

Premières propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basé sur les résultats des méthodes pigments et diversité génétique

Action 3 – Indice Composition – Livrable 1

Rapport final, mars 2015

Partie 1

Raffaele SIANO (Ifremer, DYNECO PELAGOS, Nantes)

Daniel DELMAS (Ifremer, DYNECO PELAGOS, Nantes)

Partie 2

Luis LAMPERT (Ifremer, DYNECO PELAGOS, Nantes)

Mars 2015

AUTEURS

Partie 1

Raffaele SIANO (Ifremer) – raffaele.siano@ifremer.fr

Daniel DELMAS (Ifremer) – daniel.delmas@ifremer.fr

Partie 2

Luis LAMPERT (Ifremer) – luis.lampert@ifremer.fr

CORRESPONDANTS

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

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

AUTRES CONTRIBUTEURS

Agnès YOUENOU, Technicienne chimiste (Ifremer- Centre de Bretagne DYNECO/Pelagos)
Agnes.Youenou@ifremer.fr

Julien QUERE, Technicien phytoplancton (Ifremer- Centre de Bretagne DYNECO/Pelagos)
Julien.quere@ifremer.fr

Sophie SCHMITT, Technicienne biochimiste (Ifremer- Centre de BretagneDYNECO/Pelagos)
Sophie.Schmitt@ifremer.fr

Michel LUNVEN, Ingénieur (Ifremer- Centre de Bretagne DYNECO/Pelagos)
michel.lunven@ifremer.fr

Lauriane MADEC, Technicienne biologiste moléculaire (Station Biologique de Roscoff/UPMC)
Lauriane.madec@sb-roscoff.fr

Richard CHRISTEN, Bioinformaticien (Université de Nic e)
Richard.christen@unice.fr

Droits d'usage :

Niveau géographique :

Couverture géographique : nationale

Niveau de lecture :

RESUME

Partie 1 : Pigments et diversité génétique

Après avoir traité la variabilité temporelle (Rapport Onema 2013), les analyses des données de taxinomie pigmentaire et de diversité génétique par metabarcoding ont abordé la variabilité spatiale des communautés phytoplanctoniques en surface et au maximum profond de chlorophylle. La recherche d'indices de compositions du phytoplancton eucaryote s'est concentrée sur l'acquisition et l'analyse de données issues de campagnes d'échantillonnage réalisées dans le golfe de Gascogne, sur une radiale côte-large traversant le panache de la Gironde, en mai 2012 et 2013 (campagne Pelgas 2012 et 2013). Lors des échantillonnages, à travers du panache de la Gironde, des structures hydrodynamiques différentes étaient présentes, à savoir une stratification de la colonne d'eau en 2012 et une structure mélangée, relativement uniforme, de la colonne d'eau en 2013. Malgré les différentes conditions environnementales, la structure des communautés phytoplanctoniques par classe de taille présente un patron globalement constant, avec une dominance du pico-plancton (<3µm) sur le nano-(3-20µm) et micro-plancton (>20µm), à l'exception d'une situation particulière, au niveau du maximum profond des stations côtières de la campagne Pelgas 2012 où le micro-plancton est largement dominant. En cette occasion une efflorescence monospécifique d'un dinoflagellé (identifié grâce au pigment marqueur, la péridinine) appartenant au genre *Biecheleria* (identifié par méthode génétique, en étant un taxon non identifiable en microscopie optique) a été détectée. Les situations écosystémiques étudiées le long du panache de la Gironde en 2012 et 2013 sont complémentaires à celles rencontrées en Baie de Concarneau à l'occasion de l'étude de la variabilité temporelle des communautés phytoplanctoniques.

L'analyse de la diversité pigmentaire a mis en évidence la dynamique des communautés pico-, nano-, microphytoplanctoniques au niveau de classes algales le long du panache. Grâce à une caractérisation exhaustive de la biodiversité des eucaryotes, les analyses de la diversité génétique (132 Operational Taxonomic Units identifiés) complètent les indications de diversité pigmentaire en montrant que du point de vue des espèces génétiquement identifiées les communautés des eucaryotes des trois classes de tailles sont distinctes les unes des autres et indépendamment structurées dans l'environnement.

Pour chacune de ces classes de taille il est possible d'identifier des OTUs caractéristiques, présents majoritairement dans l'une d'entre elles. Les Mamiellophyceae (genres : *Micromonas*, *Bathycoccus*, *Ostreococcus*) sont par exemple caractéristiques du picoplancton. La présence relativement importante des Mamiellophyceae au sein des communautés piconanoplanctoniques a été mise en évidence dans toutes les situations spatio-temporelles étudiées. L'importance de la chl b (pigment caractéristique de Mamiellophyceae) dans le picoplancton corrobore l'information que les Mamiellophyceae sont une composante importante du picoplancton. Pour le nano- et le microplancton il n'a pas été possible de mettre en évidence une association cohérente et récurrente entre OTUs et pigments. Cependant une association être pigments et classes phytoplanctoniques (diatomées/dinoflagellés) est évidente.

L'association Mamiellophyceae-chl b au sein du picoplancton représente une piste de recherche prometteuse pour la définition d'un indicateur au sein des communautés pico-phytoplanctoniques. Il reste encore à vérifier si la variabilité spatio-temporelle de Mamiellophyceae-chl b est représentative des communautés phytoplanctoniques dans leur intégralité en termes de richesse spécifique et/ou des patrons spatio-temporels d'abondance. Ces travaux, supportés par des analyses statistiques appropriés, seront abordés en 2015.

Partie 2 : Indice de composition pigmentaire

La DCE demande que l'indicateur phytoplancton prenne en compte la composition phytoplanctonique. Cependant, se pose le problème de la définition d'espèces indicatrices dans des systèmes fermés ou semi-fermés, où un gradient de pression suffisant pour établir des relations empiriques entre la pression et l'indicateur à l'intérieur du système fait souvent défaut. De plus, un taxon peut réagir de façon similaire en réponse à une eutrophisation d'origine anthropique ou naturelle. Il s'ajoute une difficulté supplémentaire avec la superposition de phénomènes liés aux changements climatiques globaux.

La perte d'information spécifique liée aux analyses pigmentaires par HPLC reste compatible avec leur utilisation dans les études des structures des communautés phytoplanctoniques. Si la chémotaxonomie ne permet pas de définir le phytoplancton jusqu'à l'espèce, elle permet de discriminer les fractions pico- et nano-phytoplanctoniques, impossibles à détecter avec le microscope optique, et pouvant représenter la biomasse dominante dans certaines zones en été.

L'étude, réalisée avec les données pigmentaires existantes sur le PCAF et la Manche orientale, suggère que l'indice de Bray-Curtis (BCSI) pourrait répondre aux attentes d'un indice de composition à travers la matrice pigmentaire en mettant en évidence les dérives (anthropiques et non anthropiques) des points de suivi côtier par rapport à un point de référence. Nous avons testé cet indice en utilisant les nutriments et la biomasse chlorophyllienne comme indicateurs de pression, où il a bien répondu aux gradients de pressions et aux changements de la composition du peuplement à travers leurs profils pigmentaires.

La mise en place des grilles, du fait du manque de données pigmentaires historiques pour quantifier les niveaux, devra faire l'objet d'une étude lors de la mise en application des indicateurs, sur un chantier DCE sur une durée d'au moins une année.

MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

phytoplancton, pigments, indice composition, diversité pigmentaire, metabarcoding, picoplancton, Mamiellophyceae, chl**a**, Golfe de Gascogne, panache de la Gironde

TITLE

First proposals for an index of phytoplankton composition, based on the results of the pigments methods and genetic diversity

ABSTRACT

Part One : pigments and genetic diversity

After working on the temporal variability (Rapport Onema 2013), analyses on pigment and genetic diversity (metabarcoding) focused on the spatial diversity of phytoplankton communities at surface and at the deep chlorophyll maximum (DCM). The research of the indicators on the composition of eukaryotic phytoplankton was based on the acquisition and analysis of data collected in the frame of sampling cruises carried out on the Gulf of Biscay, across an in-offshore transect of the River Gironde plume, in May 2012 et 2013 (Pelgas 2012 and Prlgas 2013 cruises). Different hydrodynamic structures were present in occasion of the samplings: a well-mixed water column in 2012 and a relative, homogenous water column structure in 2013. Despite the different environmental conditions, phytoplankton community structures of the different size classes show a relative constant pattern, with the dominance of the pico-plankton (<3µm), over the nano- (3-20µm) and the micro-plankton (>20µm). As an exception, at the DCM of the inshore stations, in occasion of the cruise Pelgas 2012, the micro-plankton largely dominated the total phytoplankton community. At that occasion a monospecific bloom of a dinoflagellate (identified by the peridinin pigment), belonging to the genus *Biecheleria* (identified by means of genetic methods, since the taxon is not identifiable in optical microscopy), has been detected. The different ecosystemic situations studied across the River Gironde plume are complementary to those studied in the Concarneau Bay in occasion of the study of the temporal variability of the phytoplankton communities.

Pigment diversity analysis showed the dynamic of the pico-, nano-, and microphytoplanktonic across the plume at the taxonomic level of algal classes. Given the exhaustive characterization of the eukaryotic biodiversity, the analyses of the genetic diversity (132 OTU, Operational Taxonomic Unit) complete the indications of pigment diversity. Genetic analyses suggest that the communities of the three size classes are different among each other and independently structured in the environment.

For each of the size classes it is possible to identify characteristic OTUs on the basis of their higher relative importance in a size classes than in the others. For instance, the Mamiellophyceae (genera: *Micromonas*, *Bathycoccus*, *Ostreococcus*) are characteristic of the picophytoplankton. The higher relative importance of the Mamiellophyceae within the picophytoplanktonic community has been showed in all spatio-temporal situations analyzed. The higher relative importance of the chl b (pigment characteristic of the Mamiellophyceae) corroborates the information that the Mamiellophyceae is an important component of the picoplankton. For the nano- and the microplankton a coherent and recurrent association between OTUs and pigments was not found. However an association between pigments and phytoplanktonic classes (diatoms/dinoflagellates) is evident.

The association Mamiellophyceae-chl b within the picoplankton represents a promising research direction for the identification of an indicator of the picoplanktonic community. It is still necessary to demonstrate that the variability of the Mamiellophyceae-chl b is representative of the whole picophytoplanktonic community in terms of species richness and/or spatio-temporal patterns of abundance. These hypothesis will be verified in 2015 and supported by appropriate statistical analyses.

Part Two : Pigment Composition Index

The WFD requires that the phytoplankton indicator takes into account the phytoplankton composition. However, there is the problem of the definition of indicator species in closed or semi-closed systems, where a sufficient pressure gradient to establish empirical relationships between pressure and the indicator inside the system is often lacking. In addition, a taxon may react similarly in response to eutrophication of anthropogenic or natural origin. This adds an additional difficulty with overlapping phenomena related to global climate change.

The loss of specific information related to pigment analysis by HPLC is compatible with their use in studies of the structure of phytoplankton communities. If chemotaxonomy does not allow defining phytoplankton species, it allows to discriminate pico and nano-phytoplankton fractions, which is impossible to detect with the optical microscope, and which can represent the dominant biomass in some zones in summer.

The study, conducted with existing pigments data on the Atlantic continental shelf and the Eastern Channel, suggests that the Bray-Curtis index (BCSI) could meet the expectations of a composition index through the pigment matrix highlighting drifts (anthropogenic and non-anthropogenic) of coastal monitoring points from a reference point. We tested this index using nutrients and chlorophyll biomass as pressure indicators, where he responded well to the pressure gradients and changes in the composition of the population through their pigment profiles.

The establishment of the grids, due to the lack of historical data to quantify pigment levels, will have to be studied during the implementation of the WFD indicators, on a workshop site for a period of at least one year.

KEY WORDS (THEMATIC AND GEOGRAPHICAL AREA)

phytoplankton, pigments, composition index, pigment diversity, metabarcoding, picoplankton, Mamiellophyceae, chl_b, Gulf of Biscay, River Gironde plume

SYNTHESE POUR L'ACTION OPERATIONNELLE

Ce document comporte deux rapports dont les principales conclusions sont résumées ci-dessous :

- Siano Raffaele & Delmas Daniel, 2014. Premières propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basé sur les résultats des méthodes pigments et diversité génétique
- Lampert Luis, 2014. Test d'un Indice de composition pigmentaire pour les secteurs Atlantique et Manche (DCE). RST.DYNECO n° 2014-06, 50 p.

Partie 1 : Pigments et diversité génétique

Après avoir traité la variabilité temporelle (Rapport Onema 2013), les analyses des données de taxinomie pigmentaire et de diversité génétique par metabarcoding ont abordé la variabilité spatiale des communautés phytoplanctoniques en surface et au maximum profond de chlorophylle. La recherche d'indices de compositions du phytoplancton eucaryote s'est concentrée sur l'acquisition et l'analyse de données issues de campagnes d'échantillonnage réalisées dans le golfe de Gascogne, sur une radiale côte-large traversant le panache de la Gironde, en mai 2012 et 2013 (campagne Pelgas 2012 et 2013). Lors des échantillonnages, à travers du panache de la Gironde, des structures hydrodynamiques différentes étaient présentes, à savoir une stratification de la colonne d'eau en 2012 et une structure mélangée, relativement uniforme, de la colonne d'eau en 2013. Malgré les différentes conditions environnementales, la structure des communautés phytoplanctoniques par classe de taille présente un patron globalement constant, avec une dominance du pico-plancton (<3µm) sur le nano-(3-20µm) et micro-plancton (>20µm), à l'exception d'une situation particulière, au niveau du maximum profond des stations côtières de la campagne Pelgas 2012 où le micro-plancton est largement dominant. En cette occasion une efflorescence monospécifique d'un dinoflagellé (identifié grâce au pigment marqueur, la péridinine) appartenant au genre *Biecheleria* (identifié par méthode génétique, en étant un taxon non identifiable en microscopie optique) a été détectée. Les situations écosystémiques étudiées le long du panache de la Gironde en 2012 et 2013 sont complémentaires à celles rencontrées en Baie de Concarneau à l'occasion de l'étude de la variabilité temporelle des communautés phytoplanctoniques.

L'analyse de la diversité pigmentaire a mis en évidence la dynamique des communautés pico-, nano-, microphytoplanctoniques au niveau de classes algales le long du panache. Grâce à une caractérisation exhaustive de la biodiversité des eucaryotes, les analyses de la diversité génétique (132 Operational Taxonomic Units identifiés) complètent les indications de diversité pigmentaire en montrant que du point de vue des espèces génétiquement identifiées les communautés des eucaryotes des trois classes de tailles sont distinctes les unes des autres et indépendamment structurées dans l'environnement.

Pour chacune de ces classes de taille il est possible d'identifier des OTUs caractéristiques, présents majoritairement dans l'une d'entre elles. Les Mamiellophyceae (genres : *Micromonas*, *Bathycoccus*, *Ostreococcus*) sont par exemple caractéristiques du picoplancton. La présence relativement importante des Mamiellophyceae au sein des communautés piconanoplanctoniques a été mise en évidence dans toutes les situations spatio-temporelles étudiées. L'importance de la chl b (pigment caractéristique de Mamiellophyceae) dans le picoplancton corrobore l'information que les Mamiellophyceae sont une composante importante du picoplancton. Pour le nano- et le microplancton il n'a pas été possible de mettre en évidence une association cohérente et récurrente entre OTUs et pigments. Cependant une association être pigments et classes phytoplanctoniques (diatomées/dinoflagellés) est évidente.

L'association Mamiellophyceae-chl b au sein du picoplancton représente une piste de recherche prometteuse pour la définition d'un indicateur au sein des communautés pico-phytoplanctoniques. Il reste encore à vérifier si la variabilité spatio-temporelle de Mamiellophyceae-chl b est représentative des communautés phytoplanctoniques dans leur intégralité en termes de richesse spécifique et/ou des patrons spatio-temporels d'abondance. Ces travaux, supportés par des analyses statistiques appropriés, seront abordés en 2015.

Partie 2 : Indice de composition pigmentaire

La DCE exige que les futures évaluations de la qualité biologique comprennent aussi des indicateurs qui prennent en compte la **composition** phytoplanctonique à cause de la réactivité du phytoplancton aux changements de l'environnement. Cependant, se pose le problème de la définition d'espèces indicatrices dans des systèmes fermés ou semi-fermés tels que les abers ou les baies, où un gradient de pression suffisant pour établir des relations empiriques entre la pression et l'indicateur à l'intérieur du système fait souvent défaut. De plus, un taxon peut réagir de façon similaire en réponse à une eutrophisation d'origine anthropique (rejet des eaux urbaines) ou naturelle (pluies, courants). Il s'ajoute une difficulté supplémentaire avec la superposition de phénomènes liés aux changements climatiques globaux, qui agissent comme une pression externe supplémentaire difficile à prévoir et à séparer des pressions locales.

La perte d'information spécifique liée aux analyses pigmentaires par HPLC reste compatible avec leur utilisation dans les études des structures des communautés phytoplanctoniques (Clarke et Warwick 1994 ; Sherrard, Nimmo, et Llewellyn 2006). Avec le choix de biomarqueurs il est donc possible d'effectuer un lien entre complexité des assemblages phytoplanctoniques et la matrice pigmentaire obtenue par HPLC. Si la chémotaxonomie ne permet pas de définir le phytoplancton jusqu'à l'espèce, elle permet de discriminer les fractions pico- et nano-phytoplanctoniques, impossibles à détecter avec le microscope optique. C'est le cas des coccolithophoridés qui, avec la fixation au Lugol acide, perdent leurs coccolithes calcaires, ou des prasinophycées, haptophytes et cyanobactéries, qui peuvent représenter la biomasse dominante sur le Plateau continental atlantique français (PCAF) en été (Luis Lampert 2001 ; L. Lampert et al. 2002).

Cette étude constitue une première évaluation de l'utilisation des pigments phytoplanctoniques en Atlantique et en Manche pour construire un indice de composition (au sens de la DCE) et estimer, à travers cet indice, le degré d'éloignement des points de suivi par rapport à un point « référence ». Nous utiliserons des données pigmentaires des campagnes existantes pour bâtir un indice de composition. Pour la méthodologie à appliquer et le choix des métriques nous avons retenu les indices de Bray-Curtis et de Kulczynski tels que définis par Sherrard (Sherrard, Nimmo, et Llewellyn 2006).

L'étude, réalisée avec les données pigmentaires existantes sur le PCAF et la Manche orientale, suggère que l'indice de Bray-Curtis (BCSI) pourrait répondre aux attentes d'un indice de composition à travers la matrice pigmentaire en mettant en évidence les dérives (anthropiques et non anthropiques) des points de suivi côtier par rapport à un point de référence, en tenant compte de la composition des flores phytoplanctoniques. Nous avons testé cet indice dans les eaux du plateau continental atlantique et en Manche en utilisant les nutriments et la biomasse chlorophyllienne comme indicateurs de pression, où il a bien répondu aux gradients de pressions et aux changements de la composition du peuplement à travers leurs profils pigmentaires (tableaux ci-dessous).

Radiale Gironde G10-G13

Eloignement côte	++++	+++	++	+
Point suivi	G10	G11	G12	G13
BCSI	1	0.88	0.74	0.34
KI	1	0.88	0.76	0.36

Boulogne-sur-Mer 31 mai 2012

Eloignement côte	+++++	++++	+++	++	+
Point suivi	54	55	56	57	58
BCSI	1	0.91	0.51	0.62	0.32
KI	1	0.91	0.63	0.69	0.56

Indice BCSI et KI pour deux radiales (Atlantique et Manche) en fonction de l'éloignement du point de référence et du gradient de pressions

La mise en place des grilles séparant les différents niveaux de qualité devrait être facilitée par le fait que les indicateurs de similarité (BCSI ou KI) sont bornés de 0 à 1. Cette phase représente l'une de plus difficiles à mettre en place à cause du manque de données pigmentaires historiques pour quantifier les niveaux. Elle devra faire l'objet d'une étude lors de la mise en application des indicateurs sur un chantier DCE sur une durée d'au moins une année.

Cette étude constitue une première approche dans le choix d'un indice de composition pigmentaire, mais il serait souhaitable qu'elle soit complétée dans les domaines suivants :

- mise en chantier sur des points de surveillance DCE pendant une année,
- définition des pressions et des grilles d'application,
- étude de la pertinence des points référence actuels,
- étude sur le biais lié à la fréquence (incertitude) de l'échantillonnage actuel.

Nous déconseillons l'utilisation de CHEMTAX pour la mise en œuvre d'un indice de composition à cause du degré d'expertise nécessaire pour obtenir des résultats cohérents. Il n'est pas envisageable d'utiliser une matrice pigmentaire « type » ni pour l'année, ni pour une saison. Elle ne peut être définie qu'après une étude des conditions environnementales locales et une observation des communautés phytoplanctoniques, ce qui rend CHEMTAX très adapté pour les études, mais difficilement applicable à un indicateur dans un réseau de surveillance.

Pour être validé dans les conditions d'application de la DCE, et à cause des différences dans les peuplements phytoplanctoniques, cet indice devra être testé sur un chantier DCE Atlantique et un chantier Manche. Chaque chantier devrait idéalement compter au moins trois points de surveillance plus un point référence placés sur un gradient de pressions connu. Une fréquence d'échantillonnage toutes les deux semaines devrait pouvoir permettre de statuer sur sa pertinence au bout d'un an d'échantillonnage.

Premières propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basé sur les résultats des méthodes pigments et diversité génétique

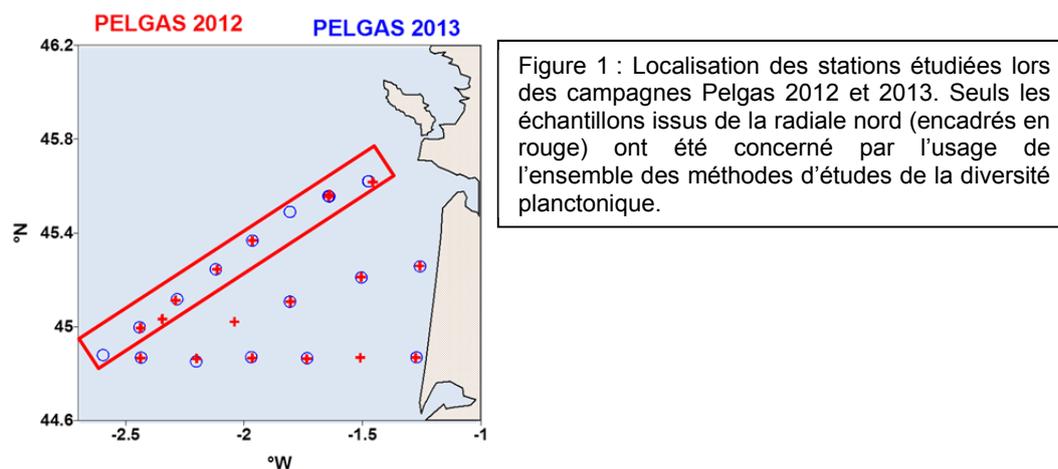
Raffaele SIANO & Daniel DELMAS

2014 – Domaine Evolution, fonctionnement et évaluation des écosystèmes littoraux
Action 3 Indice composition

Premières propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basé sur les résultats des méthodes pigments et diversité génétique

1. Introduction et objectifs

La recherche d'indicateurs de biodiversité phytoplanctonique doit tenir compte de la variabilité spatio-temporelle, parfois très rapide, des communautés pélagiques. Les apports fluviaux, impactent les structures hydrologiques et les teneurs en nutriments des eaux marines côtières. Ces apports modifient la variabilité spatiale des populations phytoplanctoniques ainsi que leur biodiversité. Après avoir étudié la variabilité temporelle des populations phytoplanctoniques (Rapport ONEMA 2013) nos efforts se sont reportés sur l'étude de leur variabilité spatiale des populations phytoplanctoniques au sein d'un gradient environnemental important (panache de la Gironde). Les radiales côte-large de l'embouchure de la Gironde aux accords du plateau représentent un bon gradient environnemental correspondant probablement à des peuplements phytoplanctoniques différents. Deux campagnes d'échantillonnage précédemment réalisées (Pelgas 2012 : 26-31 mai 2012, Pelgas 2013 : 25-31 mai 2013) ont servi de support à cette étude. Trois radiales partant de la côte et dirigées vers le large ont été systématiquement prospectées afin de pouvoir se replacer dans un contexte écologique plus large. Les activités de recherche 2014 se sont concentrées sur l'acquisition des données de biodiversité génétique et pigmentaire des échantillons issus des radiales nord des campagnes Pelgas 2012 et 2013 (Fig. 1).



2. Activités effectués

2.1 Analyses des structures hydrologiques

Les structures hydrologiques de la colonne d'eau ont été étudiées à l'aide d'un profileur CTD-fluorescence, les prélèvements sont réalisés à l'aide de bouteilles hydrologiques montées en rosette et couplées au profileur. Les teneurs en sels nutritifs (NO_2 , NO_3 , NH_4 , Si(OH)_4 , PO_4) ont été mesurées par autoanalyseur.

2.2 Analyses de la diversité phytoplanctonique

Pour l'analyse de la diversité des communautés phytoplanctoniques deux types d'approches,

alternatives et complémentaires à l'approche morphologique classique obtenue par analyse au microscope optique, ont été utilisés : diversité pigmentaire et diversité génétique par approche de metabarcoding. Pour cette étude les échantillons ont été prélevés dans la couche homogène de surface et au niveau du maximum profond de chlorophylle. La diversité planctonique a été étudiée en considérant les classes micro- (>20µm), nano (3-20µm) et pico-planctoniques (<3µm) séparées par filtration différentielles à l'aide de filtres de différentes porosités. Pour la campagne Pelgas 2012 les échantillons pour l'étude de la diversité génétiques de la classe du picoplancton n'étaient pas disponibles. Pour la campagne Pelgas 2013 toutes les classes de taille ont été analysées avec les deux approches méthodologiques.

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

Les pigments ont été analysés en utilisant la méthode de Van Heulekem et Thomas (2001) selon le protocole de Ras et Claustre in Hooker et al (2010). Pour déterminer la structure de taille du phytoplancton (micro- > 20µm, nano- : 3-20 µm, et picophytoplancton < 3 µm), trois fractions sont obtenus par filtration différentielle des échantillons. Pour chaque campagne, l'ensemble des échantillons issus des 19 stations (2 niveaux, 3 fractions) échantillonnées sur les trois radiales ont été analysé par HPLC (228 échantillons au total). Périodiquement les analyses sont répliquées pour vérifier la bonne reproductibilité des protocoles.

2. 2. 2 Mise en œuvre des méthodes de diversité génétiques et acquisition des données

Le développement et l'application des protocoles d'analyse génétique des échantillons prélevés en 2012 par metabarcoding ont été effectués en collaboration avec le groupe phytoplancton de la Station Biologique de Roscoff (Université Pierre et Marie Curie) dans le cadre d'un contrat de sous-traitance de 8 mois (L. Madec). Ce travail a consisté en plusieurs étapes :

- Prise de contact avec la plateforme GeT (Plateforme Génome et Transcriptome) de Toulouse ;
- extraction de l'ADN des filtres ;
- amplification de la région ciblée pour l'étude de la biodiversité par PCR ;
- quantification des produits d'amplifications par picogreen ;
- envoi des échantillons à Toulouse pour le séquençage *Illumina Mi Seq*.

L'ADN extrait des filtres (kit Nucleo Spin Plant II) a été quantifié au Nanodrop. Afin de comparer les résultats des amplifications (PCR) entre les échantillons, avant d'effectuer les réactions de PCR, les échantillons ont été dilués de manière à ce qu'ils aient une même concentration d'ADN d'environ 10 ng/µL. En suivant les consignes de la plateforme de Toulouse, la région V4 (partie en rouge) a été amplifiée en replicats avec les amorces suivantes développées avec la plateforme :

- Forward :V4f_PlaGe 5'-CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCAGCASCYGGGTAATTCC-3'
- Reverse :V4r_PlaGe 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTTTCGTTCTTGATYRA-3'.

Le fragment génétique ciblé (V4 18rDNA) permet d'analyser l'ensemble des protistes marins, autotrophes et hétérotrophes confondus, et ainsi de caractériser la totalité des organismes présents dans un écosystème. Les produits d'amplification obtenus par PCR ont été analysés sur gel d'agarose à 1,5%, purifiés, re-quantifiés (Picogreen Quant-it Kit). Les produits d'amplification ont ensuite rapporté au même volume avant l'envoi à la plateforme de Toulouse pour le séquençage *Illumina Mi-Seq*. Les séquences ont été annotées en utilisant la base PR2 (Protist Ribosomal Reference database <http://ssu-rna.org/>). Une analyse manuelle et/ou l'introduction des nouvelles séquences dans la base ont permis de préciser certaines annotations au niveau de l'espèce ou du clade génétique (infraspécifique). Ce travail d'annotation a été effectué en collaboration avec R. Christen de l'Université de Nice. Pour la comparaison des échantillons, les données ont été normalisées et l'importance relative (%) de chaque OTU (Operational Taxonomic Unit) dans chaque échantillon a été calculée. Seulement les OTU correspondent à des organismes phytoplanctoniques photosynthétiques ont été pris en compte pour cette étude.

3. Contexte hydrologique

D'un point de vue hydrologique, les situations rencontrées le long de la radiale Nord de la campagne Pelgas 2012 et 2013 sont très contrastées. En 2012 les eaux de surface sont plus chaudes qu'en 2013, la salinité présente un gradient côte-large classique alors qu'en 2013 on observe la présence d'une importante lentille d'eau dessalée (< 34.0) sur la partie centrale du plateau aquitain (Fig. 2). La campagne Pelgas 2012 se caractérise par une stratification thermique bien établie sur toute la zone et une stratification haline côtière ; à l'inverse en 2013, les eaux de surface sont plus froide (<15 °C) et la stratification thermohaline est très peu marquée (Fig.3). Cette différence de structure hydrologique peut être imputée aux conditions météorologiques hivernales et printanières « extrêmes » rencontrés en 2013 (pour la période janvier – mai, le débit moyen de la Gironde en 2013 deux fois supérieur à celui de 2012 eg 1525 vs 875 m³.sec⁻¹, Fig. 4).

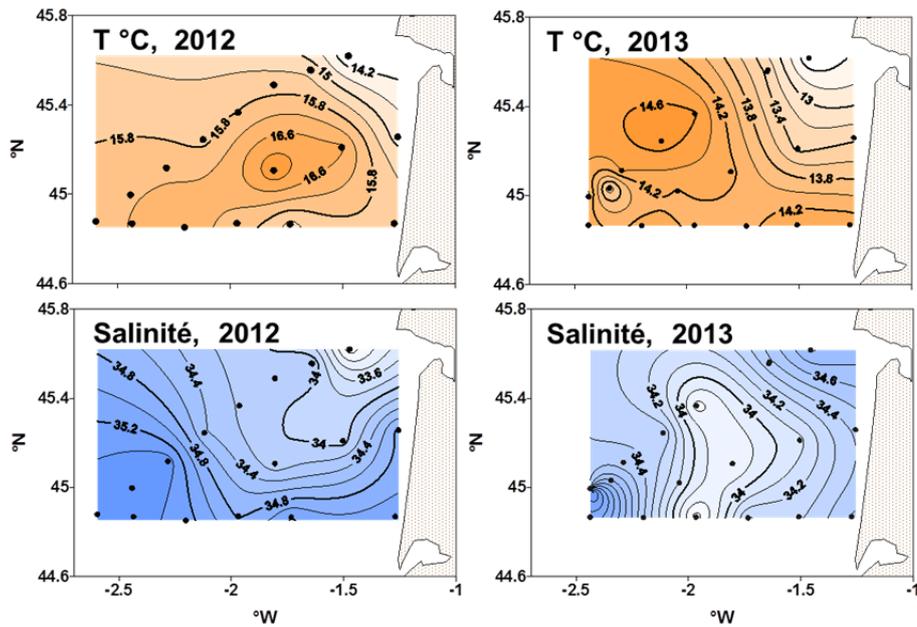


Figure 2 : Température et salinité des eaux de surface au cours des campagnes Pelgas 2012 et 2013.

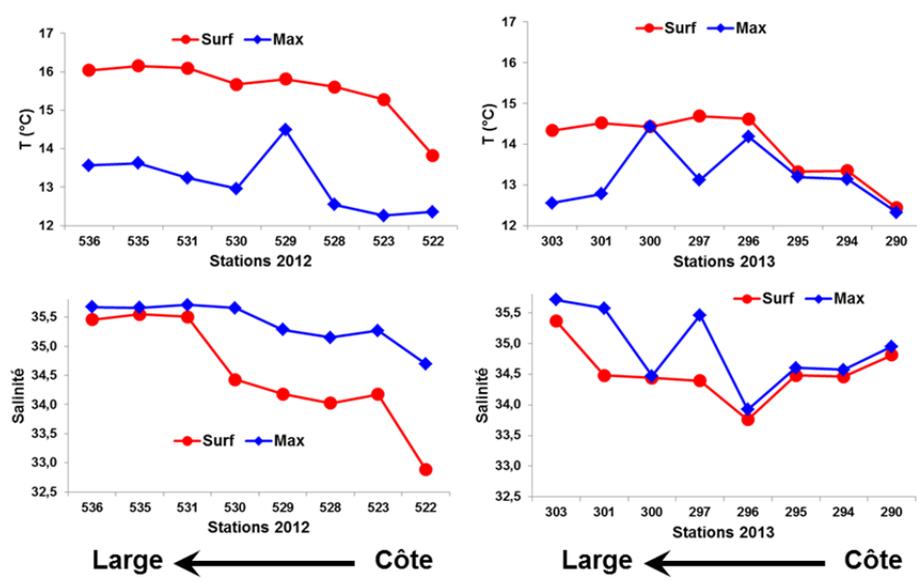


Figure 3 : Structures thermohalines rencontrées en 2012 et 2013 sur la radiale Nord

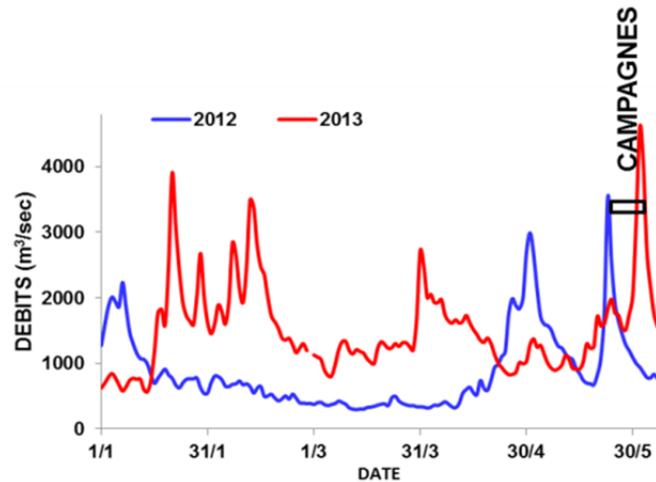


Figure 4 : Débits hivernaux et printaniers de la Gironde.

Globalement, selon l'extension du panache, le gradient côte-large de répartition des nutriments (N et Si) est plus ou moins étendu vers le large (Fig. 5). En 2012, des teneurs élevées d'azote de silicate et de phosphate ne sont observés qu'au débouché immédiat de la Gironde, hormis dans le panache, les eaux de surfaces sont limitées par les 3 éléments ($N < 1 \mu M$; $Si < 2 \mu M$ et $P < 0.1 \mu M$). En 2013, les teneurs en N et Si de la couche homogène de surface sont nettement plus élevées, seules les teneurs en phosphates restent très basses et le phosphate apparaît comme étant le premier élément limitant la production primaire ($N/P \gg 50$).

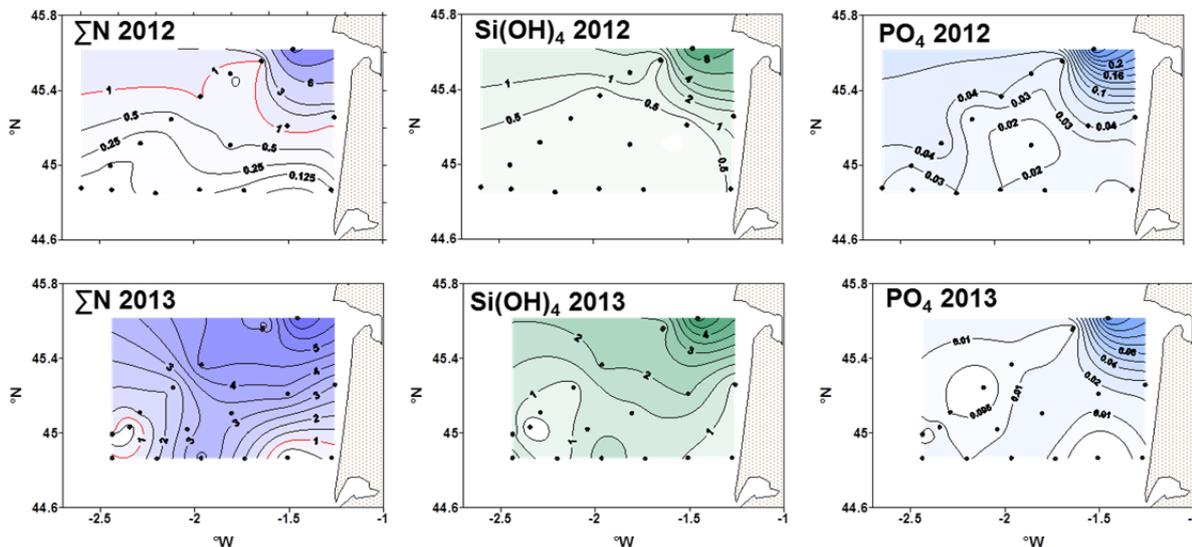


Figure 5 : Distribution des nutriments dans les eaux de surface.

Dans les eaux de la couche homogène de surface, les teneurs en chlorophylles a maximales sont observé pour les deux campagnes dans le panache distal de la Gironde et tendent à diminuer vers le large notamment en 2012. En 2013, du fait du mélange vertical qui s'est opposé à la stratification des eaux on n'observe pas d'accumulation de biomasse végétale au bas de la couche euphotique. Par contre la situation rencontrée en 2012 est totalement différente, la forte stratification des eaux est associé à des forts maximum de chl a ($4 - 6 \mu g / l$) localisés dans la nutricline, au bas de la couche homogène de mélange (Fig. 6). Du fait de la forte stratification des eaux en 2012, on observe quasi systématiquement des maxima important de chl a dans la pycnocline au bas de la couche homogène

de mélange alors qu'ils sont absents en 2013.

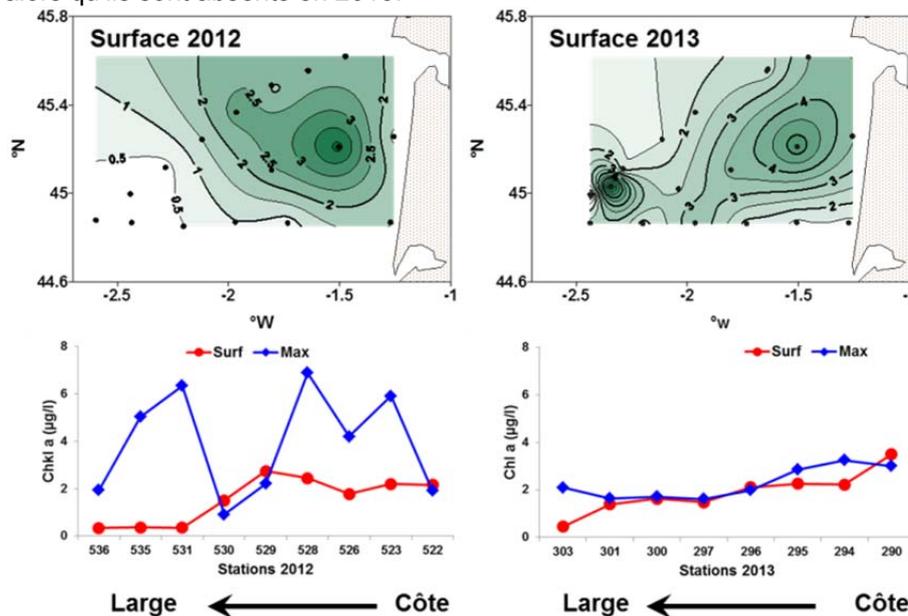


Figure 6 : Distribution de la chlorophylle a au cours des campagnes, dans les eaux de surface (en haut) et sur la « verticale » (radiale Nord en bas)

4. Analyse de la diversité phytoplanctonique

4.1 Diversité phytoplanctonique spatiale par analyse pigmentaire

4.1.1 Structure des populations par classe de taille.

En 2012, dans la couche homogène, les populations phytoplanctoniques sont largement dominées par les formes picoplanctoniques et cette dominance s'accroît de 40 à 75 % de la chlorophylle a au fur et à mesure que l'on s'éloigne des eaux du panache de la Gironde parallèlement à la diminution et à l'épuisement de la réserve nutritive (Fig. 7). Le microphytoplancton n'est bien représenté que dans les eaux les plus riches de panache (35 % de la chl a) et tend à disparaître dans les eaux les plus océaniques (2-13%). Du fait de la forte stratification, les eaux de surfaces ont vu leur réserve nutritive s'épuiser et des maximum profonds de chlorophylle sont présent au niveau de la nutricline. Dans les eaux présentant une forte stratification haline, le phytoplancton est dominé par les formes microplanctoniques (70 % de la biomasse, la situation tendant à s'inverser plus au large ou la stratification est essentiellement thermique, ici le picoplancton représente jusqu'à >60% de la biomasse chlorophyllienne). En 2013, du fait des conditions hydrologiques (retard de la saisonnalité, colonne d'eau non stratifiée) le picoplancton est toujours abondant (25 à 60 % de la biomasse), mais moins bien représenté que l'année précédente, et le gradient côte-large est encore peu marqué. Du fait de la faible stratification de la colonne d'eau, de l'absence de maximum profond de chl a, les populations phytoplanctoniques situées au bas de la couche de mélange ne sont globalement pas différentes de celles observées dans les eaux superficielles en terme de structure de taille.

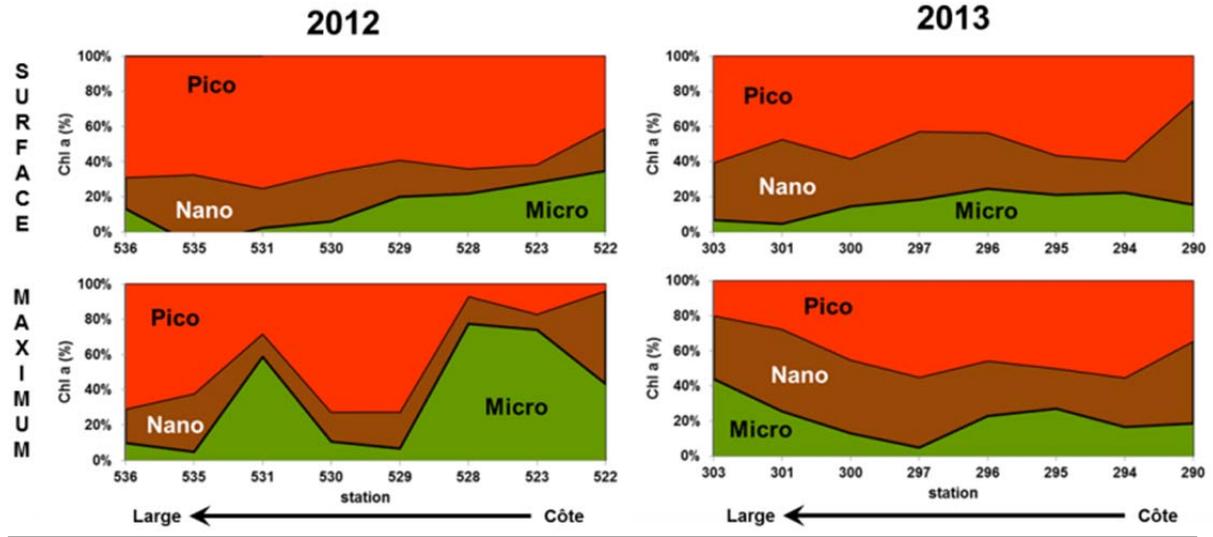


Figure 7 : Structure de taille des populations phytoplanctoniques observées dans les eaux de surface et au maximum de chlorophylle pour les deux campagnes (Pico : picophytoplancton, nano : nanophytoplancton ; micro : microphytoplancton).

4.1.2 Diversité de populations

En 2012, quand les eaux sont fortement stratifiées, on observe dans la couche homogène de surface un gradient côte large nettement marqué avec en particulier un déclin des diatomées (fucoxanthine) et des dinoflagellés (péridine) vers le large ou les populations phytoplanctoniques sont alors dominées par des chlorophycées (chl b), cyanophycées (zea), prasinophycées (pra), prymnésiofycées et nanoflagellés (19-HF) (Fig. 8). Un schéma globalement similaire peut être observé au niveau du maximum profond de chlorophylle, si ce n'est la présence dans les eaux du panache distal présentant une forte stratification haline (stations 528 et 523) d'un bloom particulièrement important de dinoflagellés (la stabilité de la colonne d'eau étant généralement favorable au dinoflagellés) associé à une large dominance des formes microplanctoniques.

En 2013 dans les eaux de surface, du fait des gradients côte-large moins marqués, la distribution longitudinale des biomarqueurs pigmentaires est moins marquée qu'en 2012, avec toutefois une tendance à la régression des diatomées au profit des prymnésiofycées / nanoflagellés. Du fait de la faible stratification de la colonne d'eau les populations phytoplanctoniques ne présentent pas de différences marquées entre la couche homogène de surface et le la pycnocline.

Ces résultats, acquis dans un gradient spatial recouper et confortent ceux que l'on avait précédemment obtenus dans un gradient temporel (Rapport Onema 2013): rôle des limitations nutritives, de la stratification sur structuration des populations phytoplanctoniques et en particulier sur la dominance des formes picophytoplanctoniques.

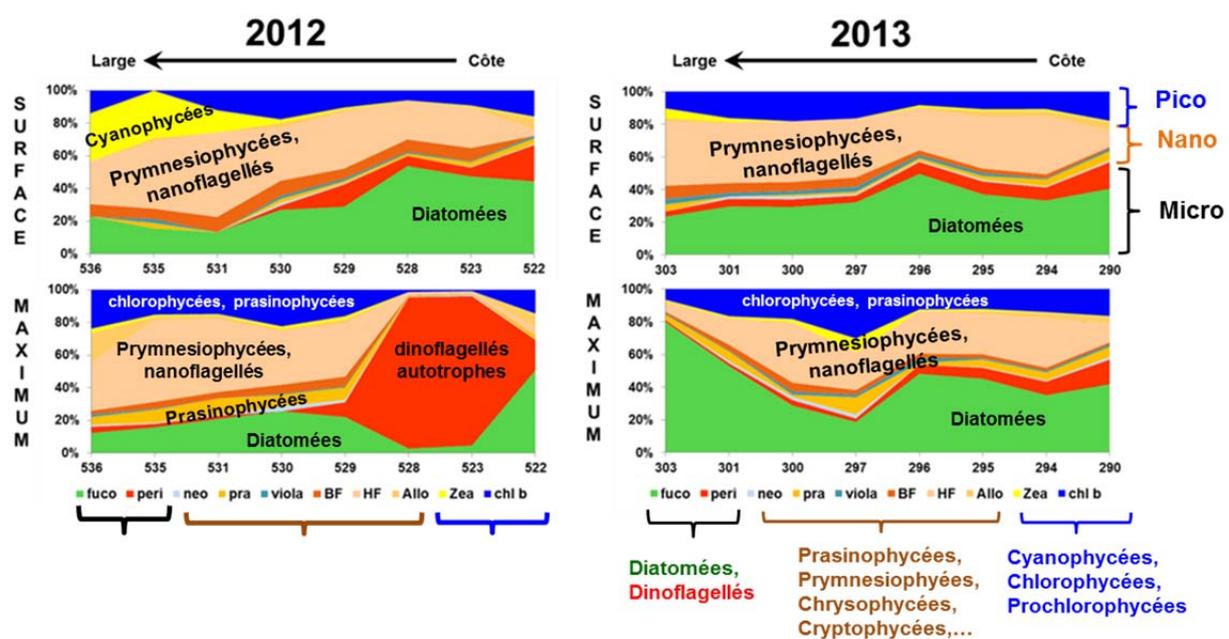


Figure 8 : Distribution des biomarqueurs pigmentaires dans les eaux de la couche homogène de surface et du maximum profond pour les campagnes Pelgas 2012 et 2013.

4.2 Diversité phytoplanctonique spatiale par analyse de metabarcoding

Un range de 1,667-103,614 (moyenne : 41,452 ± 23,705) séquences d'ADN génétiques ont été obtenues pour les échantillons de la campagne Pelgas 2012 et un range de 14,179-136,694 (53,908 ± 21,049) pour la campagne Pelgas 2013. Les séquences des deux campagnes ont été rassemblées dans 132 OTUs (Operational Taxonomic Unit) de phytoplancton (seulement les taxa autotrophes) distinguées sur la base de leur identité (95-100%) avec des séquences de référence de la base PR2. Les OTUs identifiées atteignent la plus part de fois le niveau genre ou de l'espèce de taxa phytoplanctonique connus, pouvant des fois attendre le niveau interspécifique (clade génétique). Ce niveau de profondeur de l'analyse génétique avec un nombre considérable de taxa (OTU) identifiés permet une caractérisation exhaustive de la biodiversité des échantillons considérés, en complément à l'analyse pigmentaire.

4.2.1 Structure des populations par classe de taille.

L'analyse par NMDS (Non Multi-Dimensional Scaling) des données de biodiversité génétiques montre que les communautés micro-, nano-, (Pelgas 2012) picophytoplanctoniques (Pelgas 2013) sont différentes, étant bien séparées dans l'espace définis par l'analyse. Il est de plus évident que les stations se séparent bien le long du gradient environnemental côte-large (Fig. 9). Comme déjà démontré pour l'étude de la variabilité temporelle (Rapport Onema 2013), cette analyse montre donc que les communautés micro-, nano-, (Pelgas 2012) picophytoplanctoniques (Pelgas 2013) sont distinctes l'une de l'autre, et indépendamment structurées dans l'environnement selon des gradients spatiaux.

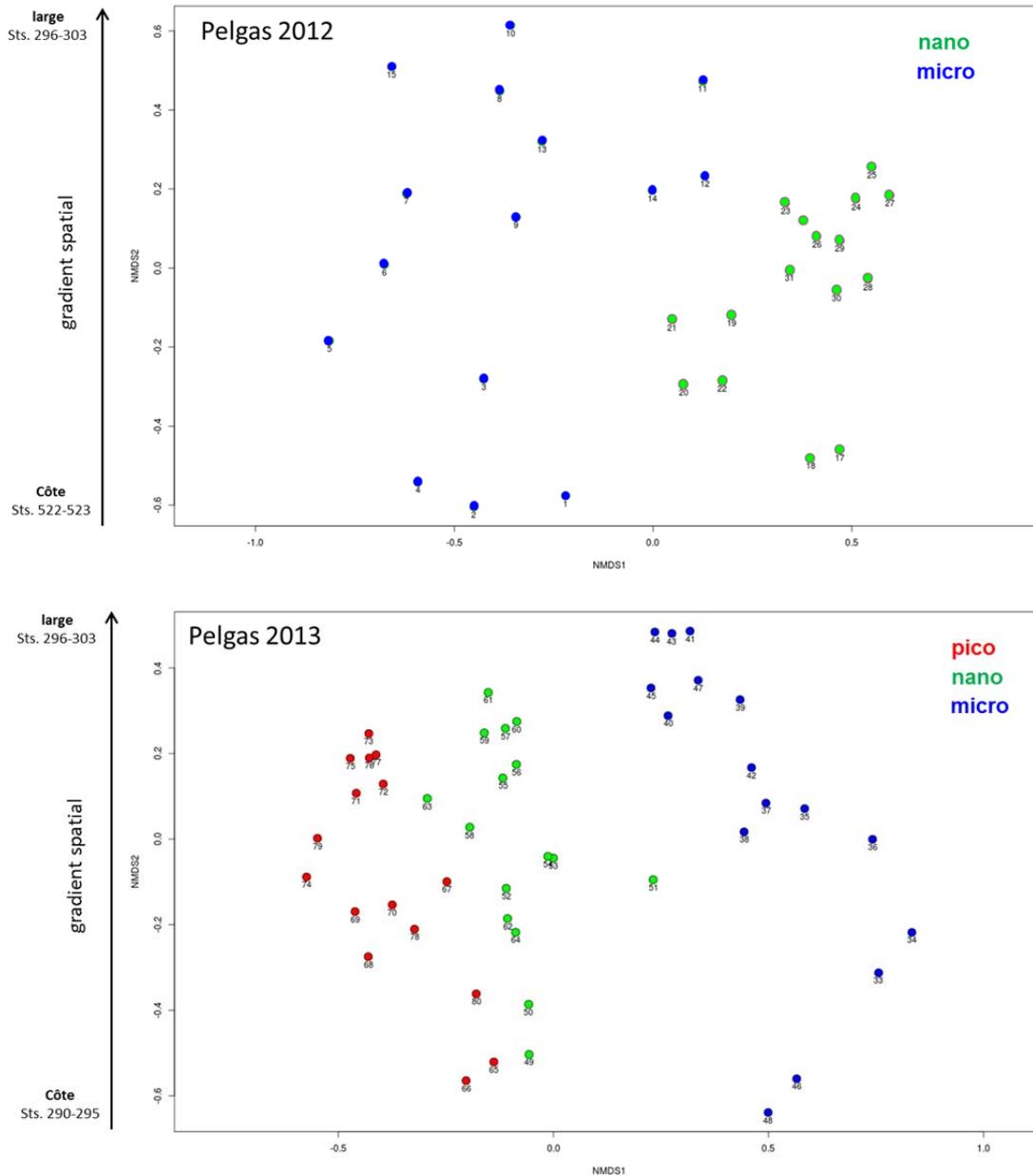


Figure 9 : NMDS (Non Multi-Dimesional Scaling) basés sur l'analyse de la diversité génétiques (metabarcoding) des classe de taille (micro : >20µm, nano : 3-20µm, pico : <0.2µm) des échantillons des campagnes spatiales Pelgas 2012 et Pelgas 2013). Le chiffre en correspondance de chaque point représente le numéro de l'échantillon.

4.2.2 Caractéristiques des populations phytoplanctoniques de différentes classes de taille.

L'importance relative des 132 OTUs identifiés pour les campagnes Pelgas 2012 et 2013 varient le long des panaches analysés en fonction des structures hydrologiques identifiées. Il est possible d'identifier pour chaque classe de taille des OTUs caractéristiques en termes d'abondance de leurs séquences et/ou de leur importance relative au sein de l'échantillon. Lors de la campagne Pelgas 2013 l'importance du groupe des Mamiellophyceae (*Micromonas pusilla*, *Bathycoccus prasinus*, *Ostreococcus*

sp.), une sous-classe de Prasinophyceae, au sein du picoplancton est clairement évidente. Le même patron est évident pour les échantillons analysés pour la variabilité temporelle (campagne Dynapse, Rapport Onema 2013) (Fig. 10).

Mamiellophyceae

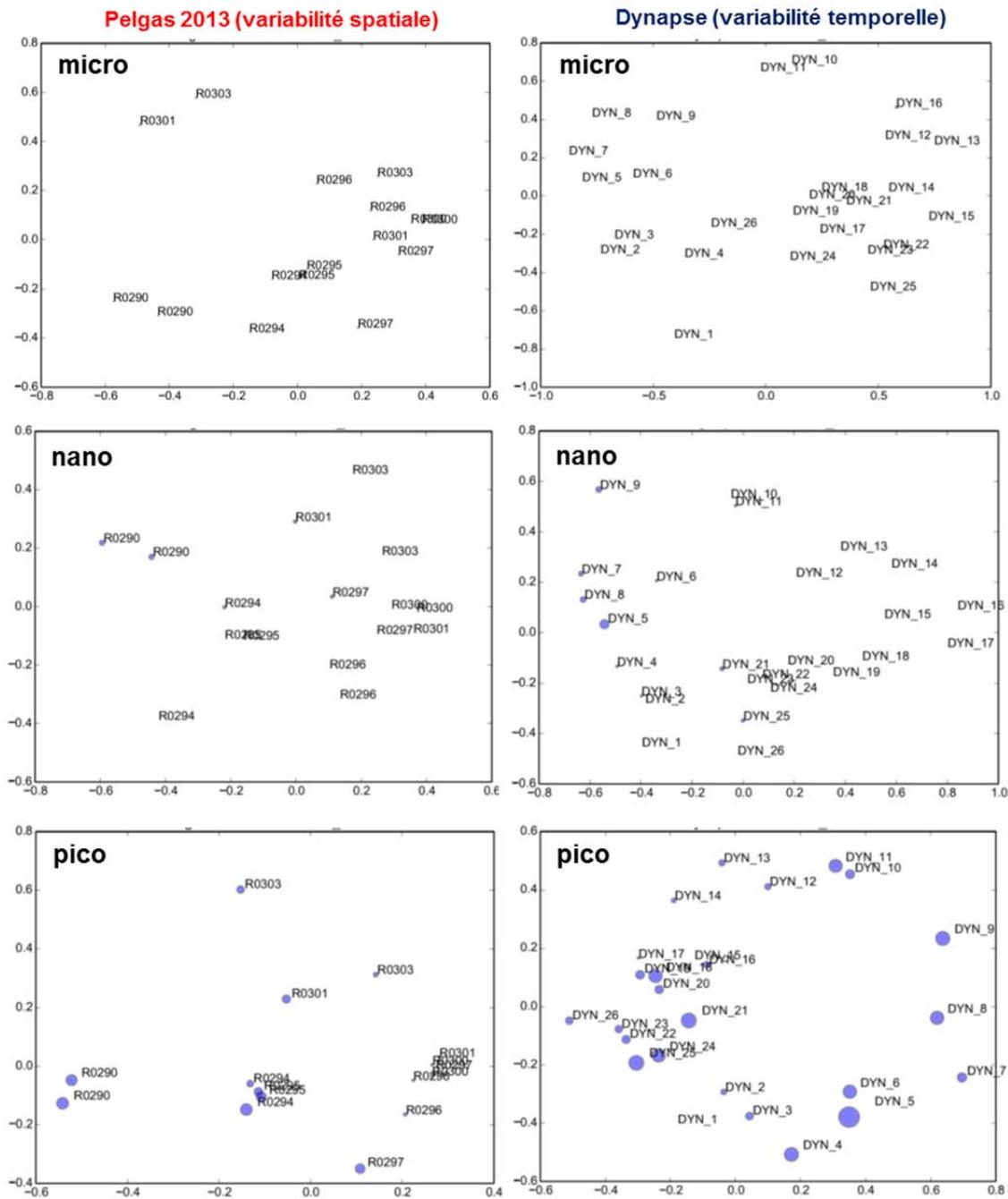


Figure 10: NMDS (Non Multi-Dimensional Scaling) basés sur l'analyse de la diversité génétiques (metabarcoding) des classe de taille (micro : >20µm, nano : 3-20µm, pico : <0.2µm) des échantillons des campagnes Pelgas 2013 et Dynapse. Chaque échantillon est représenté par une étiquette. Le diamètre de chaque cercle représente l'importance relative (%) de la classe de Mamiellophyceae dans l'échantillon correspondant. **A noter que les diamètres des cercles sont plus importants dans le picoplancton.**

5. Recherche d'indicateur des communautés

L'étude sur la diversité (pigmentaire et génétiques) a montré que les communautés micro-, nano-, et pico-planctoniques varient de manière indépendante l'une de l'autre à la fois dans le temps (Rapport Onema 2013) et dans l'espace (présent rapport 2014). En conséquence la recherche d'indicateurs des communautés phytoplanctonique doit tenir compte de cette différenciation structurelle (par classe de taille) des communautés ainsi que de leur variabilité spatio-temporelle en rapport aux conditions environnementales.

Pour la recherche de ces indicateurs une piste possible d'étude pourrait être : i) d'identifier de conditions environnementales, particulières et spécifiques, de la colonne d'eau en rapport aux dimensions spatiales et temporelle, ii) d'identifier pour chaque condition et séparément pour les micro-, nano-, et pico-plancton des pigments caractéristiques (via l'analyse de taxinomie pigmentaire) et de taxa génétiques typiques (OTU) grâce à la résolution taxinomique profonde qui est possible avec les analyses de metabarcoding. Grâce aux analyses effectuées en 2013 et 2014 il a été possible d'identifier dans le temps (campagne Dynapse) et dans l'espace (campagne Pelgas 2012 et 2013), différentes conditions environnementales. Pour chacune de ces conditions des pigments ou de taxa caractérisés génétiquement (OTUs) typiques de chaque fraction de taille ont été identifiés (Tableau 1).

Par exemple au sein des communautés picoplanctoniques l'analyse comparative entre diversité pigmentaire et génétiques (Tableau 1) a mis en évidence une correspondance récurrente au sein picoplancton entre la classe de Mamiellophyceae (*Micromonas pusilla*, *Bathycoccus prasinos*, *Ostreococcus* sp.), et la chl *b* indépendamment des conditions environnementales. La chl *b* est un pigment typique de toutes les algues vertes (Chlorophyta), mais au sein des picoplancton les Mamiellophyceae dominant parmi les algues vertes. La communauté picoplanctoniques pourrait être donc caractérisée par le groupe de Prasinophyceae et par la chl *b* (Tableau 1).

Pour les classes de taille de nano et microplancton, il n'a pas été possible d'identifier une association cohérente et récurrente entre OTU et pigments. Cependant une association être pigments et classe phytoplanctoniques (diatomées/dinoflagellés) est évidente.

Situation / localisation	Campagne/ Périodes/	Stratification	Statut nutritif	Structure de taille moyenne	Chl a (µg/l)	Biomarqueurs pigmentaires remarquables	Taxa caractéristiques identifiés par metabarcoding (OTU) *Taxon non identifiable en microscopie optique
Habitat côtier fin hiver	Dynapse 2012 (Mars-Avril)	Colonne d'eau non stratifiée	P- N+ Si+	Pico : 41 % Nano : 42 % Micro : 17%	3-6	Pico : Chl b, 19-HF, Allo Nano : Fuco 19-HF Micro : Fuco	Pico: Mamiellophyceae (<i>Micromonas pusilla</i> *) Nano: Primnesiophyceae (<i>Phaeocystis globosa</i> *) + diatomées (<i>Thalassiosira oceanica</i> *, <i>Chaetoceros</i> spp.) + Cryptophyceae Micro: dinoflagellés (<i>Gonyaulax spinifera</i> , <i>Alexandrium margalefi</i>) + diatomées (<i>Thalassiosira</i> spp., <i>Rhizosolenia</i> spp.)
Habitat côtier printemps	Dynapse 2012 (Avril-Mai)	Colonne d'eau non stratifiée	Pulse nutriments	Micro : 56%-86% Pico: 26 % Nano: 18 %	10	Pico Chl b, Allo Nano : Fuco Micro : Fuco, Chl C2	Pico: Mamiellophyceae (<i>Micromonas pusilla</i> *, <i>Bathycoccus prasinos</i> *, <i>Ostreococcus</i> sp.*) Nano: dinoflagellés (<i>Heterocapsa</i> sp.) + diatomées (<i>Cerataulina pelagica</i>) Micro: dinoflagellés (<i>Gyrodinium</i> sp.) diatomées (<i>Cerataulina pelagica</i>)
Habitat côtier été	Dynapse 2012 (Mai-Juillet)	Colonne d'eau non stratifiée	N- P- Si+	Successions Micro : 39% Nano : 32% Pico : 29 %	2-5	Pico : 19-HF, Chl b, Pras Nano : Fuco, Péri, 19-HF Micro : Fuco, Péri	Pico: Mamiellophyceae (<i>Micromonas pusilla</i> *) Nano: dinoflagellés (<i>Heterocapsa</i> sp.) Micro: dinoflagellés (<i>Gyrodinium</i> sp.)
Couche de surface (Plateau côtier-large)	Pelgas 2013 (st. 290-297)	Colonne d'eau non stratifiée	N+ Si+ P-	Pico : 46% Nano : 33% Micro : 21 %	2-3	Pico : 19-HF, Chl b, Pras, Nano : Fuco, BF Micro : Fuco, Péri	Pico: Mamiellophyceae (<i>Micromonas pusilla</i> *, <i>Bathycoccus prasinos</i> *, <i>Ostreococcus</i> sp.*) Nano: dinoflagellés indéterminés Micro: dinoflagellés (<i>Ceratium fusus</i>) + diatomées (Coscinodiscophyceae)
Couche de surface (Plateau côtier)	Pelgas 2012 (st. 522-529)	Stratification haline	N- Si- P-	Pico : 56% Micro : 26% Nano : 18%	2	Pico : 19-HF, Chl b, Nano : Fuco, 19-HF Micro : Fuco, Péri	Pico: données non disponibles Nano: dinoflagellés (<i>Biecheleria</i> sp*, <i>Suessiales</i> *, <i>Scrippsiella</i> sp.) Micro: (<i>Biecheleria</i> sp*, <i>Ceratium fusus</i> , <i>Gyrodinium</i> , <i>Gonyaulax verior</i> *)
Couche de surface (Plateau large)	Pelgas 2012 (st. 530-536)	Stratification thermique	N- Si- P-	Pico : 68% Nano : 29% Micro : 3%	< 0.5	Pico : 19-HF, Chl b, Zéa Nano : 19-HF, Fuco Micro : Fuco	Pico: données non disponibles Nano: dinoflagellés (<i>Prorocentrum</i>) + diatomées (<i>Chaetoceros</i> sp.) + Primnesiophyceae + Dictyochophyceae Micro: Cryptophyceae + dinoflagellés (<i>Suessiales</i> *, <i>Prorocentrum</i> sp., <i>Ceratium hexacantum</i>)
Maximum profondeur (DCM, Plateau côtier)	Pelgas 2012 (st. 522-529)	Stratification haline	nutricline	Micro : 50%-77% Nano : 25 % Pico : 25%	6	Pico : chl b, 19-HF, Allo Nano : Péri, Fuco Micro : Péri, Fuco	Pico: données non disponibles Nano: dinoflagellés (<i>Suessiales</i> *) Micro: dinoflagellés (<i>Biecheleria</i> sp.*)
Maximum profondeur (DCM, Plateau Large)	Pelgas 2012 (530-536)	Stratification thermique	nutricline	Pico : 58% Nano : 21 % Micro : 21%	5-6	Pico : 19-HF, Chl b, Pras Nano : 19-HF, Fuco Micro : 19-HF, Fuco	Pico: données non disponibles Nano: diatomées (<i>Ditylum brightwellii</i> , <i>Chaetoceros</i> sp.) Micro: dinoflagellés (<i>Suessiales</i> *, <i>Gonyaulax spinifera</i> .) + Primesiophyceae (<i>Isochrysidales</i> *)

Tableau 1 : Analyse combinée entre diversité pigmentaire et génétique pour les communautés du micro-, nano- et picoplancton dans différentes conditions environnementales.

6. Conclusions et perspectives

Les données génétiques et de taxinomie pigmentaires montrent une cohérence pour les analyses de diversité spatiale effectuées en 2013 et confirme les premières conclusions issu des analyses de variabilité temporelle effectuées en 2012 (Rapport Onema).

En particulier pour la classe du picophytoplancton, il a été mis en évidence une relation récurrente, dans l'espace et dans le temps et indépendamment des conditions environnementales, entre les données de la classe de Mamiellophyceae et en particulier de trois taxa (*Micromonas pusilla*, *Bathycoccus prasinus*, *Ostreococcus* sp.) et la chl *b*, un pigment caractéristique de ce groupe. Pour les autres classes la corrélation entre données génétiques et biodiversité pigmentaire se limite au niveau taxinomique des classes, il n'a pas été possible d'associer un pigment à un OTU en particulier, mais plutôt à la classe d'appartenance de cet OTU (dinoflagellés/diatomées).

L'importance relative toujours plus élevée au sein du picophytoplancton que dans le nano- et microphytoplancton des Mamiellophyceae et de la chl *b* est une piste de recherche prometteuse pour la définition d'un indicateur au sein des communautés picophytoplanctoniques. Il reste encore à vérifier si la variabilité spatio-temporelle des Mamiellophyceae et de la chl *b* est représentative des communautés picophytoplanctoniques dans leur intégralité, en termes de richesse spécifique et/ou des patrons spatio-temporels d'abondance.

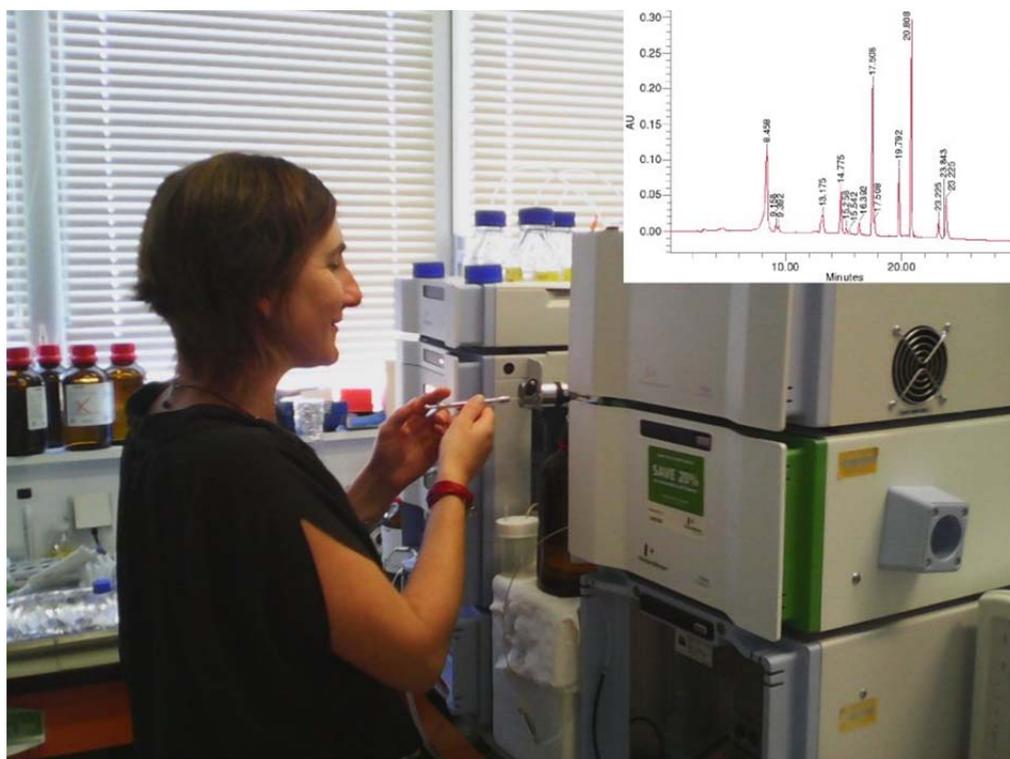
En 2015 les recherches se concentreront sur la vérification de l'hypothèse que la variabilité des Mamiellophyceae et de la chl *b* sont un bon représentant de la variabilité du picoplancton. Des analyses statistiques appropriées sont envisagées pour atteindre cet objectif et possiblement arriver à la proposition d'un indicateur de la communauté picophytoplanctonique.

Luis LAMPERT

Décembre 2014 R.INT.DIR ODE/DYNECO/PELAGOS 2014-06

ifremer

Test d'un Indice de composition pigmentaire pour les secteurs Atlantique et Manche (DCE)



Chaîne d'analyses pigmentaires par HPLC - Dyneco/Pélagos

SOMMAIRE

1.- INTRODUCTION	1
1.1. <i>Eutrophisation-dystrophie</i>	<i>1</i>
1.2. <i>Métriques.....</i>	<i>2</i>
1.3. <i>Phytoplancton et indicateurs</i>	<i>3</i>
1.4. <i>Indice de composition</i>	<i>4</i>
1.5. <i>Chémotaxonomie phytoplanctonique</i>	<i>5</i>
1.6. <i>Peut-on utiliser les pigments dans un Indice de composition ?</i>	<i>8</i>
2.- METHODES.....	10
2.1. <i>Calcul des indices de similarité.....</i>	<i>10</i>
2.2. <i>Zone d'études.....</i>	<i>11</i>
2.3. <i>Choix des profils pigmentaires</i>	<i>13</i>
2.4. <i>Classements hiérarchiques.....</i>	<i>13</i>
3.- RESULTATS	14
3.1. <i>Indice de composition atlantique</i>	<i>14</i>
3.1.1. <i>Vision du réseau côtier R2.....</i>	<i>14</i>
3.1.2. <i>Radiale Gironde G10-G13.....</i>	<i>16</i>
3.1.3. <i>Radiale Gironde G10-G13 plus G15.....</i>	<i>18</i>
3.1.4. <i>Réseau R1</i>	<i>20</i>
3.2. <i>Indice de composition Manche.....</i>	<i>26</i>
3.2.1. <i>Boulogne-sur-Mer 27 avril 2012</i>	<i>26</i>
3.2.2. <i>Boulogne-sur-Mer 31 avril 2012</i>	<i>29</i>
4- DISCUSSION.....	32
4.1. <i>Plateau Continental Atlantique Français.....</i>	<i>32</i>
4.2. <i>Manche orientale</i>	<i>33</i>
4.3. <i>Choix des indicateurs de composition</i>	<i>33</i>
4.4. <i>Point « référence »</i>	<i>34</i>
4.5. <i>Sensibilité à la matrice pigmentaire.....</i>	<i>35</i>
4.6. <i>Pressions</i>	<i>36</i>
4.7. <i>Grille de niveaux.....</i>	<i>37</i>
5- CONCLUSION.....	38
BIBLIOGRAPHIE	40
ANNEXES	46
I. <i>Abréviations utilisées</i>	
II. <i>Campagnes marines</i>	
III. <i>Tableau A1</i>	
IV. <i>Tableau A2</i>	

1.- INTRODUCTION

La Directive Cadre de l'eau (DCE) européenne 2000/60/EC vise le maintien et l'amélioration de la qualité des masses d'eau continentales et marines dans la communauté européenne par la création d'un cadre légal commun (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=OJ:L:2000:327:TOC>).

1.1- Eutrophisation - dystrophie

Etymologiquement, « eutrophie » signifie « état normal du développement par l'alimentation » et donc l'eutrophisation caractérise le processus par lequel une masse d'eau devient plus productive. Mais cette augmentation de la productivité des eaux par le biais de l'augmentation de la biomasse phytoplanctonique provoque depuis les années 1960 un impact visible sur les eaux continentales (Carlson 1977 ; Dillon et Vollenweider 1974), et marines (Ryther et Dunstan 1971 ; Lohrenz et al. 1999). Par abus de langage, l'eutrophisation, qui est le processus naturel d'enrichissement des eaux par des nutriments, a été utilisée pour indiquer l'enrichissement excessif des eaux par les effluents urbains et agricoles qui conduisent à des pollutions ou des perturbations des écosystèmes. Le mot adéquat est dystrophie ou dystrophisation, mais nous parlerons d'eutrophisation pour les phénomènes de dystrophie (Ramade 1993) car il est passé dans la législation internationale sous cette dénomination.

Un impact indésirable pour le milieu peut être l'apport de nutriments *via* les rejets des villes côtières, provoquant une augmentation de la biomasse des producteurs primaires. Une perturbation indésirable est une perturbation de l'écosystème marin qui dégrade sensiblement la santé, ou menace durablement l'utilisation de cet écosystème par l'homme (Tett et al. 2007). Une eutrophisation des eaux est, sous cet angle, une perturbation indésirable.

La mise en place des législations concernant la qualité des eaux a conduit à chercher un consensus sur les définitions. Nixon (Nixon 1995) propose pour eutrophisation : « augmentation du taux d'apports de matière organique dans un écosystème », ce qui laisse beaucoup de marge d'interprétation dans une cour de justice. Plus récemment, l'eutrophisation a pris une signification scientifique et légale et elle est ainsi a) inscrite sur diverses directives européennes, b) dans une décision de la cour européenne de justice en 2004 (dans Ferreira et al. 2010) et c) dans les définitions de la convention OSPAR : « *Eutrophisation est le processus d'enrichissement de l'eau en éléments nutritifs provoquant un développement accéléré des algues et des formes supérieures de vie végétale pour aboutir à une perturbation indésirable de l'équilibre des organismes présents dans l'eau et de la*

qualité de l'eau elle-même, et fait donc référence aux effets indésirables résultant de l'enrichissement en éléments nutritifs d'origine anthropique ».

L'eutrophisation est donc le processus d'enrichissement des eaux par des nutriments, et tout particulièrement par des composés en azote et phosphore, conduisant à : l'augmentation de la croissance, de la biomasse et de la production primaire des algues ; aux changements dans le bilan et composition des organismes, ainsi qu'à la dégradation de la qualité des eaux.

1.2- Métriques

Dans le cadre du GIG du Nord-est Atlantique (NEA GIG) trois métriques indicateur biologique ont été discutées pour chacun des trois indices : (i) pour l'indice de biomasse, le percentile 90 (P90) de la chlorophylle_a, (ii) pour l'indice d'abondance, la proportion d'efflorescences, soit de toutes les espèces, soit de *Phaeocystis* spp. La chlorophylle_a a été largement utilisée comme un estimateur de la biomasse phytoplanctonique dans la majorité des programmes de surveillance, ainsi que l'indicateur de l'enrichissement en nutriments (Gowen, Tett, et Jones 1992 ; Painting et al. 2005). Tous les états membres du NEA se sont accordés pour l'utilisation de la chlorophylle_a avec la métrique P90, aboutissant à la Décision de la Commission 2088/915/EC du 30 Octobre 2008.

L'utilisation du pourcentage d'efflorescences (tous taxons) ou de *Phaeocystis* spp. n'a pas été retenue par tous les états concernés pour des raisons diverses (en particulier pour *Phaeocystis*, qui présente une distribution géographique non homogène).

Au niveau des états membres du NEA, le consensus s'est fait rapidement pour l'utilisation du percentile 90, mais ce n'est pas le cas dans d'autres régions européennes, par exemple en Méditerranée, où il y a eu des propositions d'utilisation de la moyenne géométrique annuelle et de la moyenne arithmétique : elles peuvent être utilisées sur des mesures de surface ou de surface intégrée à toute la colonne d'eau. Dans le cas de la moyenne géométrique les données sont intégrées sur une année, tandis que pour le P90 elles le sont sur 5 à 6 années (Décision de la Commission 2088/915/EC du 30 Octobre 2008).

Bien que des études montrent une relation positive entre la chlorophylle et l'augmentation de nutriments, d'autres auteurs comme (J. H. Andersen, Schlüter, et Ærtebjerg 2006) recommandent que les mesures de chlorophylle soient interprétées pour ce qu'elles sont : la concentration en chlorophylle et rien d'autre. Elles ne sont ni des mesures de biomasse, ni des indicateurs du niveau des éléments nutritifs ou des taux de croissance. Pour l'évaluation de l'état d'eutrophisation, ces auteurs recommandent des mesures de production primaire et non de chlorophylle.

En effet, la biomasse en carbone peut connaître des écarts significatifs par rapport aux concentrations en chlorophylle car les rapports C:Chla varient en fonction de l'éclairement, la phase de croissance des peuplements autotrophes et le niveau de nutriments disponibles (Cloern, Grenz, et Videgar-Lucas 1995 ; Geider, MacIntyre, et Kana 1997). La biomasse peut connaître en outre des variations en fonction des courants ou par le contrôle des brouteurs (Painting et al. 2005), donnant ainsi une fausse image de la production primaire, qui elle, est la seule représentative de la dynamique des peuplements. Dans l'approche pigmentaire, les

descripteurs ne prennent pas en compte les peuplements hétérotrophes qui peuvent être dominants dans les eaux eutrophes et eutrophisées côtières. Pour pallier à ce problème, des mesures de biovolumes des cellules phytoplanctoniques peuvent être réalisées en même temps que les dénombrements. Ce travail, très coûteux en temps, n'est pas exempt d'erreurs car les relations entre volume cytoplasmique et contenu en carbone ou azote ne sont pas constantes non plus. C'est cependant ce qui s'approche le plus de la vraie biomasse phytoplanctonique car ces mesures de biovolumes peuvent intégrer la composante hétérotrophe.

Concernant les communautés phytoplanctoniques des eaux de transition, elles sont caractérisées par une forte hétérogénéité spatio-temporelle (Devlin et al. 2009 ; Henriksen 2009), ce qui rend difficile le développement d'indicateurs relatifs à la composition taxonomique (Vadrucci, Cabrini, et Basset 2007).

1.3- Phytoplancton et indicateurs

A cause de de son rôle prépondérant dans la chaîne trophique et de son impact dans la qualité des eaux, le phytoplancton a souvent été utilisé comme indicateur du niveau de l'état d'eutrophisation (Clean Water Act, PL 92-500, 1972 ; Bricker et al. 2008 ; Marine Strategy Framework Directive-MSFD, 2008/56/EC ; Ferreira et al. 2011 ; Convention Oslo-Paris [OSPAR] et Convention Helsinki [HELCOM]) ou comme une réponse aux conditions environnementales (R. B. Domingues, Barbosa, et Galvão 2008 ; Devlin et al. 2009 ; Spatharis et Tsirtsis 2010).

L'étude de la structure des communautés phytoplanctoniques a souvent été caractérisée par des indicateurs écologiques, dérivés de la théorie de l'information tels que la diversité de Shannon, celle de Simpson ou la richesse spécifique (Washington 1984 ; Weis et al. 2007). Ils sont faciles à mettre en place mais nécessitent des dénombrements et identifications cellulaires avec un haut niveau d'expertise (Magurran 2004 ; Spatharis et al. 2011 ; Legendre et Legendre 1998 ; Borcard, Guillet, et Legendre 2011) avec un niveau d'incertitude de 15 à 50% dans le calcul des biomasses (Rott 1981 ; Lauridsen, Schlüter, et Johansson 2011). Malgré les recherches orientées dans ce sens, il n'existe toujours pas de consensus quant à l'utilité des indices écologiques dans l'évaluation de l'eutrophisation (Danilov et Ekelund 1999). Mieux placés pour détecter les changements dans la structure des communautés, les indices de similarité connaissent un intérêt croissant (Danilov et Ekelund 1999 ; Arhonditsis, Karydis, et Tsirtsis 2003 ; Sherrard, Nimmo, et Llewellyn 2006).

D'autres méthodes utilisent la diversité fonctionnelle, la taille des cellules, leur abondance par groupe fonctionnel et leur productivité (Mouillot et al. 2006). Cet auteur considère la productivité et l'abondance spécifique comme les paramètres les plus appropriés pour étudier les variations dans la structure des communautés.

Dans le cadre de la DCE, l'évaluation de l'état écologique d'une masse d'eau par le phytoplancton passe par les indices de biomasse, abondance et composition (R. B.

Domingues, Barbosa, et Galvão 2008). Une description critique des méthodes est disponible dans des travaux récents (Ferreira et al. 2011 ; Garmendia et al. 2013).

La complexité et le temps nécessaire pour les dénombrements phytoplanctoniques ont conduit à un manque d'indicateurs qui intègre la composition des communautés (C. M. Domingues et al. 2008 ; Henriksen 2009; Devlin et al. 2009 ; Spatharis et Tsirtsis 2010 ; Birk et al. 2012). De plus, la forte variabilité de ces communautés, leur complexité structurelle et la difficulté à définir les conditions de référence et les limites entre les différents niveaux de qualité, ont empêché la mise en place des indicateurs pertinents.

1.4- Indice de composition

La DCE exige que les futures évaluations de la qualité biologique comprennent aussi des indicateurs qui prennent en compte la **composition** phytoplanctonique à cause de la réactivité du phytoplancton aux changements de l'environnement. Cependant, se pose le problème de la définition d'espèces indicatrices dans des systèmes fermés ou semi-fermés tels que les abers ou les baies, où un gradient de pression suffisant pour établir des relations empiriques entre la pression et l'indicateur à l'intérieur du système fait souvent défaut. De plus, un taxon peut réagir de façon similaire en réponse à une eutrophisation d'origine anthropique (rejet des eaux urbaines) ou naturelle (pluies, courants) (Devlin et al. 2007). Il s'ajoute une difficulté supplémentaire avec la superposition de phénomènes liés aux changements climatiques globaux, qui agissent comme une pression externe supplémentaire difficile à prévoir et à séparer des pressions locales (Wilby et al. 2006).

Les successions phytoplanctoniques et leur composition suivent l'évolution des conditions environnementales des écosystèmes, où les nutriments (particulièrement nitrate, phosphate et silicate) jouent un rôle majeur dans leur structuration. Ces changements saisonniers sont parfois de grande ampleur comme par exemple l'apparition des efflorescences de *Phaeocystis* spp. dans la Manche-Mer du Nord au printemps de chaque année, où la production de mousses et la diminution de l'oxygène créent des graves perturbations. Mais ces changements peuvent être moins visibles, comme par exemple le remplacement des diatomées par des dinoflagellés (Hernández-Fariñas et al. 2013) ou par des cellules du nano- ou picophytoplancton telles que les cyanophycées ou haptophycées qui sont mieux adaptées aux conditions oligotrophes (Luis Lampert 2001). A tout apport de nutriments suivra un développement rapide d'espèces opportunistes à croissance rapide, qui peuvent générer une augmentation de la biomasse autotrophe avec un impact négatif sur l'environnement.

Divers auteurs ont déjà présenté des propositions d'indices écologiques et de composition (Tableau A1 en annexes).

Dans le cadre de la convention IFREMER/ONEMA 2013-2015 sont prévus également des travaux concernant la mise en place des Indices de composition avec des nouvelles technologies (pigments, cytométrie, fluorimétrie *in vivo*, génétique). Une synthèse des travaux réalisés sur l'Indice de composition depuis 2010 sont disponibles dans le chapitre 10 du rapport Belin, Lamoureux, et Soudant (2014).

La relation qui peut exister entre la composition des communautés phytoplanctoniques et les apports de nutriments d'origine anthropique a été étudiée sur un nombre restreint de zones : Estuaire de la Neuse (Rothenberger, Burkholder, et Wentworth 2009), Mer Baltique (Sagert et al. 2005 ; Jaanus et al. 2009) et Méditerranée Nord-est (Spatharis et al. 2007). Malgré les efforts développés pour comprendre l'effet de l'eutrophisation sur la structure des communautés, aucune corrélation claire n'a pas pu être établie entre les nutriments et l'abondance des espèces (Nielsen et al. 2003 ; Cloern et al. 2005 ; Yunev et al. 2007 ; R. B. Domingues, Barbosa, et Galvão 2008). En conséquence, pour les eaux marines, il y a très peu de méthodes en conformité avec la DCE qui tiennent compte de la composition (Devlin et al. 2007 ; Devlin et al. 2009).

Les études concernant le développement d'indicateurs de composition à partir de données de diversité fonctionnelle (et non spécifique) ont été menées sur la classification des communautés par classe de tailles au sens donné par Sieburth (Sieburth, Smetacek, et Lenz 1978) : trois grands groupes se partageant la communauté planctonique, le microplancton (20 à 200 μm), le nanoplancton (2 à 20 μm) et le picoplancton (0.2 à 2 μm). Différents facteurs peuvent expliquer la structuration du phytoplancton par classe de tailles, entre autres la disponibilité des nutriments, les mélanges verticaux, la profondeur ou les constantes d'assimilation (Helbling, Villafañe, et Holm-Hansen 1991 ; Gaedke 1992 ; Tamigneaux et al. 1999 ; Gin, Lin, et Zhang 2000 ; Rodríguez et al. 2001; Serra et al. 2003).

Cette vision des communautés agrégées en classes de taille peut trouver son équivalent dans la chémotaxonomie pigmentaire (Vidussi et al. 2001). Il peut alors être envisagé de bâtir un indice de composition, non sur la composition spécifique mais sur la composition fonctionnelle par classe de taille. Si la chémotaxonomie fait perdre deux à trois niveaux hiérarchiques dans la table de classifications (genre et famille), il est toutefois envisageable d'utiliser cette méthode comme traceur des apports anthropiques.

1.5. Chémotaxonomie phytoplanctonique

Définition : Classification et identification des organismes phytoplanctoniques, en fonction de ses différences et ses similitudes, par leur composition biochimique. Les composés étudiés dans la plupart des cas sont des pigments (chlorophylles, caroténoïdes et xanthophylles), mais on pourrait envisager également d'autres marqueurs biochimiques.

L'amélioration des techniques de chromatographie par chromatographie liquide (HPLC) a permis d'augmenter considérablement le nombre de pigments extraits d'un échantillon d'eau de mer filtré (Zapata, Rodríguez, et Garrido 2000 ; Van Heukelem et Thomas 2001). Grâce aux analyses pigmentaires effectuées sur des souches de laboratoire et lors des blooms en mer, nous disposons aujourd'hui d'un nombre considérable de données permettant d'aborder la dynamique et la biodiversité fonctionnelle du phytoplancton par leurs pigments. Le classement du phytoplancton est abordé par des **classes** plus ou moins homogènes d'un point de vue pigmentaire, mais qui restent proches des grands groupes phytoplanctoniques tels que diatomées, dinoflagellés, haptophytes, cryptophytes,

prasinophycées, chlorophycées et bien d'autres dans les domaines marin et d'eau douce (Jeffrey et al. 1997; Roy 2011).

Biomarqueurs : Jeffrey (Jeffrey 1961 ; Jeffrey 1968) a suggéré pour la première fois l'utilisation des pigments pour l'étude taxonomique du phytoplancton en utilisant la chromatographie à couche mince (TLC). Liaaen-Jensen (1979) préconise l'utilisation des chlorophylles et caroténoïdes (pigments liposolubles) pour l'obtention d'une information relative aux classes algales. Les études de la structure des communautés phytoplanctoniques qui ont suivi ont intégré davantage l'utilisation des pigments (TLC et HPLC) pour expliquer leurs processus dans la mer. Sans recourir aux longs comptages microscopiques, il devenait possible d'avoir une information globale et synthétique de la structure des communautés. L'identification de nouveaux pigments à partir des souches algales isolés ont mis en évidence le rapport entre groupes phytoplanctoniques et pigments. Il a été alors possible de définir des **biomarqueurs** capables de représenter des catégories taxonomiques ou fonctionnelles qui soient suffisamment spécifiques et discriminants d'une classe algale. Ainsi l'identification des nouveaux pigments a mis en évidence des nouveaux groupes phytoplanctoniques, dont nous pouvons citer le prasinoxanthine pour les prasinophycées, la 19BF pour les pélagophycées (Robert A. Andersen et al. 1993), la DV-chla pour les prochlorophycées. Dans le tableau 1 sont indiqués les principaux pigments biomarqueurs et leur signification taxonomique.

Tableau 1 : Pigments chlorophylliens et caroténoïdes et leur signification taxonomique. En gras sont indiqués les biomarqueurs utilisés. (Extrait des tableaux 4.1 dans Jeffrey, 1997).

PIGMENT	MESSAGE TAXONOMIQUE
Chlorophylles	
Chla	Biomasse autotrophe totale moins prochlorophytes
DV-chla	Prochlorophytes
Chlb	Algues vertes : chlorophycées, prasinophycées, euglenophycées
DV-chlb	Prochlorophytes
Chlc totale	Chromophycées
Chlc1	Diatomées, qqs prymnésiohycées, raphidophycées
Chlc2	Diatomées, dinoflagellés, prymnésiohycées, raphidophycées, cryptophycées
Chlc3	Qqs prymnesiohycées, une chrysophycée, plusieurs dinoflagellés et diatomées
Caroténoïdes	
Allo	Cryptophycées
19BF	Qqs prymnesiohycées, pélagophycées, chrysophycées , dinoflagellés
Fuco	Diatomées , prymnesiohycées, chrysophycées, raphidophycées, qqs dinoflagellés
19HF	Prymnesiohycées , dinoflagellés
Lut	Algues vertes : chlorophycées , prasinophycées
Neo	Algues vertes : chlorophycées, prasinophycées , euglenophycées
Peri	Dinoflagellés
Prasi	Qqs prasinophycées
Sipho	Plusieurs prasinophycées, une euglenophycée
Viola	Algues vertes : chlorophycées, prasinophycées, eustigmatophycées
Zea	Cyanophycées , prochlorophycées, rhodophycées, chlorophycées, eustigmatophycées
Dino	Dinoflagellés
DD	Diatomées, dinoflagellés, prymnésiohycées, chrysophycées, raphidophycées, euglenophycées

Les trois méthodes chémotaxonomiques les plus répandues depuis une dizaine d'années et bases sur les rapports pigmentaires sont : **La méthode DP** (Diagnostic Pigments) (Claustre et al. 1994; Claustre et Marty 1995; Cailliau, Claustre, et Giannino 1997; Peeken 1997; R. A. Andersen et al. 1996; Barlow et al. 1993), **les régressions multiples** (Gieskes et al. 1988; Gieskes et Kraay 1983; Barlow et al. 1993) et finalement, **la méthode CHEMTAX** (CHEMical TAXonomy) (M. D. Mackey et al. 1996; Wright et al. 1996; D. J. Mackey et al. 1998; Schlüter et al. 2000; Roy 2011). Toutes ces méthodes se basent sur l'utilisation et l'ajustement des rapports pigmentaires [Chla : pigment biomarqueur] par rapport à la matrice de pigments analysés sur les échantillons (tableau 2).

Tableau 2 : Quelques exemples de valeurs de rapports [chl_a : biomarqueur] trouvés dans la littérature.

Biomarqueur	Chla/biomarqueur	Classe algale	Références
Chlb	0.7 – 3	Algues vertes	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11
19HF	0.7 – 5.1	Prymnésiophycées	1, 2, 3, 7, 9, 10, 11
19BF	0.9 – 3.9	Pélagophycées/chrysophycées	1, 11
Fuco	1.2 – 2.3	Diatomées	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
Peri	1.4 – 2.5	Dinoflagellés	1, 2, 3, 4, 5, 6,
Zea	0.7 – 3.34	Cynaophycées	4, 5, 6, 9
Prasi	2.3 – 4.3	Prasinophycées	7, 11

1 : Andersen et al. (1996), 2 : Barlow et al. (1993), 3 : Barlow et al. (1998), 4 : Bustillos-Guzman (1996), 5 : Cailliau (1996), 6 : Claustre et al. (1994), 7 : Everitt et al. (1990), 8 : Gieskes et Kraay (1983b), 9 : Gieskes et al. (1988), 10 : Letelier et al. (1997), 11 : Peeken (1997).

Cependant, et malgré les avantages que cette méthode présente, quelques critiques peuvent être effectués :

- Il est toujours difficile de trouver un pigment **biomarqueur** exclusif d'une classe algale (caroténoïdes en général), certaines souches de prymnésiofycées ont un pool pigmentaire variable composé de fucoxanthine, 19HF et 19BF qui peut se recouper avec les signatures de pélagophycées et diatomées (Roy 2011). Bien souvent la 19BF est utilisé comme biomarqueur des chrysophycées, mais seulement 3 souches ont été examinées. Certaines prasinophycées ne contiennent pas de la prasinoxanthine mais les pigments caractéristiques des chlorophycées.
- Parfois il est possible de trouver des pigments biomarqueurs d'une classe algale à l'intérieur d'un autre groupe. Ceci peut s'expliquer par le phénomène d'endosymbiose. Certaines cellules phytoplanctoniques sont fonctionnelles à l'intérieur d'une cellule hôte appartenant en général à un autre groupe. Ceci est particulièrement gênant pour les dinoflagellés qui comptent en plus, des espèces hétérotrophes et mixotrophes. La périidine est souvent absente de leur pool pigmentaire et c'est le pigment biomarqueur de l'endosymbionte qu'est mise en évidence par HPLC. Ainsi nous trouvons de la chl_b dans *Lepidodinium chlorophorum* et *Gymnodinium* spp. ; la fucoxanthine dans *Peridinium foliaceum*, *P. balticum* et *Karenia mikimotoi*. L'endosymbiose avec un hétérotrophe est aussi possible comme dans le cas de *Myrionecta rubra* avec une cryptophycée.
- Les calculs d'abondances phytoplanctoniques sont généralement effectués à partir des rapports [chl_a : pigment biomarqueur], mais ces rapports ne sont pas constant ni dans

l'espace ni dans le temps. Les variations dans la concentration des pigments « photoactifs » (interviennent dans la photosynthèse) est proportionnelle à la quantité de lumière, et donc à la profondeur. D'autres pigments, dits « photoprotecteurs » n'ont pas la même amplitude de variation. Ces rapports peuvent aussi varier en fonction de l'état ou du cycle physiologique de la cellule, de l'espèce étudié, du taux de croissance ou la disponibilité en sels nutritifs.

Les nombreuses publications scientifiques abordant depuis 30 ans l'approche chémotaxonomique fournissent une base de connaissance suffisante pour effectuer sereinement des études sur une zone sur laquelle il y a peu ou pas de données environnementales et dénombrements phytoplanctoniques. Une « bibliographie chémotaxonomique de base » regroupe les publications les plus marquantes à ce sujet, et bien qu'elle n'est pas exhaustive, elle permet d'aborder pleinement l'inférence chémotaxonomique (Luis Lampert 2014a).

Des outils de calcul comme CHEMTAX et une bonne connaissance des assemblages présents dans la masse d'eau assurent une meilleure interprétation des résultats, considérés aujourd'hui comme acceptables dans les études descriptives et de processus.

1.6. Peut-on utiliser les pigments dans un Indice de composition ?

La perte d'information spécifique liée aux analyses pigmentaires par HPLC reste compatible avec leur utilisation dans les études des structures des communautés phytoplanctoniques (Clarke et Warwick 1994 ; Sherrard, Nimmo, et Llewellyn 2006). Avec le choix de biomarqueurs il est donc possible d'effectuer un lien entre complexité des assemblages phytoplanctoniques et la matrice pigmentaire obtenue par HPLC.

Si la chémotaxonomie ne permet pas de définir le phytoplancton jusqu'à l'espèce, elle permet d'obtenir les fractions pico- et nanophytoplanctoniques, impossibles à détecter avec le microscope optique. C'est le cas des coccolithophoridés qui, avec la fixation au Lugol acide, perdent leurs coccolithes calcaires ou sont dissous, ou des prasinophycées, haptophytes et cyanobactéries, qui peuvent représenter la biomasse dominante sur le Plateau continental atlantique français (PCAF) en été (Luis Lampert 2001 ; L. Lampert et al. 2002).

La mise en culture des souches algales de provenances diverses permet de disposer des profils pigmentaires sur la plupart des régions maritimes, facilitant le travail d'inférence chémotaxonomique. Il reste cependant de nombreuses incertitudes dans la méthode chémotaxonomique, surtout dans la variabilité des rapports pigmentaires qui sont la base de cette méthodologie. L'utilisation de CHEMTAX pour la mise en œuvre d'un indice de composition ne semble pas un bon choix à cause du degré d'expertise nécessaire pour obtenir des résultats cohérents. La matrice de rapports pigmentaires (Higgins, Wright, et Schlüter 2011) est en effet très dépendante des conditions locales et change au cours de l'année. Il n'est pas envisageable d'utiliser une matrice pigmentaire « type » ni pour l'année, ni pour une saison. Elle ne peut être définie qu'après une étude des conditions environnementales locales et une observation des communautés phytoplanctoniques au

microscope (Irigoiien et al. 2004), ce qui rend CHEMTAX très adapté pour les études, mais difficilement applicable à un indicateur dans un réseau de surveillance.

Le but de ce travail est de réaliser une première évaluation de l'utilisation des pigments phytoplanctoniques en Atlantique et en Manche pour construire un indice de composition (au sens de la DCE) et d'estimer, à travers cet indice, le degré d'éloignement des points de suivi par rapport à un point « référence ». Nous utiliserons des données pigmentaires des campagnes existantes pour calculer un indice de composition. Pour la méthodologie à appliquer et le choix des métriques nous avons retenu les indices de Bray-Curtis et de Kulczynski tels que définis par Sherrard (Sherrard, Nimmo, et Llewellyn 2006). Puis ces indices seront confrontés aux indicateurs de pressions disponibles, essentiellement nutriments et biomasse chlorophyllienne. Un volet sera dédié à la façade atlantique et un autre à la Manche orientale.

2.- METHODES

2.1- Calcul des indices de similarité

Pour la comparaison des points d'échantillonnage nous adoptons les indices de Bray-Curtis (BCSI) et de Kulczynski (KI). Ces deux indices ont été étudiés et comparés avec des dénombrements cellulaires avec succès sur le point L4 (Plymouth) par Sherrard (Sherrard, Nimmo, et Llewellyn 2006).

Indice de Bray-Curtis (BCSI) : cet indice semi métrique est en réalité une distance (D_{14} selon la nomenclature de Legendre et Legendre (1998)) obtenue à partir de l'indice de similarité de Steinhaus (S_{17}) par la formule $D_{14} = 1 - S_{17}$. Dans son travail, Sherrard a utilisé l'indice de similarité de Bray-Curtis, mais il s'agit d'un abus de langage, car l'indice de Bray-Curtis est une distance et non une similarité. La similarité associée à cette distance est la similarité de Steinhaus (S_{17}). Nous garderons cependant cette dénomination BCSI ($=S_{17}$) par soucis d'homogénéité avec la littérature.

$$BCSI = S_{17} = \frac{2W}{A + B}$$

A et B sont les sommes des concentrations de chaque pigment pour un échantillon. W est la somme des minimums de concentrations entre les deux échantillons considérés.

Indice de similarité de Kulczynski (KI) : aussi semi métrique et connu également comme S_{18} dans la nomenclature de Legendre et Legendre (1998)

$$KI = S_{18} = \frac{1}{2} \left[\frac{W}{A} + \frac{W}{B} \right]$$

Pour les calculs des indices, nous avons exclu la chlorophylle_a de la matrice pigmentaire car elle n'apporte pas de message taxonomique. De plus, étant numériquement plus forte que les autres concentrations pigmentaires, elle apporterait un biais non négligeable aux interprétations.

Les indices de similarité sont bornés entre 0 (plus faible similarité) et 1 (plus forte similarité). Une matrice est générée à partir du calcul des valeurs de l'indice 2x2 pour chaque couple de points de prélèvement. Nous retiendrons la colonne qui portera sur les comparaisons avec le point choisi comme référence (indice = 1).

Les calculs ont été effectués avec le logiciel libre de droits « R » version 3.0.1. Les distances ont été obtenues avec la commande « vegadist » du package « Vegan » version 2.0-10, puis

elles ont été transformées en similarités par la formule : $\text{Similarité} = 1 - \text{Distance}$. Les matrices pigmentaires ont été utilisées brutes, sans transformation préalable. Les figures et cartes ont été réalisées avec R. Les dimensions des bulles dans les cartes sont proportionnelles aux concentrations pour chaque carte mais pas entre elles. Elles permettent d'apprécier la distribution spatiale des plus fortes concentrations.

2.2- Zones d'études

Plateau Continental Atlantique Français (PCAF)

A défaut de campagnes côtières avec des analyses pigmentaires, les indices de similarité BCSI et KI seront calculés sur des points de la campagne Modycot 2003 (SHOM-avril 2003) où des analyses pigmentaires et des nutriments ont été réalisés (figure 1). Cette campagne couvre l'ensemble du plateau continental atlantique français (PCAF), ce qui nous éloigne de la zone d'influence de la DCE qui reste très côtière. Des sous-échantillons plus côtiers seront extraits afin de simuler au mieux les conditions des masses d'eau concernées par la DCE.

Deux réseaux ont été échantillonnés lors de cette campagne 2003 :

- le réseau R1, qui couvre l'ensemble du PCAF jusqu'à environ 200m de profondeur avec 47 points de prélèvement. Ce réseau, très synoptique, car réalisé entre le 6 et le 10 avril 2003, n'est pas très représentatif des conditions côtières et sera utilisé pour des tests complémentaires.
- le réseau R2 avec une focalisation sur les zones d'influence des panaches de la Loire et la Gironde. Ce réseau plus côtier est mieux adapté aux tests dans le cas de la DCE. Il a été exécuté entre le 28 mars et le 1^{er} avril 2003.

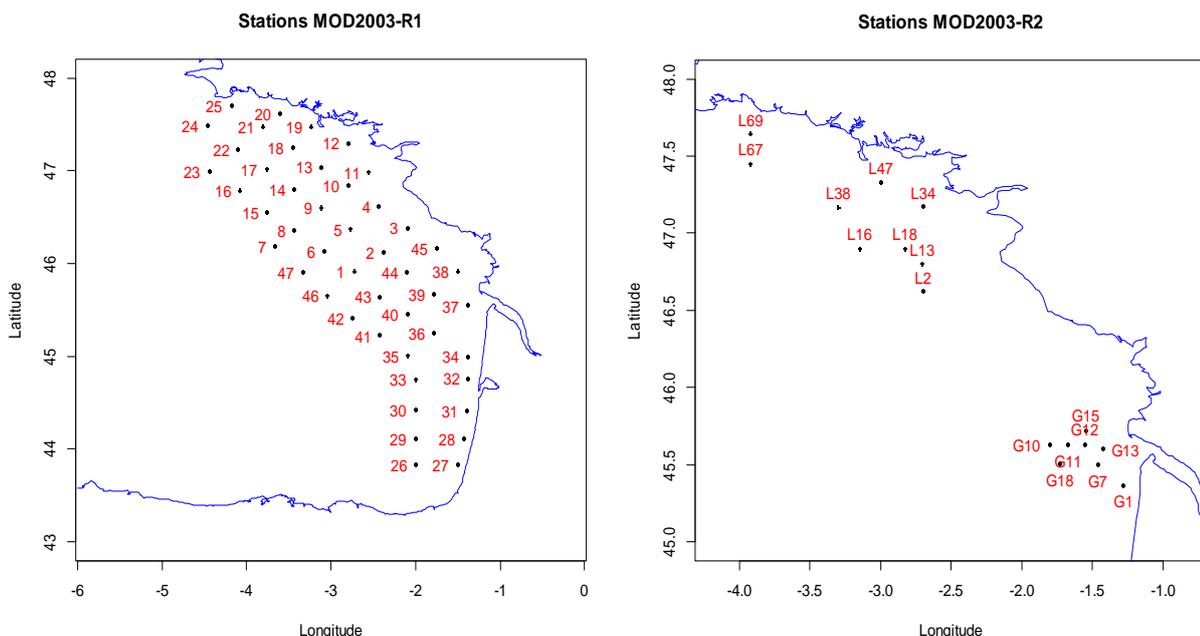


Figure 1 : Positionnement des échantillons du réseau R1 (ensemble du PCAF) et de la Loire et la Gironde (réseau R2) lors de la campagne Modycot 2003 en avril 2003

Lors de l'exécution du réseau R1, des analyses pigmentaires et de nutriments ont été effectuées sur tous les points en surface. Malheureusement, nous ne disposons pas des données de pigments et de nutriments pour tous les points du réseau R2 « Loire et Gironde ».

Dans un premier temps,

1. nous aborderons les réseaux R2 Gironde et Loire, avec une vision large permettant de se situer vis-à-vis des distributions pigmentaires et des nutriments,
2. puis on pourra appliquer les indices de Bray-Curtis et de Kulczynski sur la Gironde, pour vérifier si ces indices suivent le gradient de nutriments et de biomasse chlorophyllienne. Deux radiales ont été retenues : radiale G10-G13 et radiale G10-G13 + G15,
3. finalement nous calculerons les indices BCSI et KI sur l'ensemble du réseau R1.

Le calcul des indices BCSI et KI dans ces trois configurations devrait nous permettre de déterminer s'ils sont corrélés avec les pressions et celui qui est plus discriminant, c'est-à-dire, celui qui présente le plus d'écart entre le maximum et le minimum pour l'ensemble de points de suivi.

Manche orientale

La zone d'étude se situe près de la ville de Boulogne-sur-Mer. En 2012, lors de la campagne Dyphyma du projet européen DYMAPHY (Luis Lampert 2014b), une radiale a été réalisée à deux reprises sur les mêmes points à un mois d'intervalle, le 27 avril et le 31 mai 2012 (figure 2). Cette région dispose de moins de données pigmentaires historiques que le PCAF. Le point le plus éloigné des côtes se situant à plus de 7 milles nautiques, n'est pas représentatif du suivi DCE, mais permet d'estimer l'évolution des indices BCSI et KI par rapport aux pressions. Dans cette étude en Manche orientale, seul la chlorophylle_a a été utilisée comme proxy des pressions car les valeurs en nutriments ne sont pas disponibles.

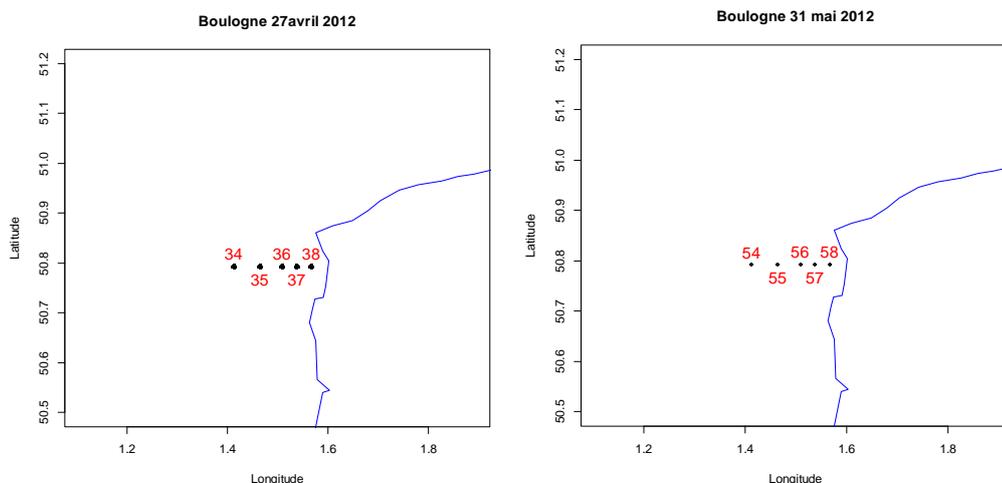


Figure 2 : Position des points de prélèvement pour les deux campagnes réalisées au large de Boulogne-sur-Mer lors de la campagne Dyphyma 2012

Le choix du point référence de chaque radiale s'est porté sur celui qui présentait la plus faible valeur en chlorophylle_a, ce qui permettra par la suite de comparer les indices calculés avec le gradient de pressions : les points 35 et 54 ont été retenus, le point 35 n'étant pas le point le plus éloigné des côtes (figure 2).

2.3- Choix des profils pigmentaires

Plateau Continental Atlantique Français (PCAF)

Les analyses pigmentaires ont été réalisées par le laboratoire de chimie du Service d'Hydrographie et d'Océanographie de la Marine (SHOM) de Brest. La méthode analytique utilisée est celle de van Heukelem (van Heukelem et Thomas 2001).

Seuls les pigments qui gardent l'information taxonomique essentielle ont été retenus pour chaque étude. Pour chaque cas d'étude, les pigments suivants ont été retenus (voir détail des abréviations en annexe 1) :

Pour la radiale Gironde G10 à G13 : c3, c1c2, peri, 19BF, fuco, 19HF, prasi, allo et chlB

Pour le réseau G10 à G13 : c3, c1c2, peri, 19BF, fuco, 19HF, prasi, allo et chlB

Pour le réseau R1 : c1c2, peri, 19BF, fuco, 19HF, prasi, allo, zea et chlB

Manche orientale

Les analyses pigmentaires de cette étude ont été réalisées à l'Université du Littoral et Côte d'Opale (ULCO) de Wimereux avec la méthode de Zapata (M Zapata, Rodríguez, et Garrido 2000 ; Manuel Zapata et al. 2001) qui permet une meilleure séparation des chlorophylles que la méthode de van Heukelem. Ceci n'est pas trivial car la zone subit régulièrement des efflorescences de *Phaeocystis* spp., qui sont plus facilement identifiable par son pool chlorophyllien que par les xanthophylles ou caroténoïdes. Nous retiendrons donc une matrice pigmentaire plus étendue que celle de l'étude sur le PCAF.

Pour chaque cas d'étude en Manche, les pigments suivants ont été retenus :

Pour le réseau du 27 avril 2012 : c3, MgDVP, c2, c1, peri, BF, fuco, kfuco, viola, HF, diadino, allo, diato, D.D, zea, chlB, bbCar

Pour le réseau du 30 mai 2012 : c3, MVC3, MgDVP, c2, c1, peri, fuco, kfuco, viola, HF, diadino, allo, diato, D.D, zea, bbCar.

2.4- Classements hiérarchiques

Les classements hiérarchiques ont été réalisés avec la commande « hclust » du package « stats » de R. Les distances D1 (euclidienne), D7 (Manhattan) et D14 (Bray-Curtis) ont été utilisées afin d'évaluer l'homogénéité des profils pigmentaires sur l'ensemble de la zone (Legendre et Legendre 1998 ; Borcard, Guillet, et Legendre 2011).

3.- RESULTATS

3.1- Indice de composition Atlantique

3.1.1- Vision du Réseau côtier R2

17 des échantillons de surface des réseaux Loire et Gironde ont été analysés par HPLC (tableau A2 en annexes). Les analyses des nutriments ont été effectuées uniquement sur quatre points du réseau Gironde.

La distribution de la richesse pigmentaire (nombre de pigments) varie entre 5 et 10 (figure 3). Les plus faibles richesses étant sur le point G7 en Gironde et les plus fortes sur les points L16 et L67 en Loire extérieure.

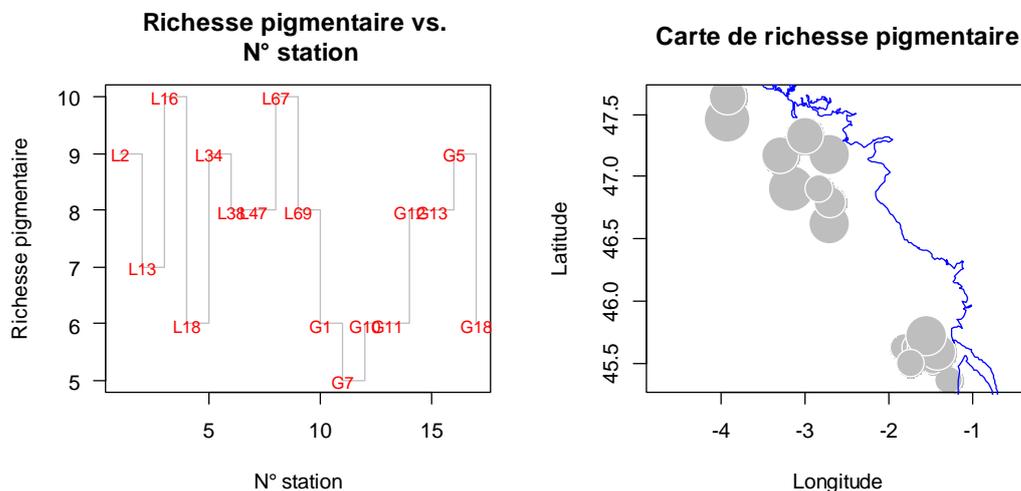


Figure 3 : Richesse pigmentaire obtenue lors de la campagne Modycot 2003 sur la Loire et la Gironde

La forte concentration en chlorophylle_a observée sur le point G15 en sortie de Gironde (figure 4) est concomitante avec une forte concentration en fucoxanthine et prasinoxanthine. La 19BF est plutôt observé dans deux points d'échantillonnage sur le panache de la Loire. Les plus fortes concentrations en 19HF semblent se trouver sur la partie extérieure du PCAF, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus lors des premières campagnes Modycot (Luis Lampert 2001). Les plus fortes concentrations en périidine se situent sur le point L16 de la Loire. L'alloxanthine est répartie assez régulièrement, à l'exception des points de la Gironde externe, où la 19HF est mieux représentée. La chlorophylle_a montre des fortes corrélations avec la fucoxanthine, confirmant la dominance des diatomées dans les zones côtières françaises (tableau 3). Sur deux points, la prasinoxanthine semble montrer une forte corrélation avec la biomasse totale en Gironde, suggérant un développement d'algues vertes. Nous avons exclu la C3 car elle présentait une corrélation de 0.90 avec la C1+C2.

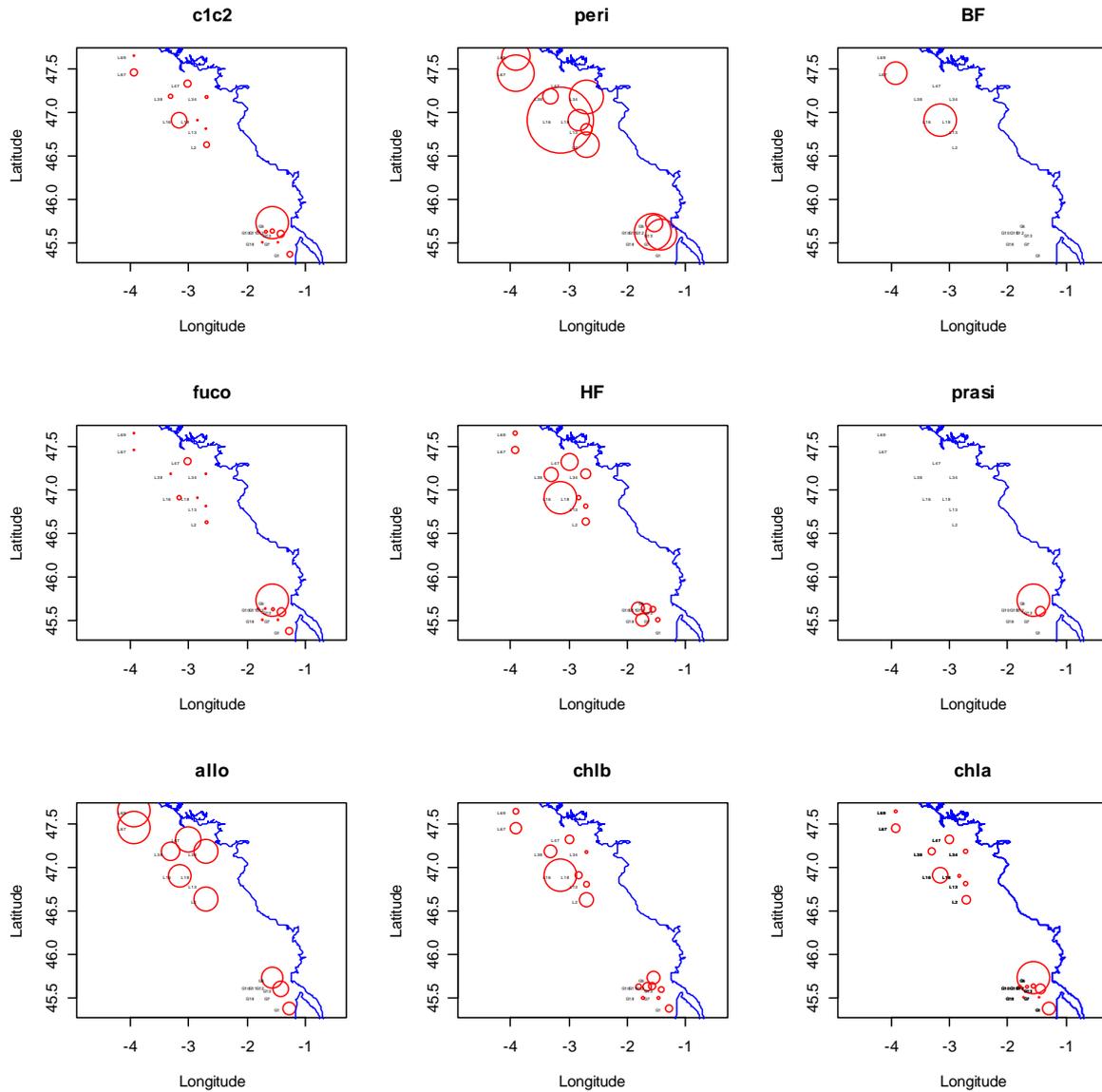


Figure 4 : Distribution des concentrations en pigments (relative par pigment) lors de la campagne Modycot 2003 sur le réseau R2 Loire et Gironde

Tableau 3 : Corrélations obtenues entre les pigments du réseau R2 Loire et Gironde lors de la campagne Modycot 2003

>	data1.D							
	c1c2	peri	BF	fuco	HF	prasi	allo	chl b
peri	0.29							
BF	0.29	0.68						
fuco	0.92	0.05	-0.04					
HF	0	0.33	0.6	-0.31				
prasi	0.85	0.03	-0.12	0.95	-0.4			
allo	0.39	0.48	0.39	0.3	0.15	0.17		
chl b	0.53	0.62	0.78	0.21	0.64	0.09	0.41	
chl a	0.98	0.25	0.26	0.94	-0.09	0.84	0.43	0.51

La hiérarchisation des points d'échantillonnage par leur matrice pigmentaire, avec une distance de Bray-Curtis (D14), permet de mettre en évidence la forte distance entre chacun des points G15 et L16 du reste des points (figure 5). Les 15 points restants sont répartis en deux groupes qui mêlent des points de la Loire et de la Gironde. Sur la zone « Gironde » les points côtiers G1, G12 et G13 présentent un profil différent par rapport aux autres points plus au large. La Loire ne semble pas avoir, *a priori*, cette hiérarchisation côte-large. L'utilisation d'une distance euclidienne de base (D1) donne la même distribution que celle obtenue avec Bray-Curtis, tandis qu'une distance de Manhattan, isole un groupe avec 12 points partagés entre la Loire et la Gironde.

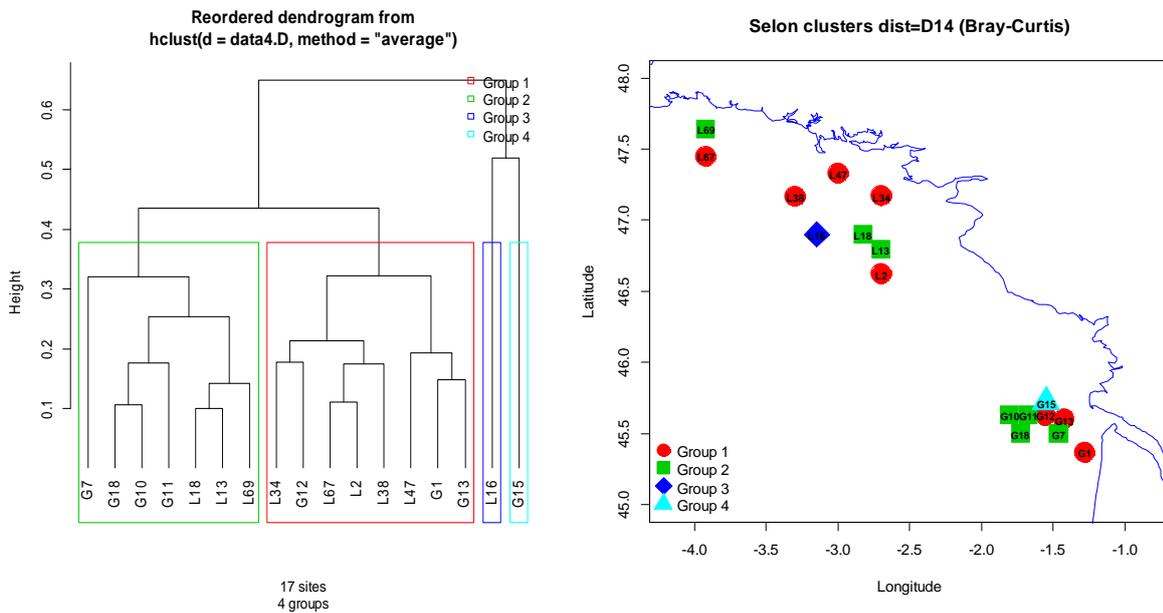


Figure 5 : Hiérarchisation en 4 groupes des points Loire et Gironde en fonction de la matrice pigmentaire avec une distance de Bray-Curtis D14

3.1.2- Radiale Gironde G10 - G13

Etant donné la hiérarchisation obtenue en Gironde (figure 5) et la possibilité de disposer d'une radiale G10 à G13 avec des analyses en nutriments, le calcul des indices BCSI et KI a été effectué sur cette radiale, sur laquelle a été ajouté le point atypique G15.

Les indices BCSI et KI ont été calculés sur cette radiale en prenant les concentrations de nutriments (figure 6) et la chlorophylle_a comme pression. Si les résultats sont favorables, nous pourrions utiliser ces indices en ajoutant le point G15 et les points du réseau R1 en utilisant uniquement la chlorophylle_a comme facteur de pression.

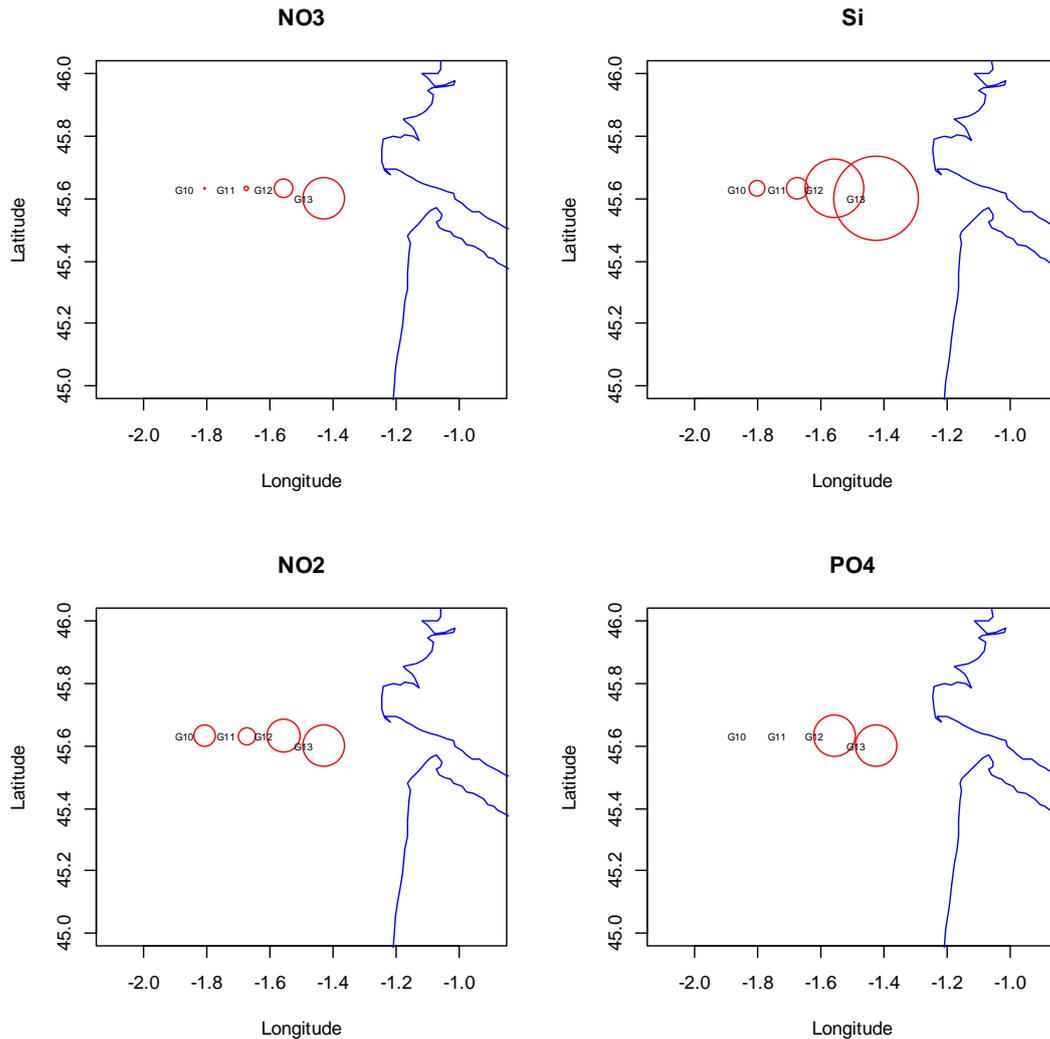


Figure 6 : Distribution relative des nutriments sur la radiale Gironde G10 - G13

Le point G10 est choisi comme point référence car le gradient des nutriments et de chlorophylle_a (figure 4) est décroissant dans le sens côte-large. Les indices de similarité BCSI et KI sont calculés pour les points d'échantillonnage par rapport au point G10 (tableau 4). Les indices de similarité étant bornés de 0 à 1, le point G10 présente la valeur de 1 car il est comparé à lui-même.

Tableau 4 : Matrice des indices de similarité BCSI et KI et tableau avec les valeurs par rapport au point référence G10

> BCSI

G10	G11	G12	G13
1	0.88	0.74	0.34

> KI

G10	G11	G12	G13
1	0.88	0.76	0.36

La distribution des indices BCSI et KI suit le gradient des pressions (figure 7). Les plus fortes similarités se situent plus au large et diminuent au fur et à mesure que l'on s'approche des

côtes, où les perturbations sont les plus fortes. Dans le cas présent l'indice BCSI est plus discriminant que KI avec des étendues entre maximum et minimum de 0.54 pour BCSI et de 0.52 pour KI.

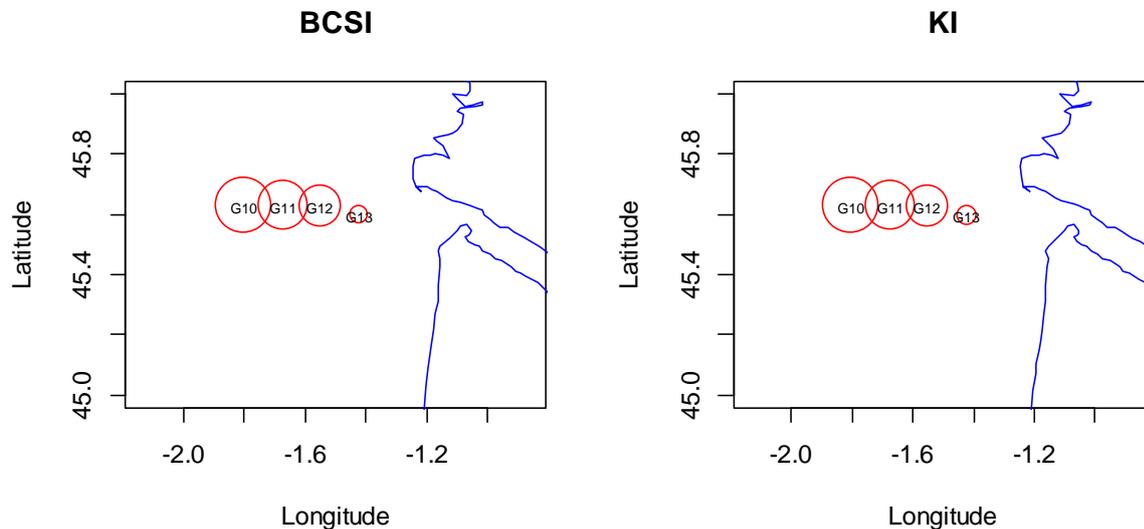


Figure 7 : Distribution des indices BCSI et KI sur les points G10 à G13 dans l'embouchure de la Gironde

Bien que nous ne disposions que de 4 points de mesure, les corrélations entre les indices BCSI et KI avec les nitrates et la chlorophylle_a sont supérieures à 0.98 (tableau 5). Pour les deux indices, les corrélations avec les autres paramètres sont supérieures à 0.90, à l'exception du phosphate où elles se situent autour de 0.80.

Tableau 5 : Matrice de corrélations entre les indices de similarité BCSI et KI et les pressions

	NO3	Si	NO2	PO4	turbi	chla	KI
Si	0.98						
NO2	0.95	0.97					
PO4	0.86	0.94	0.93				
turbi	0.98	0.93	0.91	0.76			
chla	0.97	0.92	0.91	0.74	1.00		
KI	-0.99	-0.95	-0.90	-0.79	-0.99	-0.98	
BCSI	-0.99	-0.96	-0.91	-0.80	-0.99	-0.98	1.00

3.1.3- Radiale Gironde G10 - G13, plus le point G15

Le point G15 se détache du reste des points échantillonnés en Loire et Gironde, non seulement à cause de sa forte concentration en chlorophylle_a, mais également en raison de son profil pigmentaire (figure 5). Les indices BCSI et KI sont calculés sur la radiale G10-G13, en ajoutant le point G15 pour voir comment réagissent ces indices (figure 8).

Comme nous ne disposons pas des données de nutriments sur le point G15, la chlorophylle_a est considérée comme témoin de pression. Cette valeur de chlorophylle_a est la plus forte du réseau R2 Loire et Gironde avec 2084 ng/L (tableau A2 en annexes).

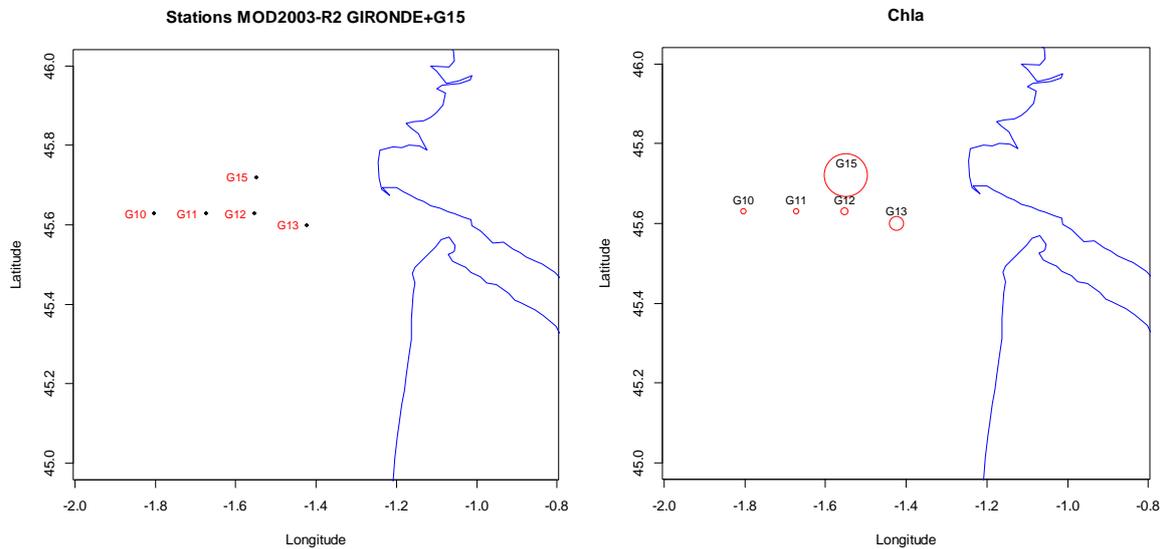


Figure 8 : à gauche, position des points sur la radiale Gironde G10 - G13, avec le point G15 et à droite, valeurs relatives de chl a par station

Comme attendu, la valeur BCSI pour le point G15 montre la plus faible similarité, avec 0.21 (tableau 6 et figure 9). L'indice KI reste plus conservatif, avec une valeur de 0.44, et proche de la valeur observée sur le point G13 (0.36). L'indice BCSI est dans cette configuration plus discriminant que KI, avec des étendues respectivement de 0.67 et 0.52. Il faut remarquer la plus forte valeur de l'indice KI sur le point G15 (0.44) par rapport au point plus proche des côtes G13 (0.36). Les corrélations linéaires entre les concentrations en chlorophylle_a et les indices BCSI et KI présentent respectivement des valeurs de $r=-0.83$ et $r=-0.67$ ce qui suggère une meilleure réponse de l'indice BCSI par rapport à la pression.

Tableau 6 : Matrice des indices BCSI et KI par rapport au point référence (G10)

> BCSI				
G10	G11	G12	G13	G15
1	0.88	0.74	0.34	0.21

> KI				
G10	G11	G12	G13	G15
1	0.88	0.76	0.36	0.44

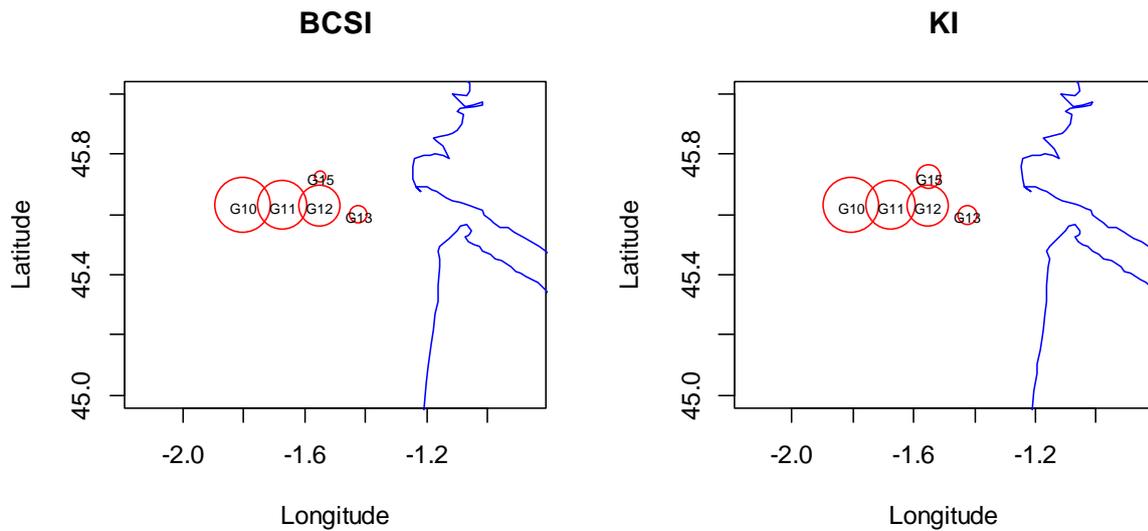


Figure 9 : Distribution des indices BCSI et KI sur les points G10 - G13 et G15 dans l'embouchure de la Gironde

3.1.4- Réseau R1

Les indices BCSI et KI sont à présent calculés sur le réseau R1 (figure 1) qui couvre l'ensemble du PCAF, afin d'observer comment ils réagissent aux différents profils pigmentaires dans une large étendue spatiale. Le problème du choix du point référence se pose sur cette zone d'étude très étendue en raison de l'hétérogénéité des distributions des peuplements phytoplanctoniques.

La moyenne des concentrations des pigments de deux points où les concentrations en nutriments et chlorophylle_a sont les plus faibles est prise comme référence. Pour choisir ces deux points, les nutriments (nitrate, nitrite et silicate) ainsi que la chlorophylle_a ont été classés par ordre croissant et leur rang a été déterminé. Nous avons regardé sur les 10 premiers rangs quels sont les points concomitants afin de calculer la moyenne de chaque biomarqueur sur ces deux points. Nous avons ainsi retenu les points 29 et 30 dont la moyenne pour chaque pigment composera un point virtuel appelé « référence ». Il faut cependant remarquer qu'ils se situent très proches géographiquement. Nous avons exclu le phosphate de ce pool des nutriments car il est fortement décorrélé des autres nutriments ($r \leq |0.21|$).

Sur les 47 stations du réseau R1, les richesses pigmentaires varient entre 5 et 12 pigments, les plus faibles valeurs se situant dans la partie extérieure du sud de la zone (figure 10) et les plus faibles richesses se situant sur les points extérieurs du PCAF au sud de la Gironde.

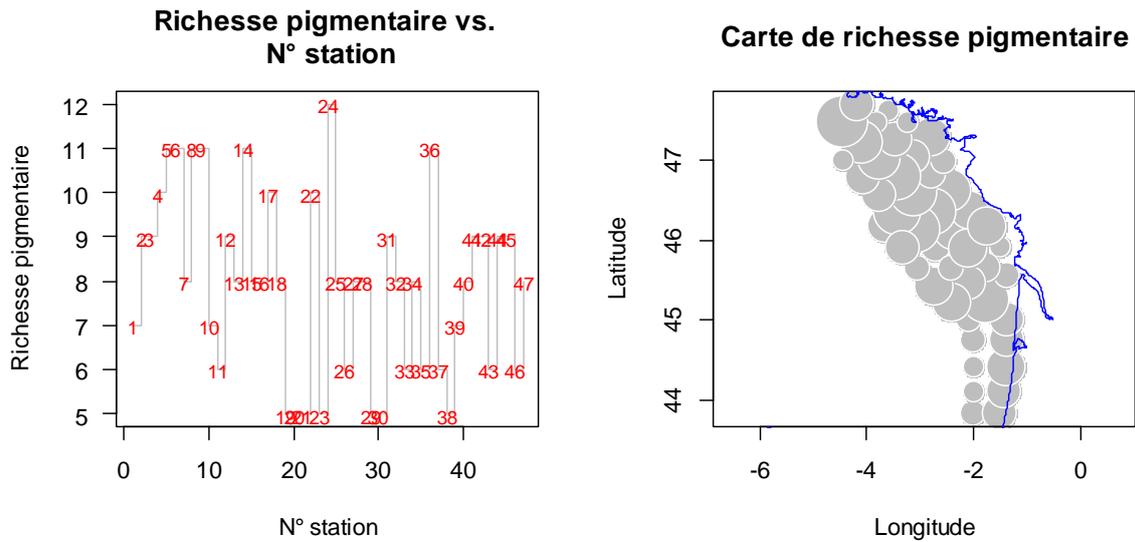


Figure 10 : Richeesse pigmentaire obtenue lors de la campagne Modycot 2003 sur le réseau R1

La distribution de la chlorophylle_a montre un gradient croissant nord-sud sur la radiale parallèle à la côte au sud de la Gironde (figure 11), puis des valeurs élevées au niveau du panache de la Loire atteignent le maximum au point 16. Sur la radiale composée des points 16, 17, 18 et 19, les concentrations en chlorophylle_a augmentent vers le large. La valeur minimale en chlorophylle_a est de 160 ng/L (point 38) et la valeur maximale de 2096 ng/L (point 27).

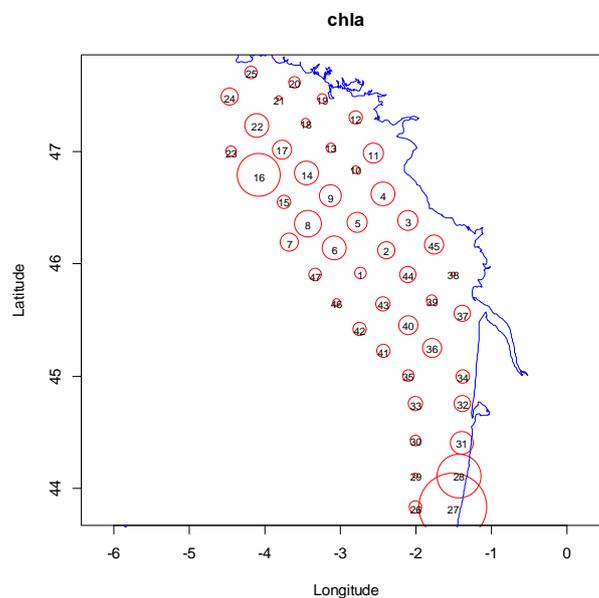


Figura 11 : Valeurs relatives de chla sur les points du réseau R1 de la campagne Modycot 2003

La distribution spatiale des pigments présente des patrons variés (figure 12). La 19BF se situe dans une région restreinte, entre les panaches de la Gironde et la Loire, L'alloxanthine et la zéaxanthine sont davantage présentes dans la partie nord de la zone, la péridinine dans une

radiale parallèle à la côte située entre le large et la côte, la fucoxanthine se trouve un peu sur tous les points d'échantillonnage avec quelques points forts qui se détachent au sud de l'Adour et dans la panache de la Loire.

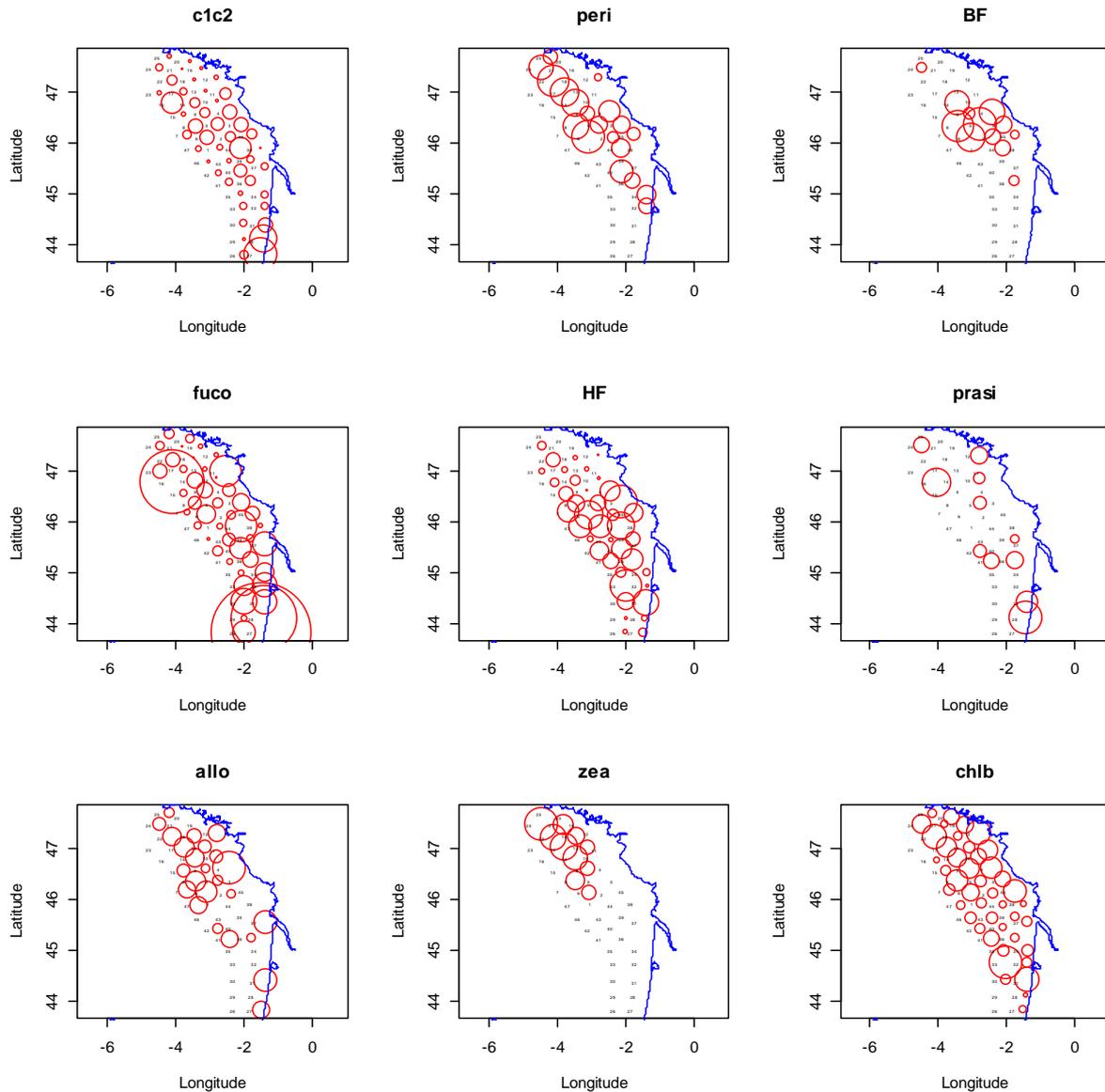


Figure 12 : Valeurs relatives de pigments biomarqueurs sur les points du réseau R1 de la campagne Modycot 2003

La chlorophylle_a est fortement corrélée avec la c1c2 et la fucoxanthine (respectivement $r=0.91$ et $r=0.89$), mettant en évidence la forte dominance de diatomées dans cette saison (tableau 7). A l'exception de la corrélation de $r=0.87$ entre c1c2 et fucoxanthine, tous les autres coefficients de corrélation sont ≤ 0.55 .

Tableau 7 : Matrice de corrélations pigmentaires pour les données du réseau R1 de Modycot 2003

```
> data1.D
```

	c1c2	peri	BF	fuco	HF	prasi	allo	zea	chl b
peri	0.23								
BF	0.32	0.66							
fuco	0.87	-0.05	-0.04						
HF	0.36	0.28	0.39	0.04					
prasi	0.34	-0.14	-0.05	0.31	0.06				
allo	0.13	0.36	0.36	-0.07	0.16	0.08			
zea	-0.08	0.55	0.27	-0.18	-0.11	-0.11	0.39		
chl b	-0.01	0.36	0.26	-0.18	0.27	0	0.41	0.31	
chla	0.91	0.19	0.21	0.89	0.16	0.33	0.26	0.05	0.06

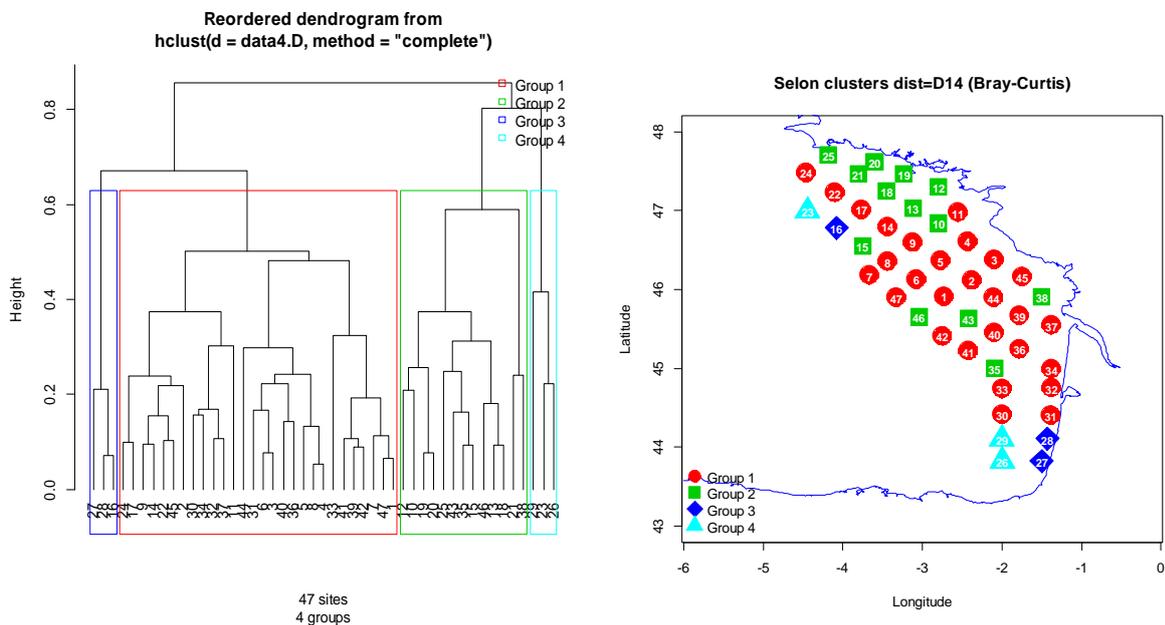


Figure 13 : Hiérarchisation en 4 groupes des points du réseau R1 en fonction de la matrice pigmentaire avec une distance de Bray-Curtis D14

La hiérarchisation de la matrice pigmentaire en 4 groupes présente deux groupes avec pour chacun trois points d'échantillonnage, et deux groupes avec 13 et 28 points (figure 13). Les deux principaux groupes semblent être constitués, d'une part des points plus côtiers dans le panache de la Loire (groupe 2), d'autre part des points situés plus au large dans le groupe 1. Cependant pour les points situés au sud de la Loire, ce schéma n'est pas clairement établi.

Les conditions environnementales

Les plus fortes concentrations en nitrate (NO₃) se situent près des côtes au nord de la Loire, et dans une moindre mesure entre la Loire et la Gironde (figure 14). Les nitrites (NO₂) présentent un patron spatial similaire mais avec un gradient moins fort entre la côte et le large. Les phosphates (PO₄) sont distribués très différemment, avec des plus fortes concentrations sur une radiale qui part de l'embouchure de la Gironde et se dirige vers la pleine abyssale. Une autre radiale côte-large avec des fortes concentrations est située au sud Bretagne et près du panache de l'Adour. Bien qu'avec des concentrations plus fortes près de

la côte landaise, les silicates (SiOH_4) sont principalement situés dans le nord de la zone. Les turbidités suivent de près les panaches des fleuves Loire, Gironde et Adour et les salinités présentent un gradient croissant côte-large comme attendu.

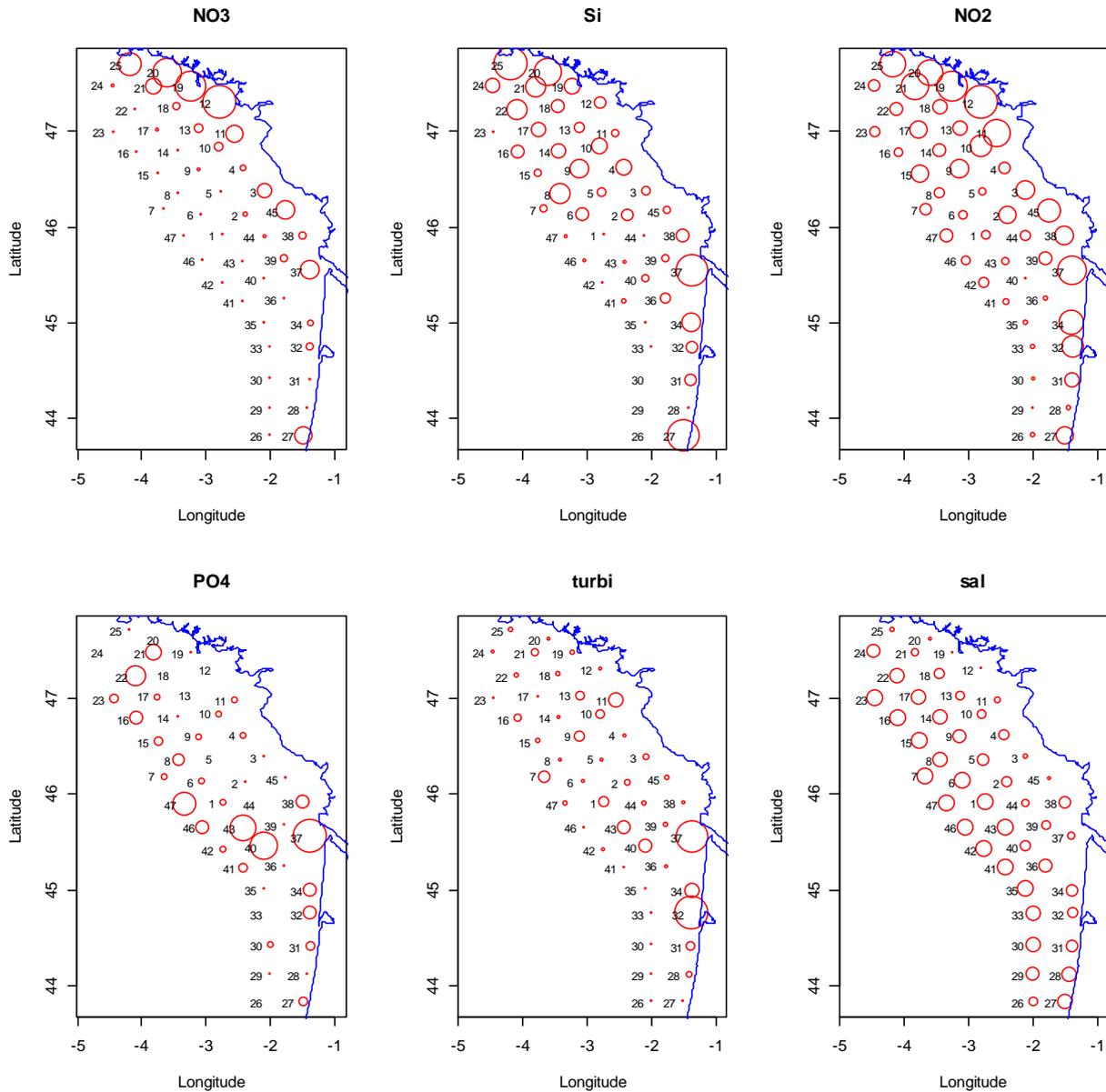


Figura 14 : Valeurs relatives des nutriments, turbidité et salinité en surface sur les points du réseau R1

Calcul des indices de similarité (avec un point référence virtuel) :

La comparaison des deux indices (tableau 8 et figure 15) montre une meilleure discrimination pour l'indice BCSI par rapport au KI (respectivement 0.63 et 0.54). Il n'existe pas un schéma très clair de la distribution spatiale des valeurs des indices, ni de gradient côte-large structuré non plus.

Tableau 8 : indices BCSI et KI de chaque point de par rapport au point « référence » virtuel (points 29 et 30)

st	BCSI	KI
1	0.74	0.75
2	0.71	0.74
3	0.59	0.71
4	0.56	0.67
5	0.6	0.68
6	0.56	0.69
7	0.67	0.69
8	0.56	0.67
9	0.63	0.67
10	0.51	0.51
11	0.57	0.62
12	0.55	0.56
13	0.65	0.66
14	0.66	0.75
15	0.8	0.8
16	0.49	0.66
17	0.61	0.64
18	0.62	0.63
19	0.55	0.56
20	0.64	0.64
21	0.39	0.46
22	0.64	0.73
23	0.86	0.87
24	0.63	0.67
25	0.71	0.71
26	0.74	0.74
27	0.37	0.6
28	0.43	0.6
29	0.62	0.73
30	0.78	0.82
31	0.55	0.69
32	0.75	0.76
33	0.62	0.73
34	0.82	0.84
35	0.81	0.81
36	0.69	0.77
37	0.72	0.73
38	0.52	0.63
39	0.76	0.77
40	0.68	0.76
41	0.68	0.7
42	0.75	0.77
43	0.83	0.83
44	0.52	0.68
45	0.66	0.73
46	0.65	0.67
47	0.73	0.74

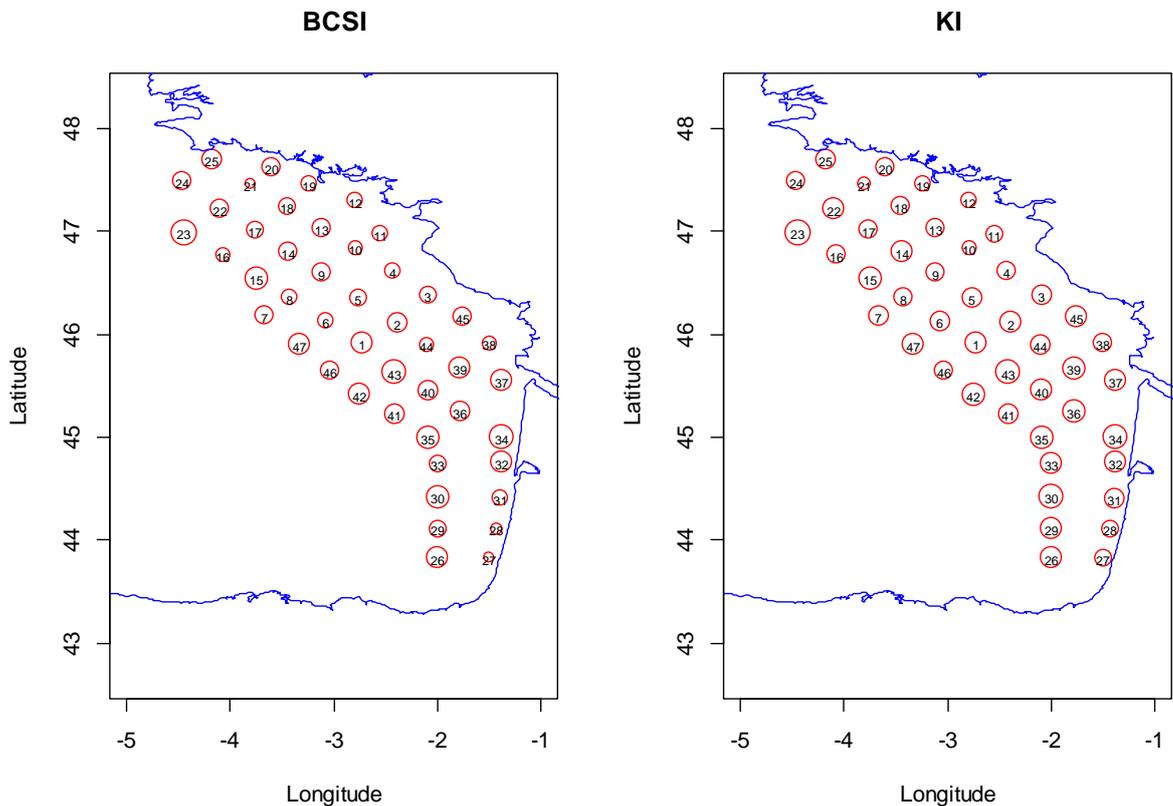


Figure 15 : Distribution des indices BCSI et KI sur les points de la radiale R1

Le tableau des corrélations entre les indices de composition BCSI et KI et les paramètres du milieu (tableau 9) montre une corrélation de 0.87 entre les deux indices, puis des corrélations entre -0.29 et -0.47 pour BCSI avec NO_3 , SiOH_4 et chlorophylle_a. Les corrélations entre les indices et les paramètres du milieu restent faibles et ne montrent pas une véritable influence des nutriments et la chlorophylle_a sur les similarités pigmentaires.

Tableau 9 : Matrice de corrélations entre les indices BCSI et Ki avec les paramètres du milieu

	BCSI	KI	NO3	Si	NO2	PO4	turbi	sal
KI	0.87							
NO3	-0.29	-0.50						
Si	-0.31	-0.37	0.57					
NO2	-0.20	-0.44	0.86	0.63				
PO4	0.15	0.18	-0.12	0.20	0.04			
turbi	0.17	0.09	0.14	0.27	0.35	0.53		
sal	0.25	0.42	-0.86	-0.36	-0.70	0.26	-0.14	
chla	-0.47	-0.14	-0.05	0.29	-0.11	0.06	-0.01	0.21

Nous remarquons la valeur de $r=-0.86$ entre salinité et NO_3 et celle de $r=0.53$ entre turbidité et PO_4 . Le paramètre « turbidité » ne présente pas de bonnes corrélations avec les indices, ni avec les nutriments, probablement du fait de l'étendue de la région étudiée. Il devrait présenter de meilleures corrélations sur une zone plus côtière.

3.2- Indice de composition Manche

3.2.1- Boulogne-sur-Mer 27 avril 2012

La biomasse chlorophyllienne minimale est observée au point 35 avec 973 ng/L chla et la plus forte au point 38 avec 3497 ng/L chla (figure 16). Le point 34 est le plus extérieur de la radiale, mais n'est pas celui qui présente la plus faible concentration en chlorophylle_a. Le point référence est choisi comme celui ayant la plus faible concentration de chlorophylle_a, le point 35.

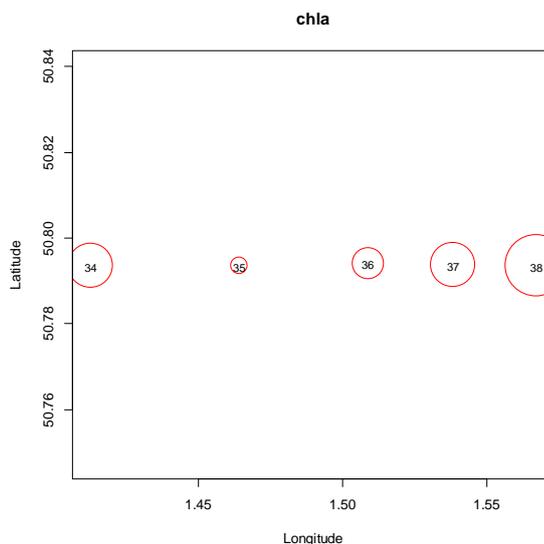


Figure 16 : Distribution de la chla (échelle relative) lors de la campagne du 27 avril 2012

La péridinine, biomarqueur des dinoflagellés présente un gradient décroissant côte-large, tandis que la chlorophylle_b qui met en évidence la présence des algues « vertes » n'est présente que dans le point le plus éloigné des côtes (figure 17). Tout comme la chlorophylle_a, les pigments chlorophylle_c3 (c3), fucoxanthine et alloxanthine se trouvent en plus faibles quantités au point 35.

Les plus fortes corrélations des pigments biomarqueurs avec la chlorophylle_a sont observées avec la c3 (r=0.89), la fucoxanthine (r=0.89) (tableau 10). Les fortes corrélations de la chlorophylle_a avec la diadinoxanthine (ddx) et le β-carotène (bbCar) présentent moins d'importance du fait du manque de spécificité de ces pigments. Fucoxanthine et c3 sont des pigments qui pourraient être attribués à la présence des diatomées du type 1 (Higgins, Wright, et Schlüter 2011), mais les observations microscopiques indiquent la présence massive de *Phaeocystis* spp., haptophyte qui possède également ces deux pigments.

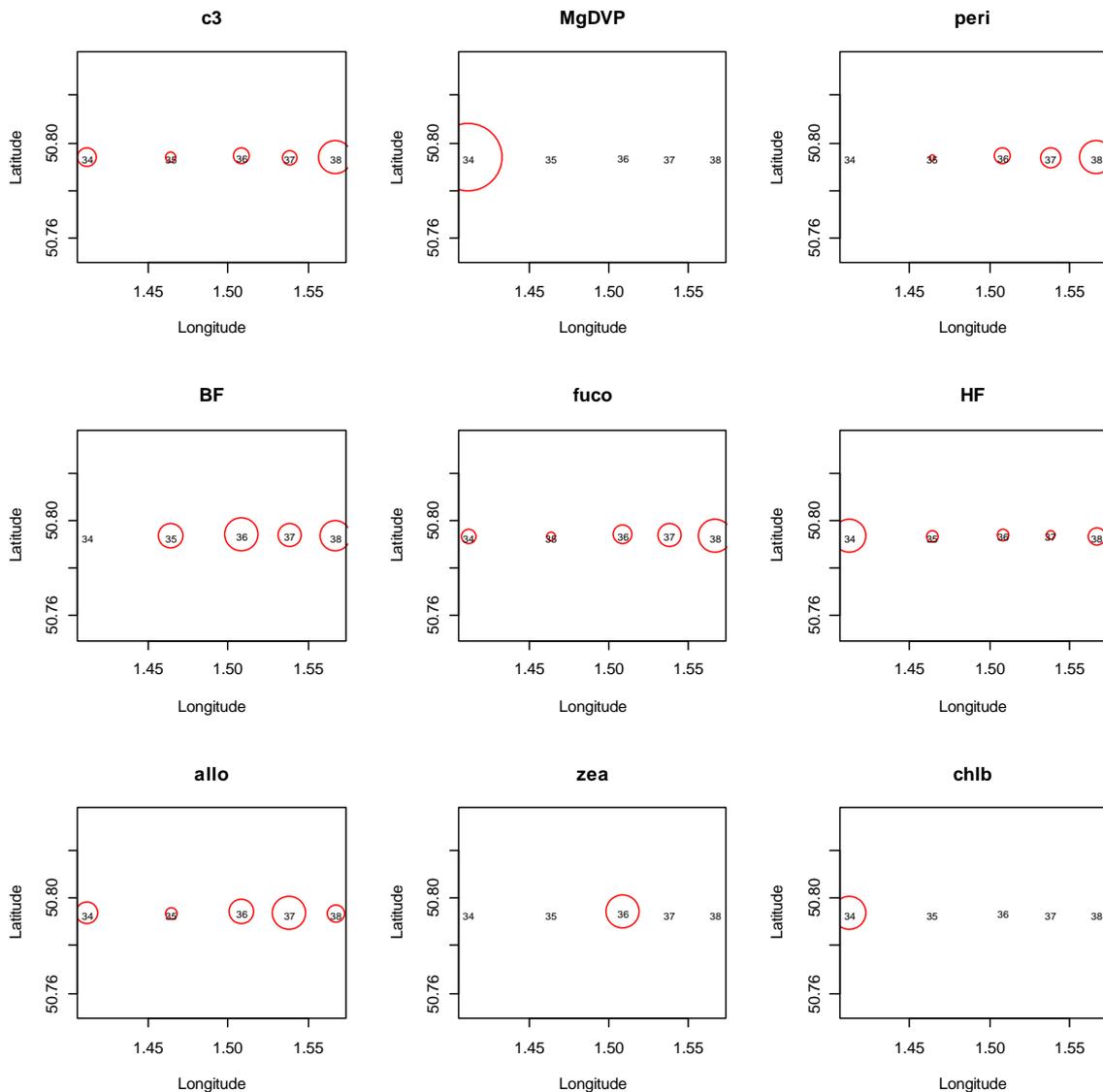


Figure 17 : Distribution des concentrations en pigments (relative par pigment) lors de la campagne du 27 avril 2012

Tableau 10 : Matrice de corrélations pigmentaires pour les données du 27 avril 2012

> data1.D

	c3	MgDVP	c2	c1	peri	BF	fuco	kfuco	HF	ddx	allo	diato	D.D	zea	chlb	bbCar
MgDVP	0.04															
c2	0.69	-0.66														
c1	0.63	0.79	-0.11													
peri	0.66	-0.68	1	-0.15												
BF	0.12	-0.95	0.72	-0.68	0.73											
fuco	0.83	-0.3	0.9	0.22	0.9	0.39										
kfuco	0.9	-0.11	0.77	0.47	0.74	0.14	0.87									
HF	0.32	0.95	-0.46	0.93	-0.49	-0.85	-0.12	0.13								
diadino	0.93	-0.18	0.85	0.38	0.84	0.3	0.98	0.91	0.05							
allo	-0.13	0.01	0.1	-0.19	0.15	-0.06	0.32	-0.01	-0.18	0.17						
diato	-0.11	-0.42	0.4	-0.5	0.45	0.36	0.45	0.06	-0.57	0.26	0.9					
D.D	0.81	-0.26	0.87	0.22	0.88	0.36	1	0.84	-0.1	0.97	0.38	0.48				
zea	-0.18	-0.25	0.02	-0.4	0.06	0.44	-0.04	-0.48	-0.3	-0.08	0.23	0.31	0			
chlb	0.04	1	-0.66	0.79	-0.68	-0.95	-0.3	-0.11	0.95	-0.18	0.01	-0.42	-0.26	-0.25		
bbCar	0.62	0.36	0.33	0.61	0.33	-0.39	0.67	0.75	0.42	0.68	0.46	0.28	0.68	-0.51	0.36	
chla	0.89	0.15	0.63	0.61	0.62	-0.07	0.89	0.9	0.32	0.93	0.28	0.22	0.9	-0.28	0.15	0.89

Les valeurs des indices de composition BCSI et KI montrent un gradient décroissant du point 35 (référence) vers la côte (tableau 11 et figure 18). La valeur des indices au point 34, le plus extérieur, reflète le gradient de la chlorophylle_a qui a été pris comme indicateur de pression. Rappelons toutefois que la matrice qui sert au calcul des indices n'inclut pas la chlorophylle_a, ce qui exclut un calcul circulaire.

Tableau 11 : Rapport des valeurs des indices BCSI et KI par rapport au point référence (point 35)

>BCSI

	34	35	36	37	38
BCSI	0.58	1	0.67	0.6	0.45

>KI

	34	35	36	37	38
KI	0.63	1	0.75	0.71	0.65

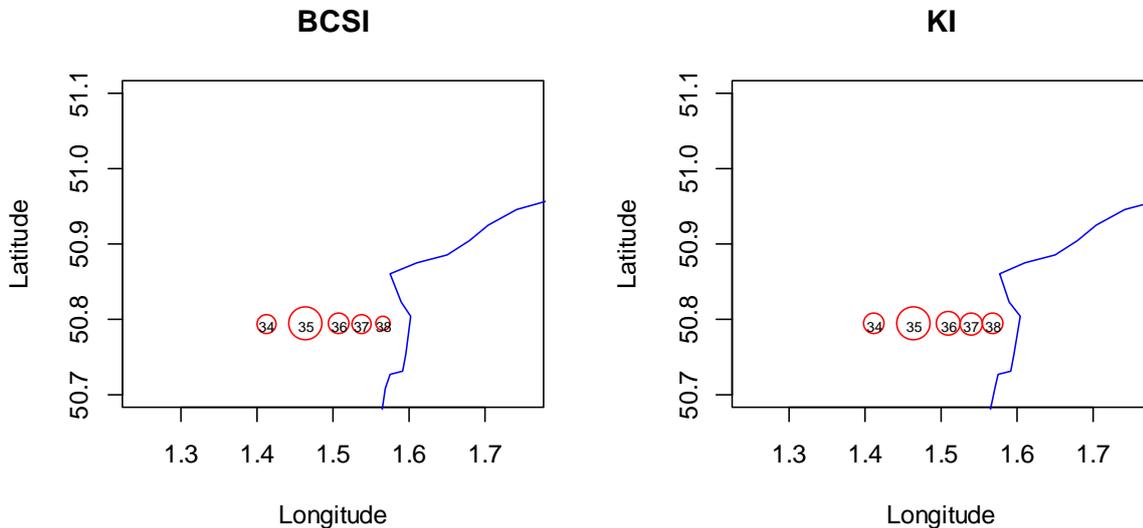


Figure 18 : Distribution des indices BCSI et KI sur les points 34 à 38 au large de Boulogne-sur-Mer le 27 avril 2012

L'étendue des deux indices est de 0.22 pour BCSI et de 0.12 pour KI, ce qui met en évidence une plus forte capacité de discrimination de l'indice BCSI. Les coefficients de corrélation entre les indicateurs de pression (chlorophylle_a) et les indices sont de $r=-0.87$ pour KI et de $r=-0.95$ pour BCSI.

3.2.2- Boulogne-sur-Mer 31 mai 2012

Au mois de mai 2012, la dominance de *Phaeocystis* spp. a laissé la place aux diatomées. Les biomasses chlorophylliennes varient entre 1274 ng/L chl_a au point 54 et 3766 ng/L chl_a au point 58. La plus faible valeur en chlorophylle_a se situe au point le plus extérieur de la radiale, mais le gradient croissant vers la côte se trouve perturbé par une faible valeur au point 57 (figure 19 - chl_a). La fucoxanthine est essentiellement observée dans la zone intérieure et la péridinine dans la zone extérieure. Les plus fortes concentrations en MVC3, représentatives de la classe des haptophytes du type 6 (hapto6 coccolithophoridés) se situent près des côtes. La zéaxanthine, bien que présente dans tous les points de la radiale, est davantage présente dans les points proches de la côte.

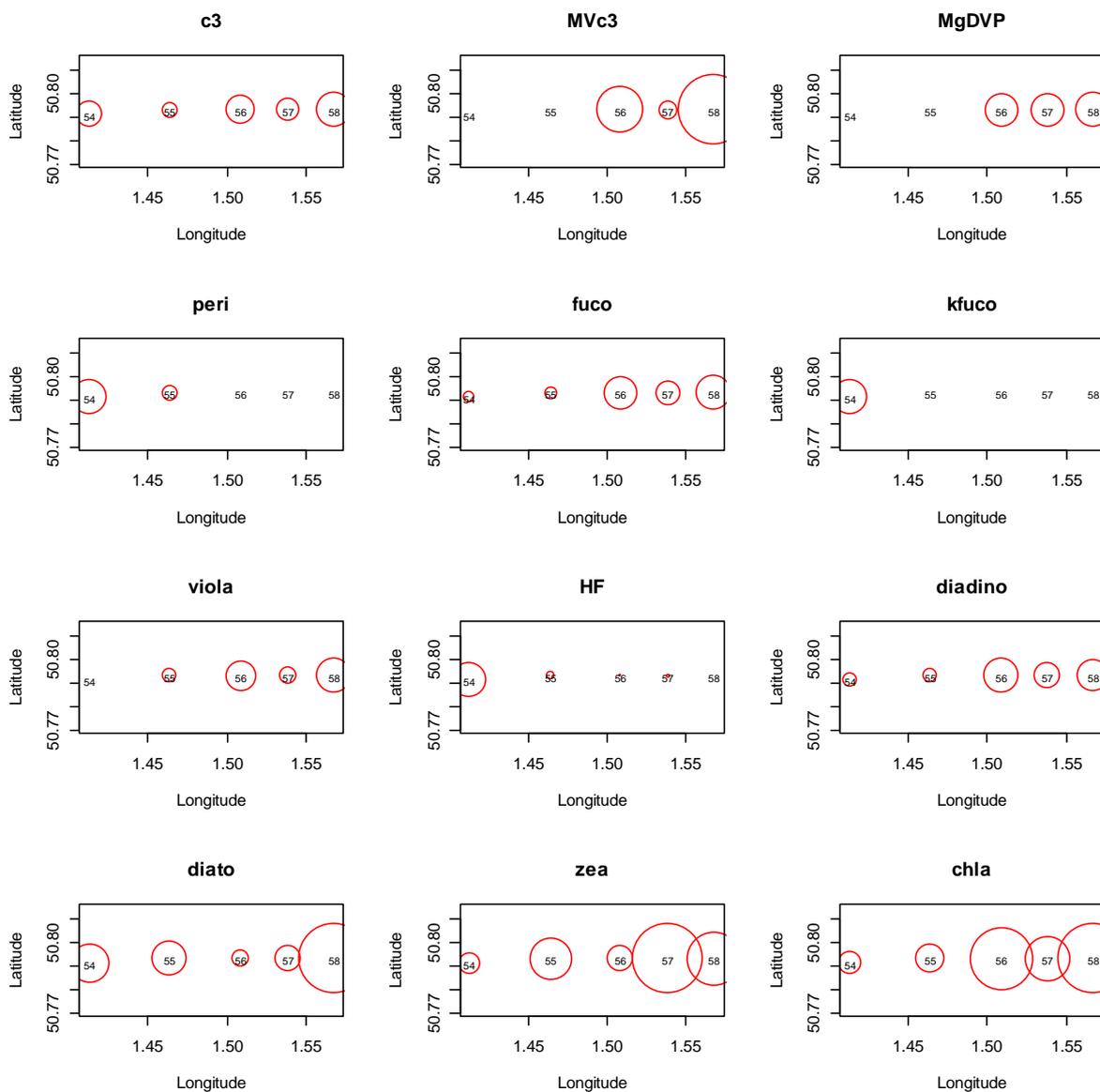


Figure 19 : Distribution des concentrations en pigments (relative par pigment) lors de la campagne du 31 mai 2012

La chlorophylle_a se trouve fortement corrélée avec la fucoxanthine, les chlorophylles c2 et MvC3, qui mettent en évidence la présence en forte proportion des diatomées (tableau 12), et avec le MgDVP qui est caractéristique des coccolithophoridés. Les observations microscopiques confirment la forte dominance de diatomées en cette fin du mois de mai 2012 en Manche orientale.

Tableau 12 : Matrice de corrélations pigmentaires pour les données du 30 mai 2012

	c3	MvC3	MgDVP	c2	c1	peri	fuco	kfuco	viola	HF	diadinc	allo	diato	D.D	zea	bbCar
MvC3	0.84															
MgDVP	0.66	0.83														
c2	0.79	0.96	0.95													
c1	0.7	0.82	0.5	0.67												
peri	-0.36	-0.74	-0.91	-0.85	-0.43											
fuco	0.74	0.94	0.95	1	0.61	-0.88										
kfuco	0.03	-0.5	-0.61	-0.57	-0.29	0.88	-0.62									
viola	0.58	0.92	0.82	0.92	0.66	-0.89	0.94	-0.78								
HF	-0.17	-0.66	-0.74	-0.72	-0.45	0.94	-0.75	0.98	-0.88							
diadino	0.74	0.9	0.94	0.98	0.5	-0.85	0.99	-0.56	0.89	-0.69						
allo	0.8	0.55	0.66	0.65	0.17	-0.33	0.64	0.13	0.35	-0.02	0.72					
diato	0.45	0.45	0.05	0.23	0.88	0.01	0.15	0.05	0.23	-0.07	0.03	-0.13				
D.D	0.79	0.94	0.93	0.99	0.59	-0.83	0.99	-0.54	0.91	-0.69	0.99	0.7	0.14			
zea	-0.07	0.22	0.5	0.31	0.32	-0.61	0.3	-0.61	0.3	-0.61	0.2	-0.16	0.21	0.21		
bbCar	0.37	0.12	0.38	0.2	0.23	-0.1	0.14	0.23	-0.13	0.13	0.12	0.43	0.25	0.14	0.53	
chla	0.76	0.98	0.91	0.99	0.7	-0.85	0.99	-0.62	0.96	-0.76	0.96	0.57	0.27	0.98	0.28	0.09

Tableau 13 : Rapport des valeurs des indices BCSI et KI par rapport au point référence (point 54)

>BCSI

54	55	56	57	58
1	0.91	0.51	0.62	0.32

>KI

54	55	56	57	58
1	0.91	0.63	0.69	0.56

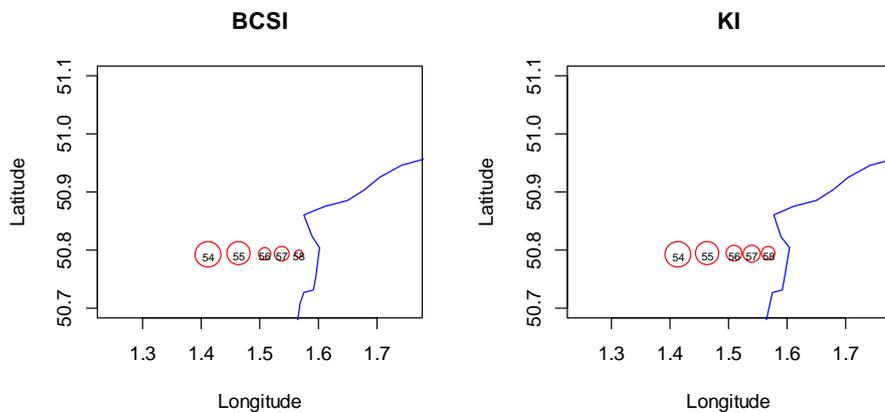


Figure 20 : Distribution des indices BCSI et KI sur les points 54 à 58 au large de Boulogne-sur-Mer

Les indices de similarité (tableau 13 et figure 21) suivent l'évolution de la pression, caractérisée par la chlorophylle_a (figure 19 - chla). Ceci est mis en évidence par les coefficients de corrélation entre les indices de composition BCSI et KI et les concentrations en chlorophylle_a, qui sont $r[\text{chla-BCSI}]=-0.98$ et $r[\text{chal-KI}]=-0.97$. L'étendue de l'indice KI est de 0.35 et celle de l'indice BCSI de 0.59 ce qui rend ce dernier plus discriminant.

4.- DISCUSSION

4.1- Plateau Continental Atlantique Français (PCAF)

Sur l'ensemble de la région atlantique (réseau R1), le profil pigmentaire de 47 points d'échantillonnage réalisé en avril 2003 présente des discontinuités mises en évidence par les classements hiérarchiques. Ce classement ne renseigne pas sur un possible agencement en fonction des pressions (ici la chlorophylle_a et les nutriments). Il en est de même pour le réseau R2 où les points d'échantillonnage se situent au niveau des panaches de la Loire et la Gironde. Cependant, en regardant à plus petite échelle sur l'estuaire de la Gironde (figure 5), il est mis en évidence une différence entre les points côtiers et ceux situés au large. Sur le réseau Gironde, le calcul des indices BCSI et KI présente un gradient côte-large où les points les plus côtiers sont plus éloignés en terme de similarité des points extérieurs. Ceci pourrait être le fait d'un gradient de pressions qui s'exerce plus fortement sur les points côtiers, comme le suggère le gradient de nutriments et de biomasse (chlorophylle_a) (figure 6).

Le point G15, bien que proche du point G12, présente un profil pigmentaire très éloigné de celui de la radiale G10-G13 (figures 5 et 8). L'indice BCSI a bien reproduit cette situation avec la plus faible valeur au point G15 (BCSI=0.21), et ceci malgré sa proximité avec le point G12 pour qui BCSI=0.74. L'indice KI au point G15 (KI=0.44) présentait une valeur légèrement supérieure à celle du point G13 plus côtier (KI=0.36), suggérant une plus faible aptitude par rapport à l'indice BCSI pour discriminer les points selon leur matrice pigmentaire. Le classement ainsi produit reste bien corrélé aux pressions utilisées, avec des coefficients de corrélation supérieures à 0.95 pour les deux indices de composition.

L'utilisation des indices de similarité sur l'ensemble du réseau R1 ne semble pas donner de résultats exploitables. Il est étonnant de remarquer des indices plus élevés à l'embouchure de la Gironde par rapport à ceux se situant au bord du plateau. Ceci pourrait être l'effet du point virtuel « référence », composé de la moyenne des pigments des points 29 et 30, situés dans la zone d'influence de la Gironde, et donc non représentatif de l'ensemble de peuplements phytoplanctoniques sur le PCAF. Une forte hétérogénéité et diversité existe entre les peuplements phytoplanctoniques côtiers et du large, ainsi qu'entre le nord et le sud (Luis Lampert 2001). Nous ne pouvons pas comparer le PCAF à la bande très côtière prise en compte par la DCE car les pressions sont moins fortes, voire inexistantes. Les réponses des communautés phytoplanctoniques caractérisées par les pigments ne répondent pas alors à ces pressions, mais aux cycles biogéochimiques classiques décrits sur le PCAF (Luis Lampert 2001).

4.2- Manche orientale

Comme pour l'étude du PCAF, les données pigmentaires ne sont pas disponibles sur la zone côtière. Nous avons utilisé les données d'une radiale échantillonnée deux fois en 2012, avec le point le plus extérieur situé à environ 7 milles nautique au large de Boulogne-sur-Mer. Cette radiale, échantillonnée en avril et fin mai 2012 nous offre la possibilité de comparer deux situations contrastées de l'évolution des peuplements phytoplanctoniques en Manche orientale. Comme chaque mois d'avril, les côtes françaises de cette région se sont trouvées influencées par une efflorescence de *Phaeocystis* spp., tandis qu'à la fin mai les diatomées dominaient la biomasse autotrophe (Luis Lampert 2014b).

Dans ces deux situations, les variations dans la composition phytoplanctonique, ici mesurées par leur pool pigmentaire *via* les indices BCSI et KI étaient corrélées aux pressions, caractérisées par la chlorophylle_a uniquement. Si les pressions devaient être autres, tels les émissaires des villes, la géomorphologie côtière, les constructions riveraines ou l'activité agricole, ou tout autre indice composite, il faudrait tester ces indices en fonction de ces pressions. Dans les eaux de la Manche orientale, l'indice BCSI s'est également montré plus discriminant que l'indice KI.

4.3- Choix de l'indice de composition

D'après cette étude, l'indice de Bray-Curtis BCSI pourrait être considéré comme un bon candidat pour l'indice de composition pigmentaire en Atlantique et en Manche. Il faudrait toutefois le mettre à l'épreuve en situation réelle sur une zone DCE pendant au moins une année. Il serait souhaitable de choisir des masses d'eau DCE où les contrastes entre le point de référence et les points de surveillance soient forts.

Cette méthode pourrait également être appliquée sur une matrice d'abondances cellulaires (comptages microscopiques traditionnels) mais présenterait un double désavantage par rapport aux indices pigmentaires : a) les pigments peuvent intégrer toutes les classes de taille et non la seule fraction microphytoplanctonique et b) les calculs des indices de similarité se font avec des concentrations pigmentaires et non des unités cellulaires, qui présentent des fortes disparités en terme de biomasse.

Il serait également intéressant de calculer l'indice BCSI sur les matrices pigmentaires déjà obtenues en Méditerranée et les comparer à l'indice « Imedit » (Goffart et Andral 2014).

Un inconvénient de la méthode pigmentaire est cependant le manque de spécificité taxinomique. Il se pourrait que les modifications de la flore phytoplanctonique aient lieu non pas au niveau des classes, mais au niveau des espèces. Dans ce cas, il est possible que la matrice pigmentaire ne fasse pas la différence entre deux assemblages de diatomées au même pool pigmentaire que se succèdent. Il faut cependant nuancer ceci en notant que tout traitement de données taxinomiques implique de toutes façons un regroupement d'espèces, voire de genres, afin d'homogénéiser la série de données : *cf.* les unités taxinomiques décrites par Hernández-Fariñas *et al.* (2013).

4.4- Point « référence »

Principe du suivi avec un point référence

Deux types d'approche peuvent se présenter pour la comparaison des points de surveillance avec un point de référence :

- a) Référence locale : ceux qui cherchent à comparer l'indicateur du point de surveillance avec le point de référence au même moment pour statuer sur le degré d'éloignement ou de dégradation en fonction d'une grille de pression, où
- b) Référence passée : ceux qui établissent un patron historique sur le point de référence (sur plusieurs années, constituant ainsi « la référence »), et qui comparent les points de surveillance de l'année « n » à cette référence historique. Dans ce dernier cas, le point référence dans l'année « n » est également comparé avec « la référence » historique afin de déceler des changements dans le temps (changements climatiques et variations à long terme).

Cette question n'a pas encore été tranchée mais il semble avoir un consensus sur la deuxième option.

Nous pouvons proposer également, dans le cas de l'indice de composition, de ne pas comparer les points de surveillance à une référence, mais avec eux-mêmes sur une période passée. Ainsi, chaque point de surveillance sera sa propre référence. Cette approche permet de s'affranchir de la forte variabilité des peuplements phytoplanctoniques et ne voir que leur propre évolution par rapport aux conditions physico-chimiques et géomorphologiques que sont les siennes à un point donné.

Les points référence doivent être très méticuleusement choisis, car sinon l'indice de composition ne reflète pas les changements sur des points éventuellement impactés par rapport à la référence, qui elle est théoriquement peu influencée (ou pas) par les pressions. Dans l'idéal, les communautés présentes au point référence doivent être celles identifiées sur les autres points quand aucune influence ne vient les perturber. Les points référence déjà définis par la DCE répondent-ils à ce critère ? Manifestement non pour un certain nombre d'entre eux, dont le statut problématique vis-à-vis du statut de référence a été signalé par Buchet (Buchet 2010) puis Belin (Belin, Lamoureux, et Soudant 2014). L'utilisation des indices de similarité permet de comparer, sur la base d'une matrice pigmentaire, le degré d'éloignement d'un point de suivi du réseau par rapport au point référence. Il ne permettra pas de déduire si la différence constatée est due à une cause anthropique ou naturelle, à moins d'être sûrs que le point référence n'a pas été impacté par les activités humaines.

Représentativité des flores au point référence

La pertinence du point référence par rapport aux points de suivi a été validée dans un premier temps sur la base des paramètres de biomasse (chl_a) et géomorphologiques. Comme il est rappelé ci-dessus, cette pertinence est parfois remise en cause et un travail de consolidation de ces sites de référence reste donc à finaliser (Belin, Lamoureux, et Soudant 2014). Sans perturbation, les points de surveillance devront donc se trouver dans le même ordre de grandeur que le point référence. Une grille permettra alors de définir dans quelle catégorie se trouve le point : « bon état », « médiocre », etc. Si cette démarche est validée

pour les indicateurs déjà mis en place, rien ne permet d'assurer que le choix du point référence actuel est valide pour l'indice de composition. Il faut s'assurer que la composition floristique des points de suivi sans pression, reflète celle du point référence.

Faute de données pigmentaires historiques, ce travail pourrait être réalisé sur des points de surveillance DCE / REPHY existant, où des dénombrements ont été réalisés sur une longue période de temps. Il faudra alors vérifier que lors de périodes où les pressions ont été faibles ou inexistantes sur les points de suivi (selon les autres indicateurs déjà validés), les communautés phytoplanctoniques n'ont pas subi des changements de nature à rendre inutilisable l'indicateur de composition. C'est-à-dire, que malgré l'absence de pressions sur les points de suivi, les flores ne soient pas fondamentalement différentes de celle du point référence.

Ceci apporte un biais car nous transposerons des résultats obtenus avec des abondances cellulaires aux résultats obtenus avec des indices pigmentaires, mais une telle étude permettra de mieux cerner la variabilité des flores entre la référence et les points de surveillance. Le principal biais est celui des écarts entre abondances cellulaires et biomasse, mais également le fait que lors des dénombrements, c'est uniquement la fraction microphytoplanctonique qui est dénombrée. Cependant, les comparaisons faites avec les indices de similarité entre une matrice pigmentaire et une matrice d'abondances ont montré que les événements marquants dans la vie d'une population phytoplanctonique étaient bien représentés par les indices BCSI et KI (Sherrard, Nimmo, et Llewellyn 2006).

Validité de la fréquence d'échantillonnage

La dynamique phytoplanctonique peut être extrêmement rapide, un bloom peut apparaître et disparaître en 2 ou 3 jours seulement (R. B. Domingues, Barbosa, et Galvão 2008), donc avec un pas d'échantillonnage de 15 jours au plus serré de la saison productive, nous pouvons rater ces événements et produire de faux indicateurs. Si nous connaissons le risque de rater ces événements, nous pourrions introduire un coefficient de risque dans le choix des niveaux de l'indicateur.

Pour apporter une réponse sur ce point, idéalement il faudrait réaliser une étude avec des flores totales et analyses pigmentaires sur un chantier d'une année au moins, avec une fréquence d'échantillonnage de 3 fois par semaine. Puis un ré-échantillonnage par bootstraps en simulant des prélèvements classiques pourrait nous donner la probabilité de voir échapper un événement majeur.

4.5- Sensibilité à la matrice pigmentaire

Afin de statuer sur la sensibilité des résultats selon le choix du nombre de pigments retenus dans la matrice pigmentaire, nous avons calculé les indices de composition pour la campagne du 31 mai 2012 en Manche orientale avec une matrice réduite aux seuls pigments biomarqueurs représentatifs des principales classes algales : MVc3, MgDVP, peri, fuco, viola, HF, allo et zea. Les indices ainsi obtenus avec la matrice réduite n'ont différé que de un à

quatre centièmes de ceux obtenus avec la matrice complète, et les corrélations entre les indices et les concentrations en chl_a, ont été $r[\text{chl}_a\text{-BCSI}]=-0.96$ et $r[\text{chl}_a\text{-KI}]=-0.95$. Seule la valeur de BCSI pour le point 58 (le plus proche des côtes) est passée de 0.32 à 0.46. Ceci met en évidence le plus fort poids des pigments majoritaires par rapport aux pigments minoritaires.

Il faudra cependant garder à l'esprit qu'une matrice pigmentaire similaire ne veut pas forcément dire les mêmes espèces (de diatomées par exemple) dans l'échantillon. Avec les pigments, nous n'avons pas accès à la diversité spécifique mais à la diversité fonctionnelle.

Pour cette étude nous avons utilisé une matrice avec des concentrations pigmentaires, donc les indices de similarité seront proportionnels à la diversité pigmentaire et aux concentrations observées. Une autre voie qui paraît exploitable dans la mise en place des indices de similarité serait d'utiliser une matrice binaire où seulement figurent les pigments identifiés par HPLC. Nous n'avons pas exploré cette approche qui pourrait constituer une alternative, d'autant plus que tous les dix ans le nombre de pigments identifiés par HPLC est doublé.

4.6- Pressions

Il semble difficile de définir ce qu'est une masse d'eau anthropisée, dystrophique ou perturbée, ce qui constitue un préalable avant de donner des seuils. C'est quoi une bonne qualité ? Est-ce la même sur toutes les côtes et baies ? Puis, comment séparer la part anthropique de celle naturelle ou liée au changement climatique ?

Les facteurs chimiques ne semblent expliquer que 20% de la variabilité du phytoplancton en Manche-Est, laissant une partie prépondérante aux facteurs allélopathiques, de compétition et de broutage (Hernández-Fariñas et al. 2013). Est-il alors judicieux de baser la surveillance sur la capacité de réaction des communautés phytoplanctoniques aux gradients physico-chimiques telles que les concentrations en nutriments et l'eutrophisation ? On serait tenté de dire qu'avec les indices de composition on pourrait intégrer toutes les perturbations et pas seulement l'eutrophisation, mais il deviendrait difficile d'identifier la cause en cas d'écart (manque ou excès de broutage, nouvelles espèces brouteuses, changements métaboliques,...) et l'on sortirait du cadre de la surveillance pour rentrer dans celui des études. Est-ce alors pertinent d'utiliser un indice de composition étant donné la forte réactivité des communautés phytoplanctoniques à d'autres facteurs ?

Il faudra définir très judicieusement les pressions pour la mise en place de cet indice de composition, puis graduer les variations des niveaux de qualité du point référence selon des critères quantifiable et non « à dire d'expert » dans la mesure du possible.

Le travail d'évaluation des pressions est actuellement en cours (Fauré, Chini, et Miossec 2013) et devra permettre à terme de comparer l'évolution des indicateurs par rapport aux pressions et construire les niveaux de qualité pour définir l'état de la masse d'eau. Des grilles avec des pressions composites ont été déjà essayées ailleurs (Devlin et al. 2007; Lugoli et al. 2012), mais ce choix n'a pas été fait en France.

4.7- Grille de niveaux

La mise en place des grilles de niveau de qualité devrait être facilitée par le fait que les indicateurs de similarité BCSI ou KI sont bornés de 0 à 1. Cette phase représente l'une de plus difficiles à mettre en place à cause du manque de recul pour quantifier les niveaux.

Nous pourrions être tentés de définir ce qui est une « bonne » ou une « mauvaise » composition phytoplanctonique par des pourcentages de cyanophycées ou des cryptophycées qui rentreraient dans la composition du peuplement, mais ces événements, qui peuvent avoir une mauvaise connotation pour les activités humaines, ne représentent pas forcément une dégradation de la qualité d'une masse d'eau. D'où la comparaison avec une référence, qui cependant peut ne pas être similaire d'un point de vue de composition phytoplanctonique à celle du point de surveillance. La forte variabilité des peuplements phytoplanctoniques fait qu'aucun point de surveillance ne sera jamais égal au point référence, même en absence de pressions, car le phytoplancton est capable de réagir très rapidement en fonctions des changements de l'environnement et sur des périodes très courtes.

Pour définir les grilles des indicateurs de biomasse et d'abondances, la communauté scientifique disposait de plus de 20 ans de données des réseaux nationaux. Il a été donc possible de réaliser des statistiques et simulations pour statuer sur la variabilité des descripteurs. Pour les pigments ce n'est pas le cas et aucune base de données ne nous permet d'apprécier comment borner la grille de niveaux de qualité. Il faudra attendre au moins une période de 6 années pour commencer à avoir suffisamment des données pour comprendre leur variabilité et ajuster les grilles.

Notre proposition de mise en place de deux chantiers d'études avec des analyses pigmentaires (atlantique et Manche) permettra d'appliquer les indicateurs proposées en conditions réelles, d'envisager d'autres indicateurs pigmentaires, et si le résultat est satisfaisant d'étendre le protocole obtenu sur tous les points de surveillance DCE en atlantique et Manche. Au but du premier plan il sera possible alors de conclure à la pertinence de ces indicateurs sur l'ensemble de ces deux façades.

5.- CONCLUSION

La présente étude, réalisée avec les données pigmentaires existantes sur le PCAF et la Manche orientale suggère que l'indice de Bray-Curtis (BCSI) pourrait répondre aux atteintes d'un indice de composition à travers la matrice pigmentaire. Il pourrait mettre en évidence les dérives (anthropiques et non anthropiques) des points de suivi côtier par rapport à un point « référence » en tenant compte de la composition des flores phytoplanctoniques. Nous avons testé cet indice dans les eaux du plateau continental atlantique et en Manche en utilisant les nutriments et la biomasse chlorophyllienne comme indicateurs de pression, où il a bien répondu aux gradients de pressions et aux changements de la composition du peuplement à travers leurs profils pigmentaires.

Nous déconseillons l'utilisation de CHEMTAX pour la mise en œuvre d'un indice de composition à cause du degré d'expertise nécessaire pour obtenir des résultats cohérents. Il n'est pas envisageable d'utiliser une matrice pigmentaire « type » ni pour l'année, ni pour une saison. Elle ne peut être définie qu'après une étude des conditions environnementales locales et une observation des communautés phytoplanctoniques, ce qui rend CHEMTAX très adapté pour les études, mais difficilement applicable à un indicateur dans un réseau de surveillance.

Cette étude constitue une première approche dans le choix d'un indice de composition et devra être validée sur les domaines suivants :

- mise en chantier sur des points de surveillance DCE pendant une année,
- définition des pressions et grille d'application,
- étude de la pertinence des points référence actuels,
- étude sur le biais lié à la fréquence (incertitude) de l'échantillonnage actuel.

La mise en place d'un chantier en Atlantique et un chantier en Manche pourrait être le bon compromis à cause des différences dans les peuplements phytoplanctoniques. Chaque chantier devrait idéalement compter au moins trois points de surveillance, plus un point référence.

Remerciements

Nous remercions M. Frédéric Jourdin et Mme. Joëlle Tassel du Service d'Hydrographie et Océanographie de la Marine (EPA SHOM) pour les données des campagnes Modycot-Turbi 2003.1 en Atlantique, ainsi qu'à M. Félipe Artigas et Mme. Nicole Desgros respectivement de l'UMR 8187-ULCO et de l'UMR 8187-CNRS à Wimereux pour les données concernant les campagnes Dyphyma 2012 du projet INTERREG IV A "2 mers" DYMAPHY en Manche orientale.

BIBLIOGRAPHIE

- Andersen, Jesper H., Louise Schlüter, et Gunni Ærtebjerg. 2006. « Coastal Eutrophication: Recent Developments in Definitions and Implications for Monitoring Strategies ». *Journal of Plankton Research* 28 (7): 621-28. doi:10.1093/plankt/fbl001.
- Andersen, R. A., R. R. Bidigare, M. D. Keller, et M. Latasa. 1996. « A comparison of HPLC pigment signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the North Atlantic and Pacific Oceans ». *Deep-sea research. Part 2. Topical studies in oceanography* 43 (2-3): 517-37.
- Andersen, Robert A., Gary W. Sounders, Michael P. Paskind, et Julianne P. Sexton. 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.1 ». *Journal of Phycology* 29 (5): 701-15. doi:10.1111/j.0022-3646.1993.00701.x.
- Arhonditsis, G., M. Karydis, et G. Tsirtsis. 2003. « Analysis of Phytoplankton Community Structure Using Similarity Indices: A New Methodology for Discriminating Among Eutrophication Levels in Coastal Marine Ecosystems ». *Environmental Management* 31 (5): 0619-32. doi:10.1007/s00267-002-2903-4.
- Barlow, R.G., R.F.C. Mantoura, M.A. Gough, et T.W. Fileman. 1993. « Pigment signatures of the phytoplankton composition in the northeastern Atlantic during the 1990 spring bloom ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 40 (1-2): 459-77. doi:10.1016/0967-0645(93)90027-K.
- Belin, Catherine, Alice Lamoureux, et Dominique Soudant. 2014. *Evaluation de la qualité des eaux littorales de la France métropolitaine pour l'élément de qualité Phytoplancton dans le cadre de la DCE. Etat des lieux des règles d'évaluation, et résultats pour la période 2007-2012. Tome 1 - Etat des lieux, méthodes et synthèse des résultats*. Scientifique et technique Rapport DYNECO / VIGIES / 14-05 – Tome 1. Nantes: IFREMER. <http://envlit.ifremer.fr/content/download/81901/580117/version/3/file/Evaluation+DCE+phytoplancton+2007-2012++Tome+1.pdf>.
- Birk, Sebastian, Wendy Bonne, Angel Borja, Sandra Brucet, Anne Courrat, Sandra Poikane, Angelo Solimini, Wouter van de Bund, Nikolaos Zampoukas, et Daniel Hering. 2012. « Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive ». *Ecological Indicators* 18 (juillet): 31-41. doi:10.1016/j.ecolind.2011.10.009.
- Borcard, Daniel, François Guillet, et Pierre Legendre. 2011. *Numerical Ecology with R*. Use R! Springer.
- Bricker, S. B., B. Longstaff, W. Dennison, A. Jones, K. Boicourt, C. Wicks, et J. Woerner. 2008. « Effects of nutrient enrichment in the nation's estuaries: A decade of change ». *Harmful Algae, HABS and Eutrophication*, 8 (1): 21-32. doi:10.1016/j.hal.2008.08.028.
- Buchet, Remi. 2010. *Directive Cadre sur l'Eau : Consolidation des conditions de référence pour les éléments de qualité biologiques impliqués dans l'évaluation des masses d'eau littorales - Convention 2009 - Action 2*. Nantes: Ifremer. <https://w3.ifremer.fr/archimer/doc/00019/12986/>.
- Cailliau, C., H. Claustre, et S. Giannino. 1997. « Chemotaxonomic Analysis of Phytoplankton Distribution in the Indian Sector of the Southern Ocean during Late Austral Summer ». *Oceanologica Acta* 20 (5): 721-32.
- Carlson, Robert E. 1977. « A trophic state index for lakes ». *Limnology and Oceanography* 22 (2): 361-69.

- Clarke, K.Robert, et R.M. Warwick. 1994. « Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation. 2nd Edition ». Plymouth Marine Laboratory.
- Claustre, Hervé, Philippe Kerhervé, Jean Claude Marty, Louis Prieur, Christianne Videau, et Jean-Henri Hecq. 1994. « Phytoplankton dynamics associated with a geostrophic front: Ecological and biogeochemical implications ». *Journal of Marine Research* 52 (4): 711-42. doi:10.1357/0022240943077000.
- Claustre, Hervé, et Jean-Claude Marty. 1995. « Specific phytoplankton biomasses and their relation to primary production in the tropical North Atlantic ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 42 (8): 1475-93. doi:10.1016/0967-0637(95)00053-9.
- Cloern, James E., Ch. Grenz, et L. Vidergar-Lucas. 1995. « An empirical model of the phytoplankton chlorophyll : carbon ratio-the conversion factor between productivity and growth rate ». *Limnology and Oceanography*, n° 7: 11310-13.
- Cloern, James E., Tara S. Schraga, Cary B. Lopez, Noah Knowles, R.G. Labiosa, et Richard Dugdale. 2005. « Climate anomalies generate an exceptional dinoflagellate bloom in San Francisco Bay ». *GEOPHYSICAL RESEARCH LETTERS* 32 (L14608): 1-5. doi:10.1029/2005GL023321.
- Danilov, Roman, et N. G. A. Ekelund. 1999. « The efficiency of seven diversity and one similarity indices based on phytoplankton data for assessing the level of eutrophication in lakes in central Sweden ». *Science of The Total Environment* 234 (1-3): 15-23. doi:10.1016/S0048-9697(99)00163-1.
- Devlin, Michelle, Jon Barry, Suzanne Painting, et Mike Best. 2009. « Extending the phytoplankton tool kit for the UK Water Framework Directive: indicators of phytoplankton community structure ». *Hydrobiologia* 633 (1): 151-68. doi:10.1007/s10750-009-9879-5.
- Devlin, Michelle, Mike Best, Deborah Coates, Eileen Bresnan, Shane O'Boyle, Richard Park, Joe Silke, Caroline Cusack, et Joe Skeats. 2007. « Establishing boundary classes for the classification of UK marine waters using phytoplankton communities ». *Marine Pollution Bulletin* 55 (1-6): 91-103. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.09.018.
- Dillon, P. J., et Richard Albert Vollenweider. 1974. *Application of the Phosphorus Loading Concept to Eutrophication Research*. Ottawa: National Research Council of Canada, NRC Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality.
- Domingues, Catia M., John A. Church, Neil J. White, Peter J. Gleckler, Susan E. Wijffels, Paul M. Barker, et Jeff R. Dunn. 2008. « Improved estimates of upper-ocean warming and multi-decadal sea-level rise ». *Nature* 453 (7198): 1090-93. doi:10.1038/nature07080.
- Domingues, Rita B., Ana Barbosa, et Helena Galvão. 2008. « Constraints on the use of phytoplankton as a biological quality element within the Water Framework Directive in Portuguese waters ». *Marine Pollution Bulletin* 56 (8): 1389-95. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.05.006.
- Fauré, Sandra, Nicolas Chini, et Laurence Miossec. 2013. *Directive Cadre sur l'Eau : les pressions anthropiques et leur impact sur les indicateurs de l'état écologique des masses d'eau littorales de la façade Manche-Atlantique. Synthèse : bilan des deux années d'étude*. Scientifique et technique. Nantes: Ifremer/Hocer.
- Ferreira, João G., Jesper H. Andersen, Angel Borja, Suzanne B. Bricker, Jordi Camp, Margarida Cardoso da Silva, Esther Garcés, et al. 2010. *MARINE STRATEGY FRAMEWORK DIRECTIVE Task Group 5 Report Eutrophication*. Scientifique et technique EUR 24338 EN - 2010. Italy: CIEM - ICES.
- . 2011. « Overview of eutrophication indicators to assess environmental status within the European Marine Strategy Framework Directive ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 93 (2): 117-31. doi:10.1016/j.ecss.2011.03.014.
- Gaedke, Ursula. 1992. « The size distribution of plankton biomass in a large lake and its seasonal variability ». *Limnology and Oceanography* 37 (6): 1202-20.
- Garmendia, Maialen, Ángel Borja, Javier Franco, et Marta Revilla. 2013. « Phytoplankton composition indicators for the assessment of eutrophication in marine waters: Present state and

- challenges within the European directives ». *Marine Pollution Bulletin* 66 (1–2): 7–16. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.10.005.
- Geider, R. J., H.L. MacIntyre, et Todd M. Kana. 1997. « Dynamic model of phytoplankton growth and acclimation: responses of the balanced growth rate and the chlorophyll a:carbon ratio to light, nutrient-limitation and temperature ». *Marine Ecology Progress Series* 148 (février): 187–200. doi:10.3354/meps148187.
- Gieskes, W. W. C., et G. W. Kraay. 1983. « Dominance of Cryptophyceae during the Phytoplankton Spring Bloom in the Central North Sea Detected by HPLC Analysis of Pigments ». *Marine Biology* 75 (2-3): 179–85. doi:10.1007/BF00406000.
- Gieskes, W.W.C., G.W. Kraay, A. Nontji, D. Setiapermana, et Sutomo. 1988. « Monsoonal alternation of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of the euphotic zone of the banda sea (Indonesia): a mathematical analysis of algal pigment fingerprints ». *Netherlands Journal of Sea Research* 22 (2): 123–37. doi:10.1016/0077-7579(88)90016-6.
- Gin, Karina Yew-Hoong, Xiaohua Lin, et Sheng Zhang. 2000. « Dynamics and Size Structure of Phytoplankton in the Coastal Waters of Singapore ». *Journal of Plankton Research* 22 (8): 1465–84. doi:10.1093/plankt/22.8.1465.
- Goffart, Anne, et Bruno Andral. 2014. *Validation de l'indice composition IC MEDIT dans des masses d'eau côtières méditerranéennes caractérisées par un gradient croissant d'eutrophisation*. Scientifique et technique Action Indice Composition. Livrable n° B. ONEMA.
- Gowen, R. J., P. Tett, et K.T. Jones. 1992. « Predicting marine eutrophication: the yield of chlorophyll from nitrogen in Scottish coastal waters ». *Marine Ecology Progress Series* 85: 153–61.
- Helbling, E.W., V. Villafañe, et O. Holm-Hansen. 1991. « Effect of iron on productivity and size distribution of Antarctic phytoplankton ». *Limnology and Oceanography* 36 (8): 1879–85.
- Henriksen, Peter. 2009. « Reference Conditions for Phytoplankton at Danish Water Framework Directive Intercalibration Sites ». *Hydrobiologia* 629 (1): 255–62. doi:10.1007/s10750-009-9767-z.
- Hernández-Fariñas, Tania, Dominique Soudant, Laurent Barillé, Catherine Belin, Alain Lefebvre, et Cédric Bacher. 2013. « Temporal Changes in the Phytoplankton Community along the French Coast of the Eastern English Channel and the Southern Bight of the North Sea ». *ICES Journal of Marine Science: Journal Du Conseil*, novembre, fst192. doi:10.1093/icesjms/fst192.
- Higgins, Harry W., Simon W. Wright, et Louise Schlüter. 2011. « Quantitative Interpretation of Chemotaxonomic Pigment Data ». In *Phytoplankton Pigments: Characterization and Applications in Oceanography*, Cambridge University Press. Suzanne Roy, Carole Llewellyn, Einar Skarstad Egeland and Geir Johansen.
- Irigoiien, X., Bettina Meyer, R. Harris, et D. Harbour. 2004. « Using HPLC pigment analysis to investigate phytoplankton taxonomy: the importance of knowing your species ». *Helgoland Marine Research*, 58: 77–82.
- Jaanus, Andres, Kaire Toming, Seija Hällfors, Kaire Kaljurand, et Inga Lips. 2009. « Potential Phytoplankton Indicator Species for Monitoring Baltic Coastal Waters in the Summer Period ». *Hydrobiologia* 629 (1): 157–68. doi:10.1007/s10750-009-9768-y.
- Jeffrey, S. W. 1961. « Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae ». *Biochemical Journal* 80 (2): 336–42.
- . 1968. « Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 162 (2): 271–85. doi:10.1016/0005-2728(68)90109-6.
- Jeffrey, S. W., R. F. C. Mantoura, S. W. Wright, International Council of Scientific Unions Scientific Committee on Oceanic Research, et Unesco. 1997. *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. UNESCO Publishing.
- Lampert, L., B. Quéguiner, T. Labasque, A. Pichon, et N. Lebreton. 2002. « Spatial variability of phytoplankton composition and biomass on the eastern continental shelf of the Bay of Biscay (north-east Atlantic Ocean). Evidence for a bloom of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) in

- spring 1998 ». *Continental Shelf Research* 22 (8): 1225-47. doi:10.1016/S0278-4343(01)00103-0.
- Lampert, Luis. 2001. « Dynamique saisonnière et variabilité pigmentaire des populations phytoplanctoniques dans l'atlantique nord (Golfe de Gascogne) ». Thèse de 3eme cycle, Brest, France: Université de Bretagne Occidentale.
- . 2014a. *CHEMOTAXONOMIE PIGMENTAIRE - Initiation aux calculs appliqués au phytoplancton*. Scientifique et technique ODE/DYNECO/PELAGOS 2014-02. Brest, France: IFREMER. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00226/33714/32130.pdf>.
- . 2014b. *Etude chémotaxonomique des campagnes du projet européen DYMAPHY (2012)*. Rapport scientifique et technique RST.DYNECO n° 2014-01. Brest, France: IFREMER.
- Lauridsen, T. L., L. Schlüter, et L. S. Johansson. 2011. « Determining Algal Assemblages in Oligotrophic Lakes and Streams: Comparing Information from Newly Developed Pigment/chlorophyll a Ratios with Direct Microscopy ». *Freshwater Biology* 56 (8): 1638-51. doi:10.1111/j.1365-2427.2011.02588.x.
- Legendre, Pierre, et Louis Legendre. 1998. *Numerical Ecology*. Elsevier Science B.V. Developments in Environmental Modelling 20. Amsterdam: Elsevier.
- Lohrenz, Steven E., Gary L. Fahnenstiel, Donald G. Redalje, Gregory A. Lang, Michael J. Dagg, Terry E. Whittedge, et Quay Dortch. 1999. « Nutrients, irradiance, and mixing as factors regulating primary production in coastal waters impacted by the Mississippi River plume ». *Continental Shelf Research* 19 (9): 1113-41. doi:10.1016/S0278-4343(99)00012-6.
- Lugoli, F., M. Garmendia, S. Lehtinen, P. Kauppila, S. Moncheva, M. Revilla, L. Roselli, et al. 2012. « Application of a new multi-metric phytoplankton index to the assessment of ecological status in marine and transitional waters ». *Ecological Indicators* 23 (décembre): 338-55. doi:10.1016/j.ecolind.2012.03.030.
- Mackey, D.J., H.W. Higgins, M.D. Mackey, et D. Holdsworth. 1998. « Algal class abundances in the western equatorial Pacific: Estimation from HPLC measurements of chloroplast pigments using CHEMTAX ». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 45 (9): 1441-68. doi:10.1016/S0967-0637(98)00025-9.
- Mackey, M.D., D.J. Mackey, H.W. Higgins, et S.W. Wright. 1996. « CHEMTAX - a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton ». *Marine Ecology Progress Series* 144 (décembre): 265-83. doi:10.3354/meps144265.
- Magurran, Anne. 2004. « Measuring Biological Diversity ». Second ed. Blackwell Science, Oxford.
- Mouillot, D., S. Spatharis, S. Reizopoulou, T. Laugier, L. Sabetta, A. Basset, et T. Do Chi. 2006. « Alternatives to Taxonomic-Based Approaches to Assess Changes in Transitional Water Communities ». *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 16 (5): 469-82. doi:10.1002/aqc.769.
- Nielsen, Kurt, Bent Sømmod, Christina Ellegaard, et Dorte Krause-Jensen. 2003. « Assessing Reference Conditions According to the European Water Framework Directive Using Modelling and Analysis of Historical Data: An Example from Randers Fjord, Denmark ». *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 32 (4): 287-94. doi:10.1579/0044-7447-32.4.287.
- Nixon, Scott W. 1995. « Coastal Marine Eutrophication A Definition, Social Causes, And Future Concerns ». *Ophelia* 41: 199-219.
- Painting, S. J., M. J. Devlin, S. I. Rogers, D. K. Mills, E. R. Parker, et H. L. Rees. 2005. « Assessing the suitability of OSPAR EcoQOs for eutrophication vs ICES criteria for England and Wales ». *Marine Pollution Bulletin* 50 (12): 1569-84. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.06.042.
- Peeken, Ilka. 1997. « Photosynthetic pigment fingerprints as indicators of phytoplankton biomass and development in different water masses of the Southern Ocean during austral spring ». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 44 (1-2): 261-82. doi:10.1016/S0967-0645(96)00077-X.

- Ramade, François. 1993. *Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement*. Ediscience International.
- Rodríguez, Jaime, Joaquín Tintoré, John T. Allen, José Ma Blanco, Damià Gomis, Andreas Reul, Javier Ruiz, Valeriano Rodríguez, Fidel Echevarría, et Francisco Jiménez-Gómez. 2001. « Mesoscale Vertical Motion and the Size Structure of Phytoplankton in the Ocean ». *Nature* 410 (6826): 360-63. doi:10.1038/35066560.
- Rothenberger, Meghan B., JoAnn M. Burkholder, et Thomas R. Wentworth. 2009. « Use of long-term data and multivariate ordination techniques to identify environmental factors governing estuarine phytoplankton species dynamics ». *Limnology and Oceanography* 54 (6): 2107-27. doi:10.4319/lo.2009.54.6.2107.
- Rott, Dr Eugen. 1981. « Some Results from Phytoplankton Counting Intercalibrations ». *Schweizerische Zeitschrift Für Hydrologie* 43 (1): 34-62. doi:10.1007/BF02502471.
- Roy, Suzanne. 2011. *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*. Cambridge University Press.
- Ryther, J. H., et W. M. Dunstan. 1971. « Nitrogen, Phosphorus, and Eutrophication in the Coastal Marine Environment ». *Science (New York, N.Y.)* 171 (3975): 1008-13.
- Sagert, Sigrid, Dorte Krause Jensen, Peter Henriksen, Thorsten Rieling, et Hendrik Schubert. 2005. « Integrated ecological assessment of Danish Baltic Sea coastal areas by means of phytoplankton and macrophytobenthos ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 63 (1-2): 109-18. doi:10.1016/j.ecss.2004.10.014.
- Schlüter, L., F. Mohlenberg, H. Havskum, et S. Larsen. 2000. « The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios ». *Marine Ecology Progress Series* 192 (janvier): 49-63. doi:10.3354/meps192049.
- Serra, T., T. Granata, J. Colomer, A. Stips, F. Møhlenberg, et X. Casamitjana. 2003. « The role of advection and turbulent mixing in the vertical distribution of phytoplankton ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56 (1): 53-62. doi:10.1016/S0272-7714(02)00120-8.
- Sherrard, N J, M Nimmo, et C A Llewellyn. 2006. « Combining HPLC Pigment Markers and Ecological Similarity Indices to Assess Phytoplankton Community Structure: An Environmental Tool for Eutrophication? ». *The Science of the Total Environment* 361 (1-3): 97-110. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.08.058.
- Sieburth, J.M.C.N., Victor Smetacek, et Jürgen Lenz. 1978. « Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions ». *Limnology and Oceanography* 23 (6): 1256-63.
- Spatharis, Sofie, Daniel L. Roelke, Panayiotis G. Dimitrakopoulos, et Giorgos D. Kokkoris. 2011. « Analyzing the (mis)behavior of Shannon Index in Eutrophication Studies Using Field and Simulated Phytoplankton Assemblages ». *Ecological Indicators* 11 (2): 697-703. doi:10.1016/j.ecolind.2010.09.009.
- Spatharis, Sofie, et George Tsirtsis. 2010. « Ecological quality scales based on phytoplankton for the implementation of Water Framework Directive in the Eastern Mediterranean ». *Ecological Indicators* 10 (4): 840-47. doi:10.1016/j.ecolind.2010.01.005.
- Spatharis, Sofie, George Tsirtsis, Daniel B. Danielidis, Thang Do Chi, et David Mouillot. 2007. « Effects of pulsed nutrient inputs on phytoplankton assemblage structure and blooms in an enclosed coastal area ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 73 (3-4): 807-15. doi:10.1016/j.ecss.2007.03.016.
- Tamigneaux, E., L. Legendre, B. Klein, et M. Mingelbier. 1999. « Seasonal Dynamics and Potential Fate of Size-fractionated Phytoplankton in a Temperate Nearshore Environment (Western Gulf of St Lawrence, Canada) ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 48 (2): 253-69. doi:10.1006/ecss.1999.0416.
- Tett, Paul, Richard Gowen, Dave Mills, Teresa Fernandes, Linda Gilpin, Mark Huxham, Kevin Kennington, et al. 2007. « Defining and detecting undesirable disturbance in the context of

- marine eutrophication ». *Marine Pollution Bulletin*, Implementation of the Water Framework Directive in European marine waters, 55 (1–6): 282-97.
doi:10.1016/j.marpolbul.2006.08.028.
- Vadrucci, M.R., M. Cabrini, et A. Basset. 2007. « Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion ». *Transitional Waters Bulletin*, n° 2: 83-102. doi:10.1285/i1825229Xv1n2p83.
- Van Heukelem, Laurie, et Crystal S Thomas. 2001. « Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments ». *Journal of Chromatography A* 910 (1): 31-49. doi:10.1016/S0378-4347(00)00603-4.
- Vidussi, Francesca, Hervé Claustre, Beniamino B. Manca, Anna Luchetta, et Jean-Claude Marty. 2001. « Phytoplankton Pigment Distribution in Relation to Upper Thermocline Circulation in the Eastern Mediterranean Sea during Winter ». *Journal of Geophysical Research: Oceans* 106 (C9): 19939-56. doi:10.1029/1999JC000308.
- Washington, H. G. 1984. « Diversity, biotic and similarity indices: A review with special relevance to aquatic ecosystems ». *Water Research* 18 (6): 653-94. doi:10.1016/0043-1354(84)90164-7.
- Weis, Jerome J., Bradley J. Cardinale, Kenneth J. Forshay, et Anthony R. Ives. 2007. « Effects of Species Diversity on Community Biomass Production Change over the Course of Succession ». *Ecology* 88 (4): 929-39.
- Wilby, R. L., Harriet Orr, M. Hedger, D. Forrow, et M. Blackmore. 2006. « Risks posed by climate change to the delivery of the Water Framework Directive objectives in teh UK. » *Environment International* 32 (8): 1043-55.
- Wright, S.W., Thomas DP, Marchant HJ, Higgins HW, Mackey MD, et Mackey DJ. 1996. « Analysis of phytoplankton of the Australian sector of the Southern Ocean: comparisons of microscopy and size frequency data with interpretations of pigment HPLC data using the "CHEMTAX" matrix factorisation program ». *Marine Ecology Progress Series* 144 (décembre): 285-98. doi:10.3354/meps144285.
- Yuneev, Oleg A., Jacob Carstensen, Snejana Moncheva, Aleksey Khaliulin, Gunni Ærtebjerg, et Scott Nixon. 2007. « Nutrient and phytoplankton trends on the western Black Sea shelf in response to cultural eutrophication and climate changes ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 74 (1–2): 63-76. doi:10.1016/j.ecss.2007.03.030.
- Zapata, Manuel, Bente Edvardsen, Francisco Rodriguez, Miguel A. Maestro, et Jos L. Garrido. 2001. « Chlorophyll c2 monogalactosyldiacylglyceride ester (chl c2-MGDG). A novel marker pigment for *Chrysochromulina* species (Haptophyta) ». *Marine Ecology Progress Series* 219 (septembre): 85-98. doi:10.3354/meps219085.
- Zapata, M, F Rodríguez, et JI Garrido. 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

I. Abréviations utilisées

Abv. Utilisé	SCOR WG78 abv.	Nom Pigment
c3	chl c3	Chlorophylle c3
MVc3	MV chl c3	Monovinyl chl c3
c2	chl c2	Chlorophylle c2
MgDVP	Mg DVP	Mg 3,8-divinyl pheoporpyrine
c1	chl c1	Chlorophylle c1
c1c2	---	Chlorophylls c1+c2
peri	perid	Peridinine
BF, 19BF	but-fuco	19'-Butanoyloxyfucoxanthine
fuco	fuco	Fucoxanthine
k-fuco	4 k-hex-fuco	4-Keto-19'-hexanoyloxyfucoxanthine
prasi	pras	Prasinoxanthine
viola	viola	Violaxanthine
HF, 19HF	hex-fuco	19'-Hexanoyloxyfucoxanthine
Diadino, ddx	diadino	Diadinoxanthine
dino	dino	Dinoxanthine
allo	allo	Alloxanthine
diato	diato	Diatoxanthine
D+D	diadino+diato	Diadinoxanthine + Diatoxanthine
zea	zea	Zeaxanthine
lute	lut	Luteine
chlb	chl b	chlorophylle b totale
chla	chl a	chlorophylle a totale
bbCar	b,b-car	b,b-Carotene (β -carotene)

PCAF = Plateau Continental Atlantique Français

NO₃ = Nitrate

NO₂ = Nitrite

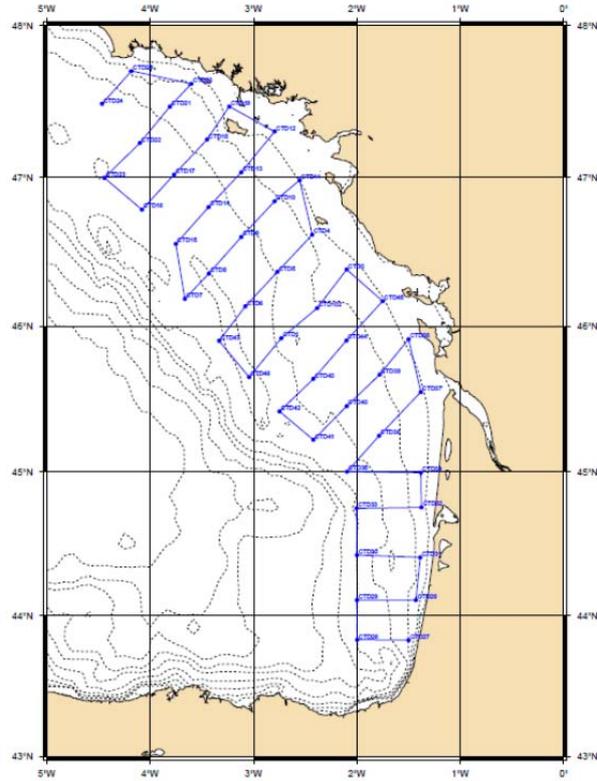
NH₄ = Ammonium

PO₄ = Phosphate

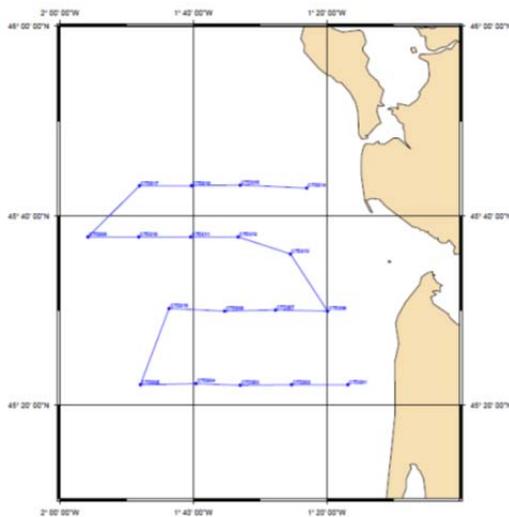
SiOH₄ = Ortho-silicate

II.- Campagnes marines

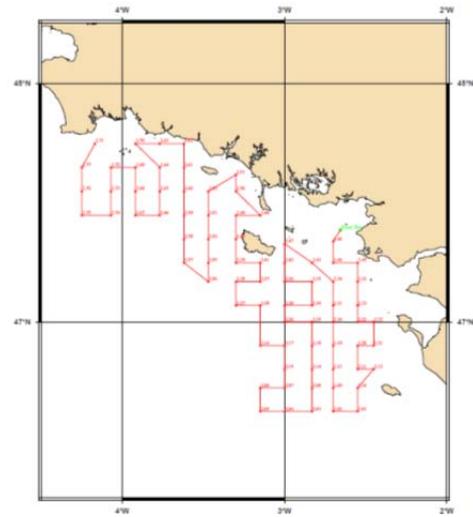
Campagne MODYCOT-TURBI 2003.1 – EPA SHOM



Réseau R1 : 6 au 10 avril 2003

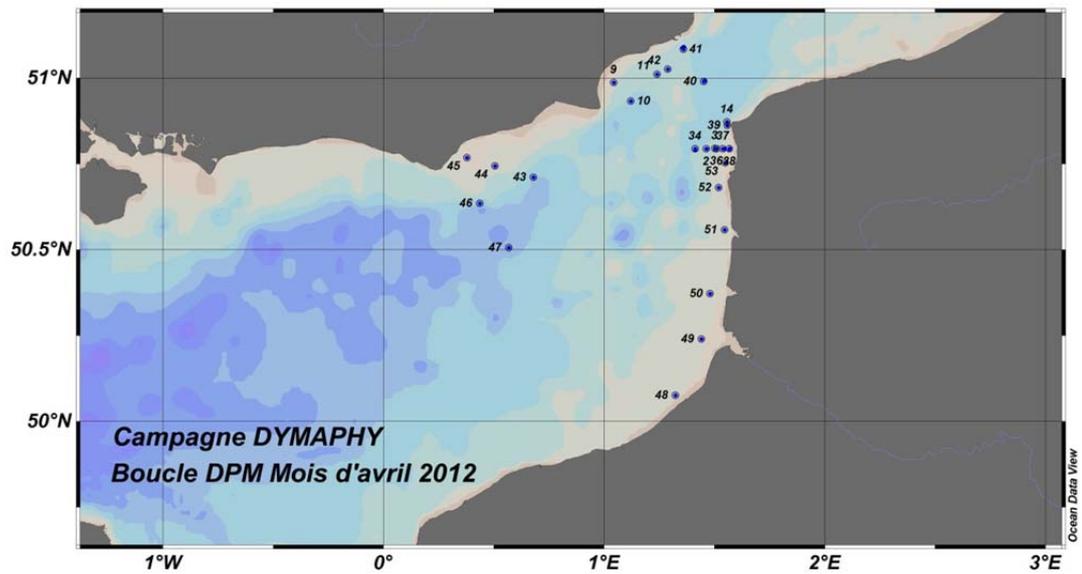


Réseau R2 Gironde : 1^{er} avril 2003

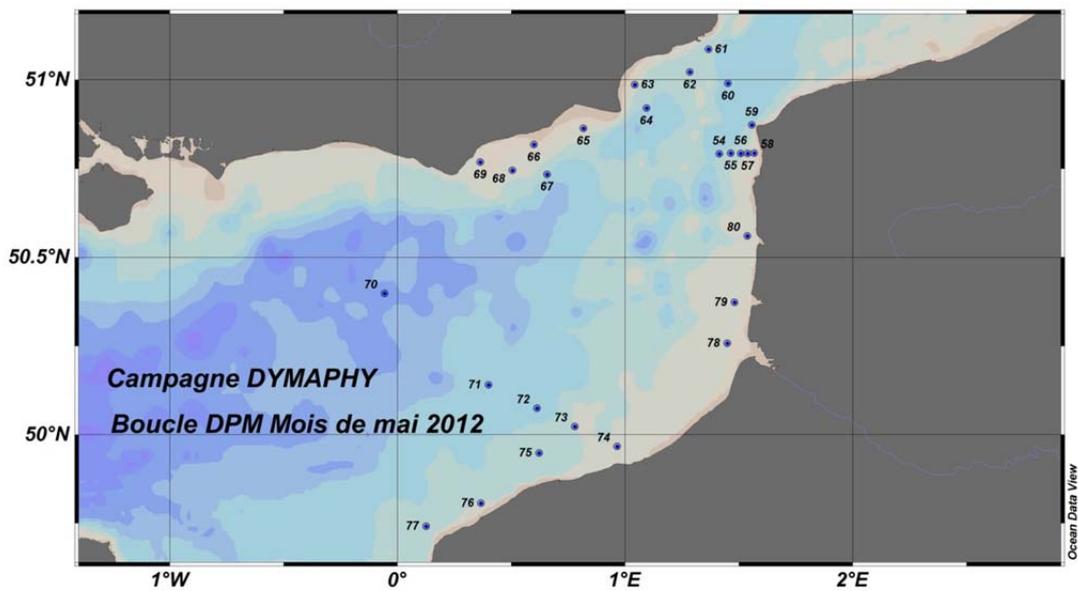


Réseau R2 Loire : 27 au 30 mars 2003

Campagnes DYPHYMA 2012 du projet INTERREG IV A « 2 Mers » DYMAPHY



Echantillonnage des stations DPM 1 à DPM 53 : 20 au 29 avril 2012



Echantillonnage des stations DPM 54 à DPM 80 : 31 mai au 4 juin 2012

III.- Tableau A1 : Synthèse des travaux sur les indices écologiques et indices de composition dans la bibliographie

Auteur	Année	Pigmts	Ic	Application	Indices	Calculés sur	Données utilisées	sites	Pressions	Obs.
Karydis et Tsirtsis	1996		non	ET-EC	12 indices écologiques	comptages	???	Grèce	sites oligo, meso et eutrophiés	
Vollenweider	1998	non	non	EC	Trix, TRBIX, GMQI	Chla, O ₂ , SN pigments	1982 à 1993	Cote italienne		Pas de phyto
Pearl	2003	oui	non	ET-EC	non		1999, 2000	Neuse stuary (USA)	non	Utilisation basique de pigments
Sherrard	2006	oui	oui	EC	Bray-curtis et autres	comptages + pigments	4 ans	UK (L4 Plymouth)	non	Comparaison 6 indices similarité calculés avec biomasses et matrice pigments
Devlin	2007		oui	EC	ISS-phyto	comptage 4 classes Z scores	> 10 ans	UK + Eire	classes de risque (x3)	Transposable aux pigments
Tett	2008		oui	EC ?	PCI	comptages diato/dinos	1975 à 2005	3 sites	non	Il semble compliqué !
Domingues	2008					Synthèse problèmes DCE et utilisation phyto, limites, conseils.				
Tsirtsis	2008		oui mais...	ET-EC	lognormal	comptages	???	Grèce	sites oligo, meso et eutrophiés	
Devlin	2009		oui	ET-EC	Richesse + occurrence	comptage phyto 20 sp plus communes	1992 à 2003	UK (x12)	catégorie risques	
Giordani	2009		non	ET-EC	TWQI	Chla, O ₂ , SN, phanerogames	1989 à 2004	Méditerranée	SN, trophic levels	Pas de phyto
Piacnik	2009		non	lacs	TI (trophic index)	comptages	REBECCA (Norway laks)	plusieurs	TP (phosphore total)	
Spatharis	2010		oui	EC	Indice diversité et IPI	Chla, comptages et SN (4)	1 an	9 sites Méditerranée	SN (N, P)	(1) utilise des données des communautés synthétiques et pas réelles
Soudant	2011		non	ET-EC	Richesse + dominance	Frot Rephy	2004, à 2009	6 sites en France	non	
Lauridssen	2011		oui	Eau douce	non	comptages et pigments		Juste comparaisons HPLC-Chemtax Vs. Comptages ==> pas toujours bien		
Lugoli	2012		non	ET-EC	ISS-phyto	6 classes de taille	comptages + biovolumes	4 sites	qualitatif avec scores	calcul de données sur 1 jour/site
Pachés	2012		Phymed	ET-EC	Phymed	comptages classes	comptages + biovol. 300 x 100	plusieurs	Prot	sur plusieurs années. 1/mois
WISER	2012		oui	EC	correlation ANOVA's	pigments - Chemtax	1997, 1998, 2000	+ de 10 sites en Europe	TN, TP	N aboutit à rien
Ferreira	2012				Synthèse indices et problèmes pour la DCSMM. Préconisations pour développements des outils de monitoring					
Garmendia	2013				Synthèse des indices et problèmes liés à la DCE					
Goffart	2014		oui	EC	IC medit	Diato, dino, crypto, cyanos par HPLC	2012-2013	4 en Corse et 4 PACA	non	Comparaisons avec courbes type comme Devlin 2007

IV.- Tableau A2 : jeux de données en pigments et nutriments concernant les échantillons de la Loire et de la Gironde lors de la campagne Modycot 2003 (mars-avril 2003)

ech	date	HH	Lon	Lat	Zfond	Pigments (ng/L)										Nutriments (µM)						
						c3	c1c2	peri	19BF	fuco	19HF	prasi	ddx	allo	chlb	chla	NO3	Si	NO2	P04	turbi	
Loire	L 2	28/03/2003	07:48	-2.6988	46.621	73	163	225	44	0	95	60	0	19	25	145	591					
Loire	L 13	28/03/2003	09:30	-2.7012	46.799	56.4	87	96	21	0	43	41	0	0	0	61	339					
Loire	L 16	29/03/2003	08:45	-3.1483	46.9	80	402	542	113	43	129	231	0	48	24	309	1056					
Loire	L 18	28/03/2003	22:48	-2.8267	46.9	57.3	0	95	38	0	25	36	0	0	0	73	240					
Loire	L 34	28/03/2003	11:44	-2.7002	47.171	23.9	123	143	60	0	64	78	0	24	25	40	362					
Loire	L 38	29/03/2003	13:25	-3.2983	47.17	85	134	184	28	0	57	106	0	0	19	128	507					
Loire	L 47	28/03/2003	15:05	-2.9972	47.327	27.5	203	260	0	0	197	130	0	25	27	92	604					
Loire	L 67	30/03/2003	14:15	-3.92	47.45	100	152	263	64	31	79	60	0	28	33	120	654					
Loire	L 69	30/03/2003	15:40	-3.9213	47.642	58	96	103	50	0	51	40	0	0	33	65	302					
Gironde	G 1	01/04/2003	20:30	1.28	45.369	32	0	233	0	0	198	0	0	26	14	78	841					
Gironde	G 7	01/04/2003	13:20	1.461	45.501	40	0	53	0	0	14	37	0	0	0	45	138					
Gironde	G 10	01/04/2003	09:00	1.803	45.63	67	143	98	0	0	27	101	0	0	0	67	293	0.413	1.327	0.101	0.000	0.140
Gironde	G 11	01/04/2003	10:00	1.673	45.63	55	113	115	0	0	38	75	0	0	0	89	291	1.945	1.864	0.082	0.000	0.480
Gironde	G 12	01/04/2003	10:45	1.554	45.63	43.5	153	181	65	0	90	52	0	17	0	75	384	7.375	4.800	0.150	0.028	1.700
Gironde	G 13	01/04/2003	11:45	1.424	45.6	28.5	0	250	55	0	246	0	40	27	16	64	706	15.984	6.828	0.189	0.028	6.000
Gironde	G 15	01/04/2003	05:22	1.549	45.721	44	614	1071	30	0	785	0	112	45	22	129	2084					
Gironde	G 18	01/04/2003	16:00	1.727	45.504	62	93	86	0	0	18	98	0	0	0	35	199					