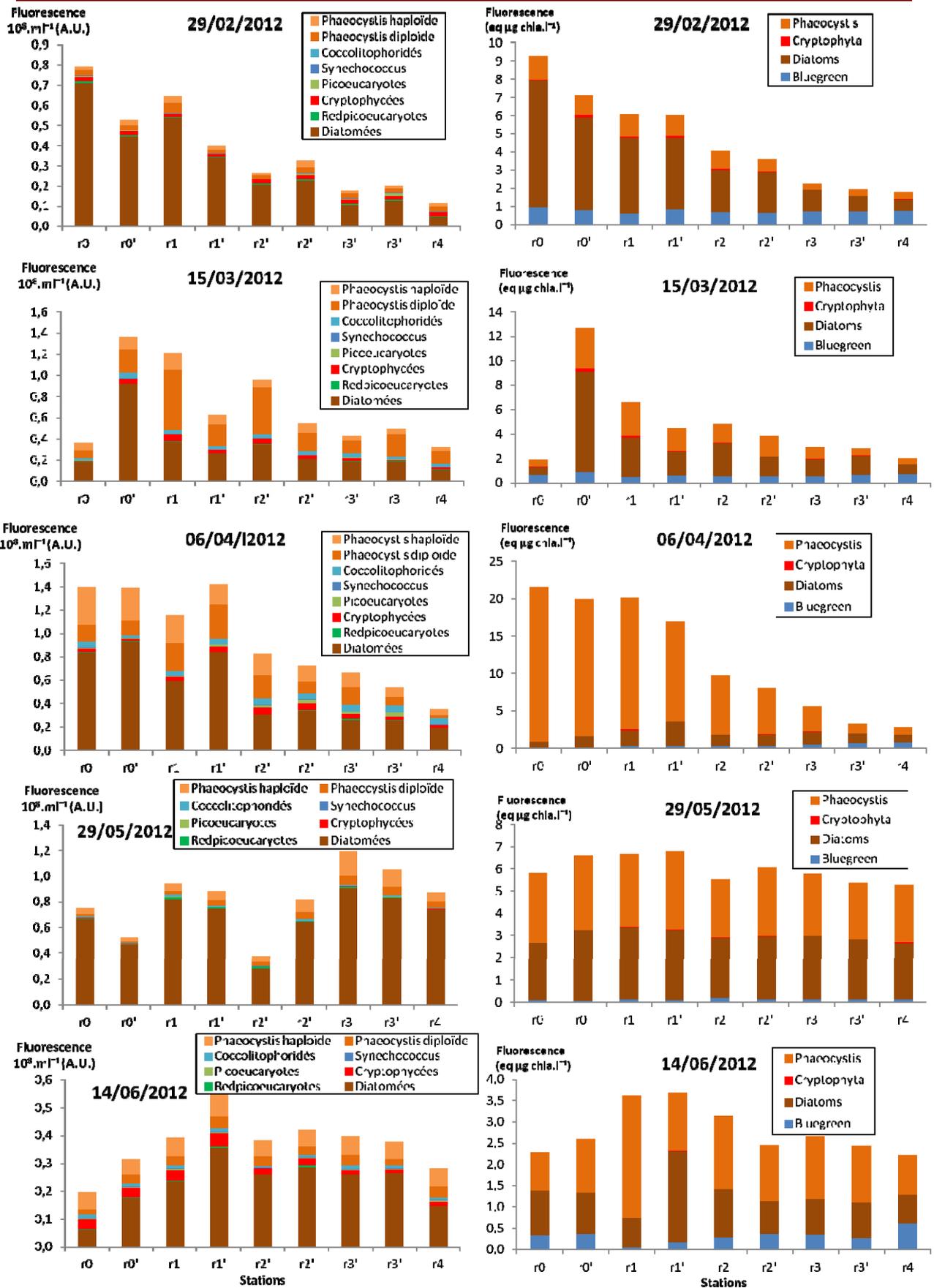


Figure 24: Dynamique de la distribution spatiale des groupes spectraux phytoplanctoniques déterminés par cytométrie en flux – CytoSense (gauche) et par fluorimétrie spectrale- Fluoroprobe (droite) au cours du printemps 2012 – Radiale Baie Saint Jean (depuis la côte, R0, vers le large, R4)

Fin mai, on assiste à une diminution des valeurs totales de concentration et de fluorescence, et à une homogénéisation des valeurs entre la côte et le large avec des maxima enregistrés en eaux côtières ou proches du front, ou en eaux du large, selon les techniques. Les proportions en diatomées augmentent (tout comme les valeurs absolues), mais il persiste une différence d'estimation entre la cytométrie en flux et la fluorimétrie spectrale. Cette différence persiste à la fin du printemps, avec des concentrations et fluorescences totales maximales au niveau du front (localisé à R1'), les diatomées étant largement majoritaires en cytométrie en flux et partageant la dominance avec *Phaeocystis* et, en moindre mesure, avec les cyanobactéries en eaux côtières et au large.

VI) Conclusion – Perspectives

Le suivi combiné de la distribution spatiale phytoplanctonique à haute résolution (kilométrique ou sub-kilométrique), au cours de campagnes océanographiques internationales ou au cours de campagnes d'observation régulières réalisées à haute résolution temporelle (hebdomadaire et parfois journalière), a permis de mettre en évidence, par des techniques complémentaires aux comptages microscopiques, de la complexité des proliférations/accumulation, des changements de dominance d'un groupe phytoplanctonique à un autre, répondant à des changements des conditions du milieu et d'avancée de la saison. Les analyses pigmentaires ont permis de compléter les données de référence auxquelles les techniques semi-automatisées telles que la cytométrie en flux de type scanning (CytoSense) et la fluorimétrie spectrale ont pu être comparées.

Ces techniques semi-automatisées, de par la possibilité de les utiliser à haute résolution, permettent de mieux appréhender la diversité du phytoplancton et devraient donc faciliter l'élaboration d'un indice de composition pour la DCE, mais également d'apporter des informations cruciales, qui pourraient être utilisées pour estimer le bon état écologique des eaux marines du point de vue du phytoplancton dans le cadre de la DCSMM. Le but serait de généraliser l'utilisation de ces techniques sur d'autres sites de surveillance DCE et lors d'autres campagnes d'observation afin de renforcer et tester leurs limites d'applicabilité, ainsi que celles des indicateurs en construction.

Cependant, l'utilisation de Chemtax (Mackey *et al.* 1996) en routine pour la mise en œuvre d'un indice de composition ne semble pas un choix pertinent à ce stade, notamment à cause du degré d'expertise nécessaire pour obtenir des résultats cohérents. La définition d'une matrice de rapports pigmentaires (Higgins *et al.*, 2011) est très dépendante des conditions locales (fonction de la localisation des stations) et est susceptible de changer au cours de l'année. Il n'est pas ainsi envisageable d'utiliser une matrice pigmentaire « type » ni pour l'année, ni même pas pour une saison. Elle ne peut être définie qu'après une étude des conditions environnementales locales et d'une inspection des communautés phytoplanctoniques au microscope (Irigoiien *et al.* 2004), ce qui rend Chemtax très adapté pour les études, mais hélas difficilement pour la mise en application d'un indice dans un réseau de surveillance.

Bibliographie

Andersen A.L., Sauters G.G., Paskind G.W., Sexton J.P. (1993) Ultrastructure and 18S rRNA gene sequence for *Pelagomonas calceolata* gen. et sp. nov. and the description of a new algal class, the Pelagophyceae classis nov. *J Phycol* 29:701-715.

Beutler M., Wiltshire K.H., Meyer B., Moldaenke C., Lüring C., Meyerhöfer M., Hansen U.P., Dau H. (2002) A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynthes Res* 72:39-53.

Brylinski J.M., Lagadeuc Y., Gentilhomme V., Dupont J.P., Lafite R., Dupeuble P.A., Huault M.F., Auger Y., Puskaric E., Wartel M., Cabioch L. (1991) Le "fleuve côtier" : un phénomène hydrologique important en Manche orientale (exemple du Pas de Calais). *Oceanol Acta* n°sp. 11 : 197-203.

Dubelaar B.J., Gerritzen P., Beeker A.E.R., Jonker R., Tangen K. (1999) Design and first results of Cytobuoy: a wireless flow cytometer for in situ analysis of marine and fresh waters. *Cytometry* 37:247–254.

DYMAPHY (2010-2013) Développement d'un système d'observation DYnamique pour la détermination de la qualité des eaux MARines, basé sur l'analyse du PHYtoplancton. Programme INTERREG IV A "2 Mers", www.dymaphy.eu

Foss P., Guillard R. R. L., Liaaen-Jensen S. (1984) Prasinolanthin - a chemosystematic marker for algae. *Phytochem* 23:1629-1633.

Goericke R., Repeta D. (1992) The pigments of *Prochlorococcus marinus*: the presence of divinyl-chlorophyll *a* and *b* in a marine prokaryote. *Limnol Oceanogr* 37:425-433.

Guiselin N. (2010) *Caractérisation des événements phytoplanctoniques en zone côtière : tests de techniques alternatives et développement d'indicateurs de qualité des masses d'eau*. Thèse de doctorat : Océanologie biologique. Université du Littoral Côte d'Opale. 237p.

Guiselin N., Artigas L.F. & Brylinski (2010) Etude de la dynamique des communautés phytoplanctoniques par microscopie et cytométrie en flux, en eaux côtières de la Manche orientale. Rapport Agence de l'Eau Artois Picardie B22029, 77p.

Higgins H.W., Wright S.W., Schlüter L. (2011) Quantitative interpretation of chemotaxonomic pigment data . *Phytoplankton Pigments: Characterization and Applications in Oceanography*. Cambridge University Press. Suzanne Roy, Carole Llewellyn, Einar Skarstad Egeland and Geir Johansen.

Houliiez E., Lizon F., Thyssen M., Artigas L.F., Schmitt F. (2011) Spectral fluorometric characterization of Haptophytes dynamics using the Fluoroprobe: an application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *Journal of Plankton Research* vol.34, n°2, pp. 136-151.

Irigoien X., Meyer B., Harris R., Harbour D. (2004) Using HPLC pigment analysis to investigate phytoplankton taxonomy: the importance of knowing your species. *Helgoland Marine Research* 58:77-82.

Jeffrey S.W. (1961) Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochemical Journal* 80 (2):336-342.

Jeffrey S.W. (1968) Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 162 (2):271-285. doi:10.1016/0005-2728(68)90109-6.

Lampert L. (2014) *Etude chémotaxonomique des campagnes du projet européen DYMAPHY* (2012). Rapport de recherche IFREMER. France : ODE/DYNECO/PELAGOS, 2014, 44p.

Legendre P., et Legendre L. (1998) *Numerical Ecology*. Elsevier Science B.V. Developments in Environmental Modelling 20. Amsterdam: Elsevier.

Mackey M.D., Mackey D.J., Higgins H.W., Wright S.W. (1996) CHEMTAX - a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 144:265-283. doi:10.3354/meps144265.

Muylaert K., Gonzales R., Franck M., Lionard M., Van der Zee C., Cattrijsse A., Sabbe K., Chou L. et Vyverman W. (2006) Spatial variation in phytoplankton dynamics in the Belgian coastal zone of the North Sea studied by microscopy, HPLC-CHEMTAX and underway fluorescence recordings. *Journal of Sea Research* 55 (4):253-265. doi:10.1016/j.seares.2005.12.002.

Not F., Latasa M., Scharek R., Viprey M., Karleskind P., Balague V., Ontoria-Oviedo I., *et al.* (2008) Protistan assemblages across the Indian Ocean, with a specific emphasis on the Picoeukaryotes. *Deep-Sea Research. Part 1. Oceanographic Research Papers* 55 (11):1456-1473.

Olson R.J., Zettler E.R. and Durand M.D. (1993) *Phytoplankton analysis using flow cytometry*. p. 175-186. In P. F. Kemp, B. F. Sherr, and J. J. Cole [eds.], *Aquatic microbial ecology*. Lewis.

Ruser A., Popp P., Kolbowski J., Reckermann M., Feuerpfei P., Egge B., Reineke C., Vanselow K.H. (1999) *Comparison of chlorophyll-fluorescence based measuring systems for the detection of algal groups and the determination of chlorophyll-a concentrations*. *Berichte Forsch.-u. technologiezent. Westküste d. Univ. Kiel*, 19:27-38.

Convention ONEMA-Ifremer 2013

Rutten T.P.A., Sandee B., Hofman A.R.T. (2005) Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: a successful approach? *Cytometry A* 64A:16–26.

Schroeder F., Mizerkowski B., Petersen, W. (2008) The pocketFerryBox - A new portable device for water quality monitoring in oceans and rivers. *Journal Of Operational Oceanography* 1(2):51-57.

Sosik H.M., Olson R.J. (2007) Automated taxonomic classification of phytoplakton sampled with imaging-in-flow cytometry. *Limnol Oceanogr Meth* 5:204-216.

Thyssen M. (2008) *Analyse à haute fréquence spatiale et temporelle du phytoplancton à l'aide de la cytométrie en flux automatisée et immergeable*. Thèse de doctorat : Sciences de l'Environnement Marin. Université de la Méditerranée. 203p.

Thyssen M., Beker B., Ediger D., Yilmaz D., Garcia N. and Denis M. (2010) Phytoplankton analysis during two contrasted summers in a Mediterranean harbour: contribution of submersible flow cytometry to conventional observation techniques. *EMAS*

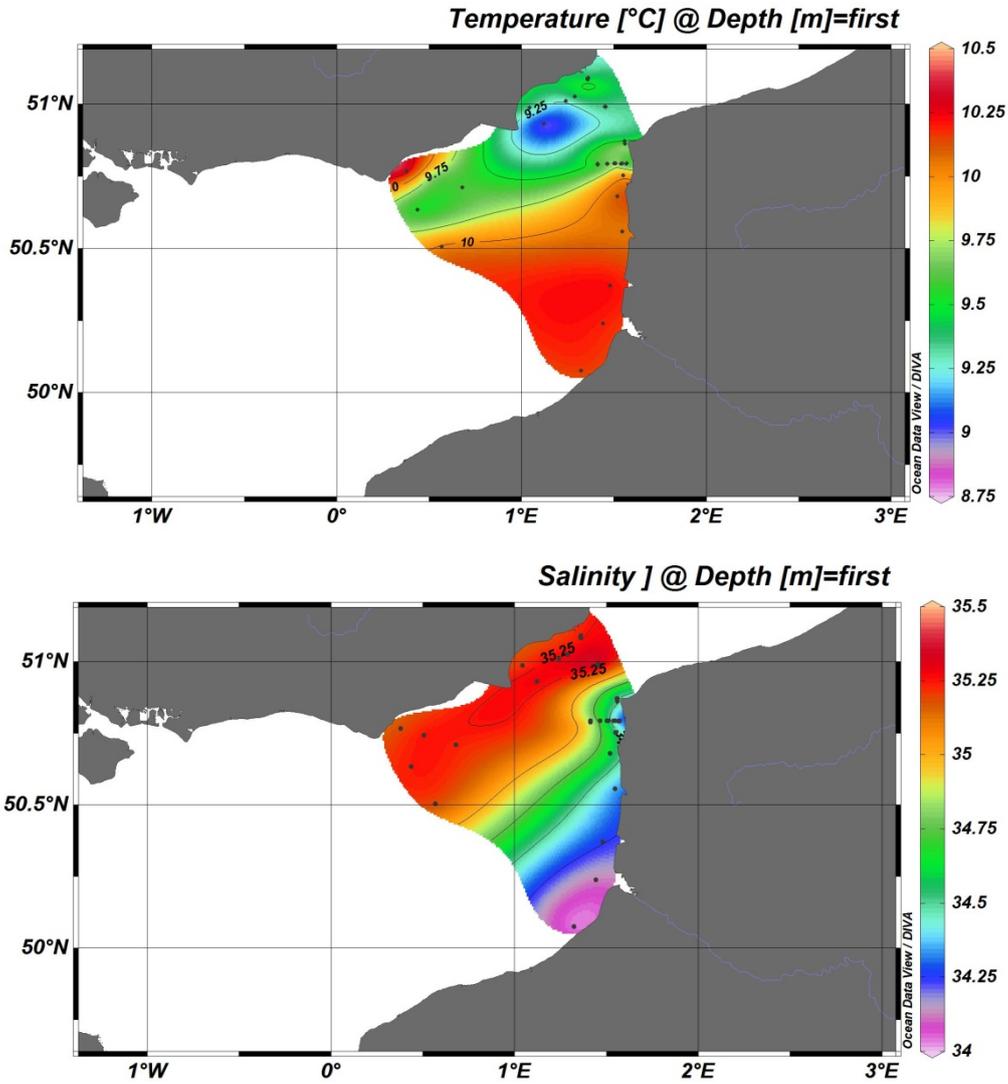
Zapata M., Rodríguez F. et Garrido J.L. (2000) Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series* 195:29-45. doi:10.3354/meps195029.

ANNEXES

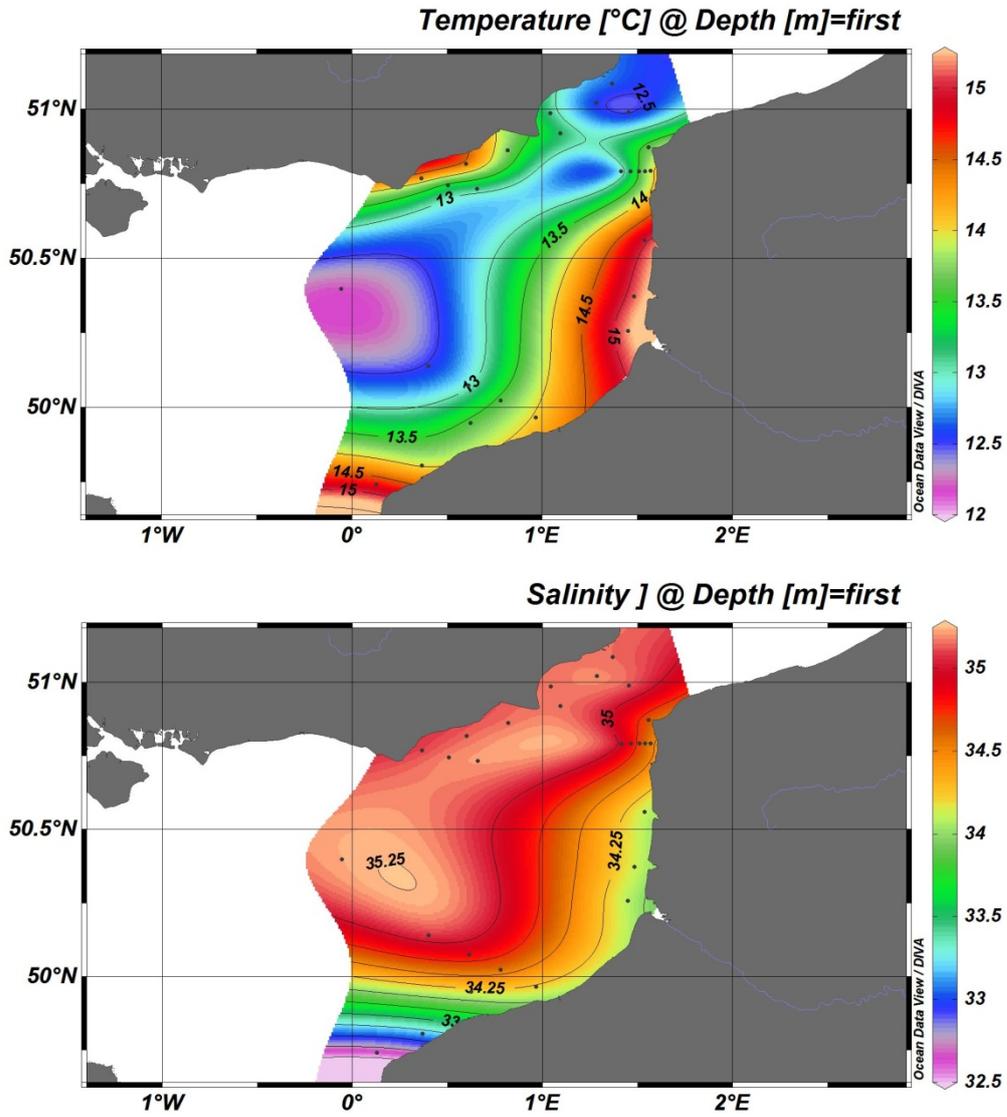
Campagnes DYPHYMA 2012

- I. Distribution de la température (°C) et de la salinité de surface pour le leg d'avril
- II. Distribution de la température (°C) et de la salinité de surface pour le leg de mai-juin
- III. Distribution spatiale des dominances des classes algales (%) en surface pour le leg d'avril
- IV. Distribution spatiale des dominances des classes algales (%) en surface pour le leg de mai-juin

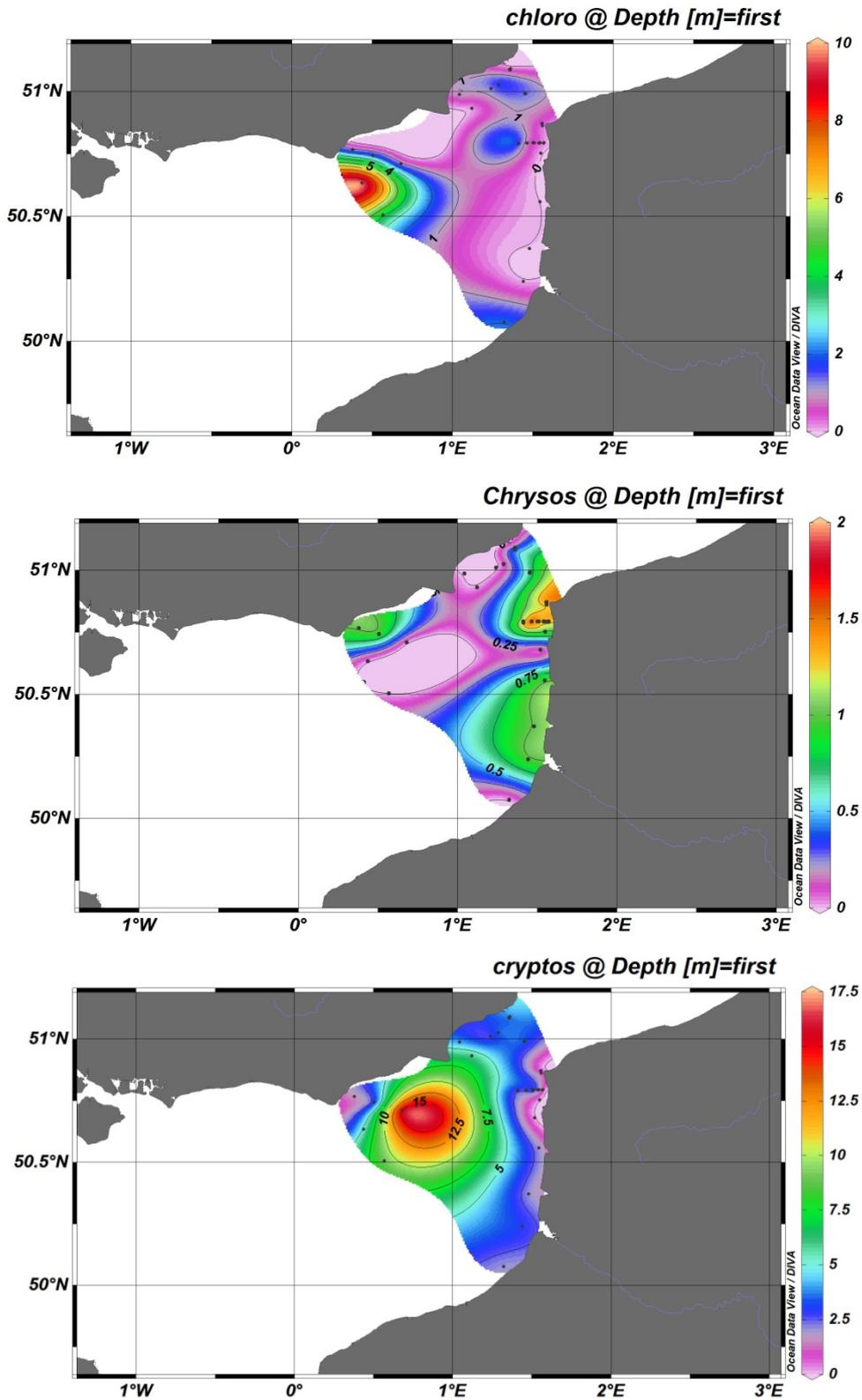
I. Distribution Température et Salinité de surface d'avril 2012

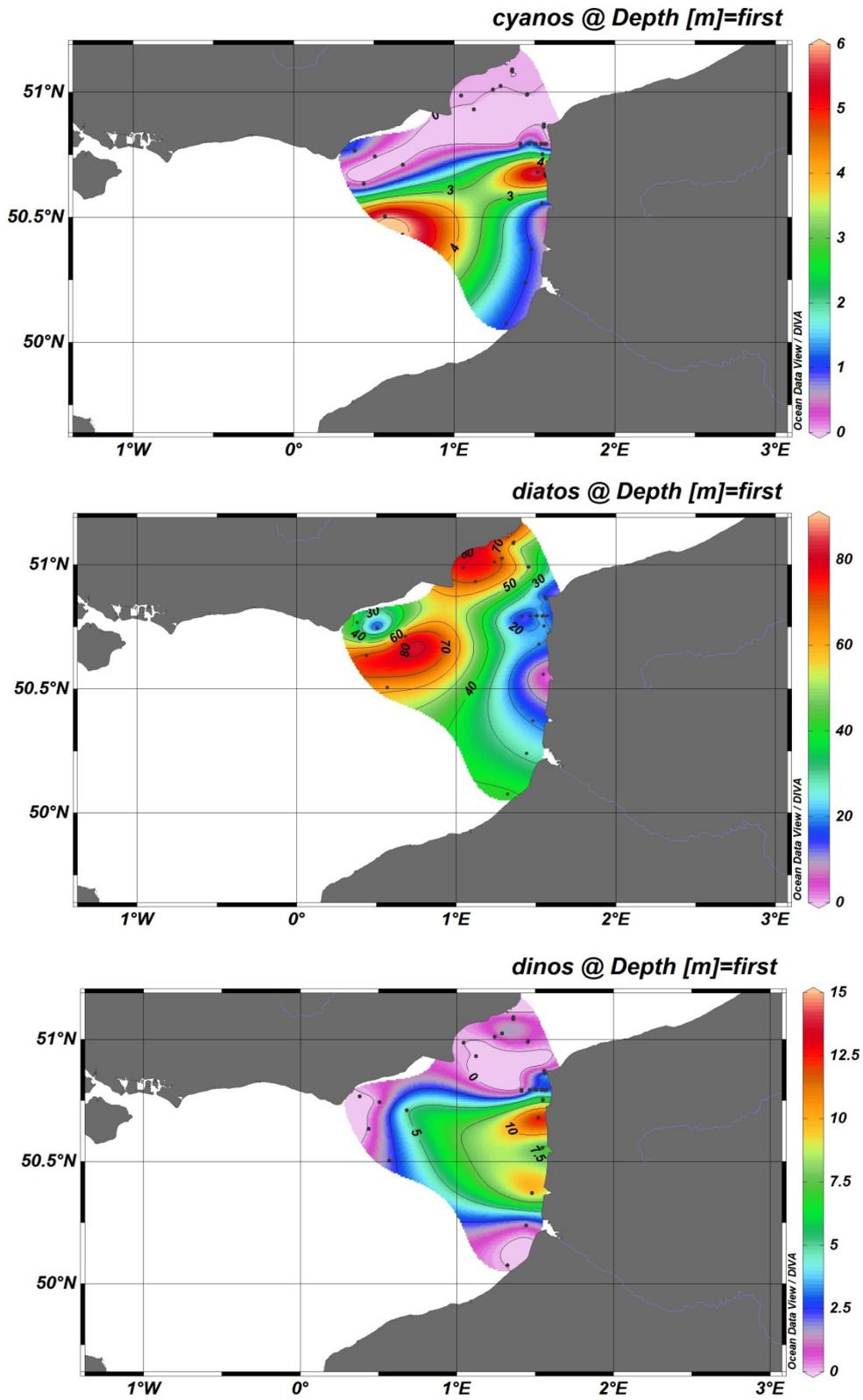


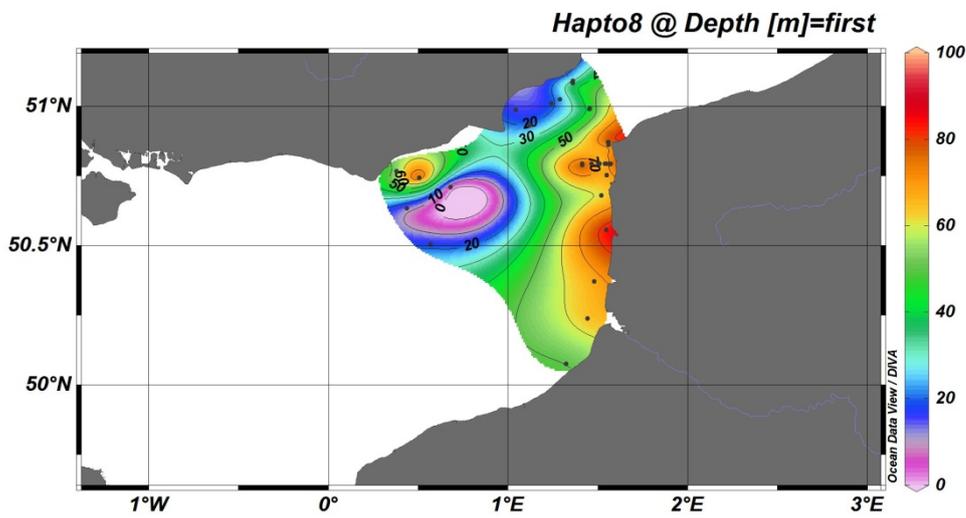
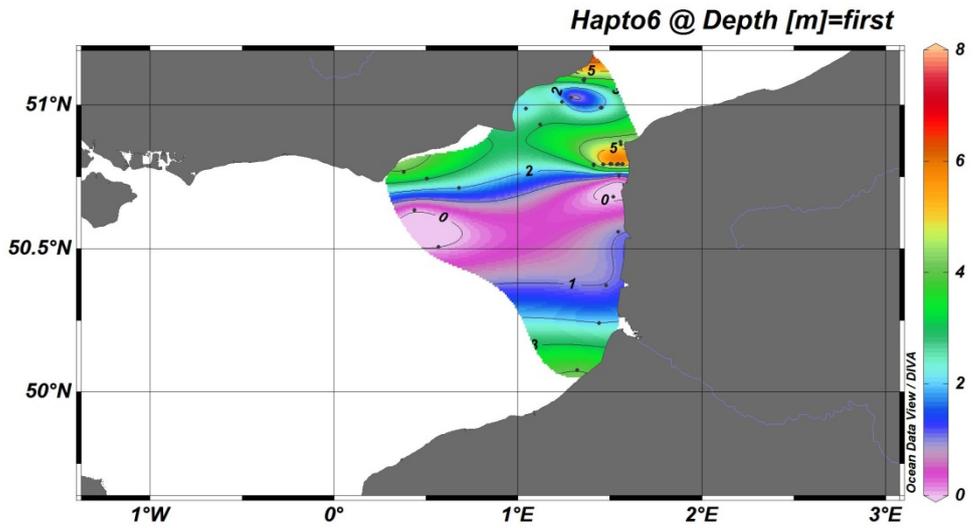
II. Distribution Température et Salinité de surface mai 2012



III. Distribution des dominances des classes au mois d'avril 2012







IV. Distribution des dominances des classes en mai-juin 2012

