

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 de cytométrie en flux

Action 3 – Indice Composition – Livrable 2

Rapport final, mars 2016

Luis Felipe ARTIGAS (ULCO), Morgane DIDRY (CNRS), Emilie
PREVOST (CNRS), Simon BONATO (ULCO-CNRS), Alain
Lefebvre (IFREMER)

AUTEURS

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

Emilie PREVOST, Assistante ingénieur (CNRS UMR 8187 LOG – Université du Littoral Côte d'Opale), emilie.prevost76@gmail.com

Morgane DIDRY, Assistante ingénieur (CNRS UMR 8187 LOG – Université du Littoral Côte d'Opale), morgane.didry@univ-littoral.fr

Simon BONATO, Doctorant (CNRS UMR 8187 LOG – Université du Littoral Côte d'Opale), simon.bonato@univ-littoral.fr

Alain LEFEBVRE, Cadre de recherche, Laboratoire Environnement Ressources, LER/Boulogne sur Mer, Alain.Lefebvre@ifremer.fr

CORRESPONDANTS

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

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

AUTRES CONTRIBUTEURS

Vincent CORNILLE, technicien (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale)

Eric LECUYER, technicien (CNRS UMR 8187 LOG)

Vincent DUQUESNE, technicien (IFREMER LER/BL)

Camille BLONDEL, technicienne (IFREMER LER/BL) *

Fernando GOMEZ, Post-doctorant et Chercheur invité en 2011-2012 (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale) - Actuel Chercheur Invité Institut Océanographique de Sao Paulo, Brésil

Luis LAMPERT, cadre de recherche (IFREMER DYNECO/VIGIES)

Fabrice LIZON, Maître de Conférences (CNRS UMR 8187 LOG – Université de Lille 1),

Droits d'usage :

Niveau géographique :

Couverture géographique : nationale

Niveau de lecture :

RESUME

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

Les comptages microscopiques ne concernent en général que le micro-phytoplancton. Or, les travaux antérieurs montrent que la construction d'un indice de composition doit tenir compte de la diversité de l'ensemble du phytoplancton. Afin d'appréhender le phytoplancton dans toutes ses composantes, il est donc nécessaire de considérer également le nano- et le pico-phytoplancton, dont l'importance dans la diversité phytoplanctonique est cruciale. Ceux-ci peuvent être mesurés par différentes techniques, qui sont complémentaires : cytométrie en flux (traditionnelle ou semi-automatisée permettant d'enregistrer le profil optique de chaque particule), analyse des pigments par HPLC, fluorescence spectrale, FlowCAM / Phytolmage, biodiversité génétique.

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

Les actions de ce livrable ont été réalisées en collaboration entre l'UMR LOG de Wimereux et le laboratoire IFREMER LER/Boulogne avec participation des laboratoires DYNECO/PELAGOS, DYNECO/VIGIES d'IFREMER, du LISIC-ULCO de Calais et les partenaires du projet DYMAPHY. La comparaison des résultats obtenus à partir des techniques innovantes, ainsi que des méthodes de référence traditionnelles, a été présentée dans les livrables n° A II et n° A III de la fiche composition 2013. Il s'agissait alors de l'analyse de mesures réalisées dans le cadre du projet INTERREG IVA « 2 Mers » DYMAPHY à la fois lors de campagnes communes et au niveau des sites d'observation et de surveillance en Manche Orientale.

Dans le présent rapport, il s'agissait plus particulièrement de proposer des pistes d'analyses pour l'élaboration d'un indice de composition du phytoplancton, principalement à partir des résultats de la cytométrie en flux. Nous avons choisi ici d'approfondir certaines données (voir Synthèse plus bas) issues de campagnes en Manche (DYPHYMA) et du suivi de la radiale Wimereux-Slack (Baie de Saint Jean). D'autres données issues des réseaux de surveillance (SOMLIT, SRN, REPHY) serviront, sur la base des pistes mises en évidence dans ce rapport 2014, à avancer dans les réflexions sur la construction d'un indice composition basé sur les mesures cytométriques.

Le suivi combiné de la distribution spatiale phytoplanctonique à haute résolution (kilométrique ou sub-kilométrique) au cours de campagnes océanographiques internationales (DYPHYMA) ou au cours de campagnes d'observation régulières réalisées à haute résolution temporelle (hebdomadaire et parfois journalière, radiale Wimereux-Slack) a permis de mettre en évidence, par des techniques complémentaires aux comptages microscopiques, la complexité des proliférations/accumulations, des changements de dominance d'un groupe phytoplanctonique à un autre, répondant à des changements des conditions du milieu et d'avancée de la saison.

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

MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

Manche Orientale – Groupes phytoplanctoniques – Indice de composition – Cytométrie en Flux de type Scanning –

TITLE

First propositions for an ecological index of phytoplankton composition, based on the results of Scanning Flow Cytometry.

ABSTRACT

The European Union Water Framework Directive (WFD) refers to phytoplankton as one of the biological quality elements that should be regularly monitored and evaluated thanks to three ecological indices: biomass, abundance and composition. The first two have already been defined, but the third one has not yet been proposed in the English Channel - Atlantic zone.

The construction of a composition index must consider the diversity of all the phytoplankton organisms. As the microscopic counts concern only the micro-phytoplankton, it is necessary to use additional information which concerns the nano- and pico-phytoplankton, of great importance in the phytoplankton diversity.

These components of the phytoplankton can be measured by different complementary techniques: traditional or scanning flow cytometry, HPLC pigments analysis, spectral fluorescence, FlowCAM / Phytolmage, genetic biodiversity.

In order to define the indicators for the WFD while considering the phytoplankton dynamics in all the marine waters, it is necessary to use high resolution measures, thanks to the development of new sensors and data analysis tools.

The actions described in the present report were carried out in collaboration between the Laboratory of Oceanology and Oceanography from Wimereux (CNRS UMR 8187 LOG) and the laboratory IFREMER LER/Boulogne, and the participation of the laboratories DYNECO/PELAGOS, DYNECO/VIGIES from IFREMER, LISIC-ULCO from Calais, as well as the partners of the DYMAPHY project.

The comparison of the results obtained by different techniques of phytoplankton assessment was described in the previous 2013 A.II and A.III reports, in which the analysis of the first comparisons of measurements carried out within the INTERREG IVA "2 Mers" DYMAPHY project during common cruises or on observation and monitoring sites in Eastern English Channel were presented.

In the present report, the aim was to propose a set of analysis which could help building a phytoplankton composition index based on the results of automated flow cytometry. Here the focus is made on a part of the total results (see below). The data from regular monitoring not analysed yet will contribute to move towards the proposition of a phytoplankton composition index based on flow cytometry measurements.

The monitoring of phytoplankton distribution carried out at both high spatial resolution during international oceanographic cruises (DYPHYMA- DYMAPHY project) and high temporal resolution during regular observation cruises (Wimereux-Slack transects), permitted to bring out the complexity of proliferation/accumulation, dominance changes from a phytoplankton group to another, responding to environmental changes.

These techniques, when used at high resolution, will allow a better understanding of the phytoplankton diversity and will make it possible to move towards the proposition of a composition index for the WFD, but will also help bringing some important information, that could be used to estimate the ecological quality of all marine waters, in the frame of the Marine Strategy Framework Directive (MSFD).

KEY WORDS (THEMATIC AND GEOGRAPHICAL AREA)

Eastern English Channel – Phytoplankton groups – Scanning Flow Cytometry Phytoplankton composition index index –

SYNTHESE POUR L'ACTION OPERATIONNELLE

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

Les différentes actions du présent livrable ont été principalement réalisées en collaboration entre l'UMR LOG de Wimereux et le laboratoire IFREMER LER/Boulogne avec la participation des laboratoires DYNECO/PELAGOS, DYNECO/VIGIES d'IFREMER, du LISIC-ULCO de Calais et les partenaires du projet DYMAPHY. La comparaison des résultats obtenus à partir des techniques innovantes (cytométrie en flux semi-automatisée et fluorimétrie spectrale) avec méthodes de référence traditionnelles (microscopie ou analyses pigmentaires), a été présentée dans les livrables 2013 n° AII et n° AIII. Il s'agissait alors de comparer des résultats obtenus dans le cadre du projet INTERREG IVA « 2 Mers » DYMAPHY à la fois lors de campagnes communes (DYPHYMA) et au niveau des sites d'observation et de surveillance en Manche Orientale.

Dans le présent rapport, nous avons choisi d'approfondir l'analyse de certaines données, issues des campagnes DYPHYMA et des suivis de la radiale Wimereux-Slack, en nous appuyant sur des données : (i) de cytométrie en flux automatisée (définition d'assemblages phytoplanctoniques), (ii) de fluorimétrie spectrale, (iii) de comptages par microscopie et/ou pigmentaires, ainsi que (iv) de données environnementales.

Les données issues des réseaux de surveillance serviront, sur la base des pistes mises en évidence au cours de ce rapport 2014, à avancer vers la proposition d'un premier indice de composition basé sur les mesures cytométriques, au cours de l'année 2015.

Le tableau ci-dessous synthétise les données analysées dans le présent rapport (décrits plus en détail dans la partie Matériel et Méthodes).

Les différents réseaux d'échantillonnage analysés dans ce rapport ont été représentés dans le tableau ci-dessous (décrits plus en détail dans la partie Matériels et Méthodes).

Réseau	Stations	Points	Période/fréquence	Méthodes	Rapport
RESOMAR (DYPHYRAD)	Radiale Wimereux-Slack +	9 points (R0 à R4), transect de la côte vers le large (5,25 milles nautiques)	Février-juillet 2012 : 12 radiales complètes + 2 radiales partielles (3 à 7 points)	<u>Phytoplancton</u> -Abondance : comptages manuels -Abondance/classes de taille : cytométrie en flux -Pigments : HPLC et fluorescence spectrale	Livrables All et 2 pour données 2011 et 2012 ; Livrable All pour données 2013
	Suivi saisonnier et inter-annuel du point R1		Mai-novembre 2011 Février-juillet 2012 Mars-décembre 2013 Février-juin 2014		
Campagne DYPHYMA (projet INTERREG DYMAPHY)	Campagnes océanographiques en Manche Orientale, entre France et Angleterre, le long des côtes entre Antifer et Cap Gris-Nez en France, et entre Dover et Eastbourne en Angleterre	3 « legs » de 2 à 4 jours d'enregistrements en continu	20-21 avril 2012 27-30 avril 2012 31 mai-4 juin 2012	<u>Hydrologie</u> -Enregistrements du Pocket ferrybox : données en continu de T et S de l'AOA <u>Phytoplancton <i>in vivo</i> et <i>in situ</i></u> -Pigments pour 4 grands groupes : Fluoroprobe et AOA -Abondance/classes de taille : cytométrie en flux <u>Phytoplancton par prélèvements</u> -Abondance : comptages par microscopie -Pigments : HPLC	Livrables All et 2

Nous avons choisi de nous focaliser sur trois niveaux d'analyses dans le but de déterminer les assemblages phytoplanctoniques mis en évidence par la cytométrie en flux automatisée :

- Les données issues de la campagne DYPHYMA, au cours des trois legs
- Le suivi saisonnier inter-annuel du point R1 entre 2011 et 2014
- Les données de suivi de la radiale Wimereux-Slack au cours de l'année 2012 seulement.

Les données 2013 et 2014 issues des réseaux de surveillance SRN et SOMLIT seront analysées dans le courant de l'année 2015, et serviront pour affiner les pistes qui permettront de proposer un indice composition phytoplanctonique

Les différentes méthodes, traditionnelles et innovantes, utilisées dans ce suivi, leur apport quant au suivi spatio-temporel du phytoplancton, ainsi que leur pouvoir de discrimination taxonomique, ont déjà été décrits dans le tableau du livrable All et sont brièvement repris dans la partie Matériel et Méthodes.

En Manche Orientale, différents groupes ont été détectés par cytométrie en flux automatisée de type CytoSense depuis 2011 lors des surveillances régulières, comme pendant les campagnes océanographiques DYPHYMA. Ces groupes ont été définis à partir des premiers travaux menés au moyen d'analyses cytométriques dans la zone (Guiselin 2010 ; Guiselin *et al.*, 2010), en Mer du Nord (Rutten *et al.*, 2005) ou ailleurs (Thyssen *et al.*, 2008, 2010) :

i) picoplancton (0-3µm) : cyanobactéries du type *Synechococcus*, cellules pico-eucaryotes-planctoniques non identifiées à faible ou fort niveau de fluorescence rouge (indicateur de faible ou forte teneur en chlorophylle a),

ii) nanoplancton (3 μm – 10 μm) : de un à trois groupes cellules assimilées en Manche Orientale à l'espèce *Phaeocystis globosa* (comportant différents stades de vie, grosses cellules diploïdes coloniales, cellules flagellées haploïdes de différentes tailles), des Cryptophytes, des Coccolithoporidés,

iii) : microplancton (>20 μm) : un à deux groupes, le groupe composite des « diatomées » (diatomées majoritaires, solitaires de grande taille ou coloniales, colonies de *Phaeocystis* et dinoflagellés) à forte teneur en chlorophylle *a* (fortes valeurs de fluorescence rouge), et, occasionnellement, un groupe des cellules fines assimilées à des diatomées pennées (principalement du genre *Pseudonitzschia*) à faible contenu en chlorophylle *a* (donc à faible fluorescence rouge associée).

Le suivi combiné de la distribution spatiale phytoplanctonique à haute résolution (kilométrique ou sub-kilométrique) au cours de campagnes océanographiques internationales DYPHYMA ou au cours de campagnes d'observation régulières, réalisées à haute résolution temporelle (hebdomadaire et parfois journalière, radiales Wimereux-Slack), a permis de mettre en évidence, par des techniques complémentaires aux comptages microscopiques, la complexité des proliférations/accumulation et des changements de dominance d'un groupe phytoplanctonique à un autre, répondant à des changements des conditions du milieu et d'avancée de la saison.

Les suivis analysés dans les rapports précédents comportent des stations de masses d'eau DCE (notamment les stations côtières de la campagne DYPHYMA et les trois premières stations de la radiale Saint-Jean). Les stations du large pourraient représenter des stations de référence par rapport aux stations littorales DCE, car ce sont toujours des stations de faible profondeur (maximum 50 m au milieu de la Manche). Par ailleurs, les zones frontales représentent des stations d'accumulation à prendre en compte pour le programme de surveillance à mettre en place pour la DCSMM. Ces stations du large, qui comportent des compositions phytoplanctoniques parfois différentes des stations côtières, permettent de compléter et d'élargir l'éventail des compositions phytoplanctoniques disponibles pour l'inter-comparaison des méthodes. Notamment, les analyses pigmentaires ont permis de compléter les données de référence auxquelles les techniques semi-automatisées telles que la cytométrie en flux de type scanning (CytoSense) et la fluorimétrie spectrale ont pu être comparées.

Ce rapport s'appuie sur des comparaisons antérieures et l'approfondissement de l'analyse de certaines données, dans le but premier de caractériser les conditions de développement des différents groupes cytométriques. Les objectifs étaient d'analyser la structure de la communauté phytoplanctonique mise en évidence par la cytométrie en flux à scanning (pico-, nano-, et micro-phytoplancton), sa distribution spatiale et la dynamique des successions saisonnières, en relation avec les variables environnementales majeures et en comparaison avec d'autres techniques innovantes ou de référence.

Pour la première fois des assemblages (proportions) de ces groupes phytoplanctoniques sont mis en évidence et leur occurrence est interprétée, à la lumière des données environnementales et des groupes ou assemblages phytoplanctoniques déterminés à partir d'autres techniques (de référence et/ou innovantes). Ceci permettant de jeter les bases pour la proposition d'un nouvel indice de composition du phytoplancton à partir de l'utilisation de la cytométrie en flux, dans le but de caractériser et rendre compte des changements de conditions environnementales.



Rapport final

**Premières propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basé sur les résultats de cytométrie en flux
Action 3 Indice Composition. Livrable 2**

Février 2015

Luis Felipe ARTIGAS

Morgane DIDRY

Emilie PREVOST

Simon BONATO

Alain Lefebvre



Table des matières

I)	Contexte de l'action.....	6
II)	Description de l'action.....	7
III)	Matériel et méthodes.....	8
1)	Aire d'échantillonnage régulier en Manche Orientale et Mer du Nord	8
2)	Campagnes océanographiques côtières DYPHYMA I et II	9
3)	La méthode de fluorescence spectrale	11
4)	La cytométrie en flux automatisée de type « Pulse-shape-recording Flow Cytometry »	12
5)	L'approche chémotaxonomique par HPLC.....	13
6)	Extraction de la chlorophylle <i>a</i> pour mesures fluorimétriques et comptage phytoplanctonique	14
IV)	Résultats	15
1)	Distribution du phytoplancton - Campagnes DYPHYMA	15
a)	Paramètres hydrologiques.....	15
b)	Chlorophylle <i>a</i> totale	16
c)	Analyses cytométriques en continu	18
d)	Analyses taxonomiques	22
e)	Analyses fluorimétriques sur les DPM de la campagne DYPHYMA.....	24
f)	Comparaison de la résolution des communautés phytoplanctoniques par différentes techniques (campagne DYPHYMA)	26
2)	Dynamique saisonnière et inter-annuelle du phytoplancton en Manche Orientale (Station côtière R1 – radiale Wimereux-Slack).....	31
a)	Nutriments et paramètres hydrologiques	31
b)	Chlorophylle <i>a</i>	32
c)	Analyses cytométriques en continu	34
d)	Analyses taxonomiques	35
e)	Analyses fluorimétriques du point R1 entre 2011 et 2014	36
3)	Dynamique de la distribution spatiale du phytoplancton (à haute résolution) en Manche Orientale (radiale Wimereux-Slack) en 2012	37
a)	Nutriments et paramètres hydrologiques	37
b)	Chlorophylle <i>a</i>	40
c)	Analyses cytométriques en continu	41
d)	Analyses taxonomiques	43
e)	Analyses fluorimétriques de la radiale Wimereux-Slack en 2012	48

Convention ONEMA-Ifremer 2014

Conclusion – Perspectives	51
Bibliographie.....	52
ANNEXES.....	55
1. Evolution de la salinité et de la température de surface sur les trois legs de la campagne DYPHYMA (haut : leg1, milieu : leg2, bas : leg3)	55
2. Représentations de Shephard permettant de déterminer le stress pour les NMDS réalisées sur les comptages pour la campagne DYPHYMA. A : comptage IFREMER. B : comptage LOG-ULCO	56
3. Dendrogramme représentant les stations échantillonnées par l'IFREMER (A) et le LOG-ULCO (B) lors de la campagne DYPHYMA sur les trois legs	56
4. Représentations de Shephard permettant de déterminer le stress pour les NMDS réalisées sur les comptages du LOG-ULCO sur la radiale de la Baie Wimereux-Slack (stress = 0,1736)	58

Liste des figures

Figure 1 : localisation des sites d'observation/surveillance du phytoplancton en Manche Orientale et baie sur Mer du Nord (SRN-IFREMER, SOMLIT-INSU, radiale Wimereux-Slack – RESOMAR – DYMAPHY).....	8
Figure 2 : trajet des trois Legs des campagnes DYPHYMA I et II (printemps 2012) – Projet INTERREG IVA « 2 Mers » DYMAPHY.....	9
Figure 3 : localisation des stations DPM de la campagne DYPHYMA avec le leg 1 (20/04/12, 21/04/12) et le leg 2 (27/04/12, 28/04/12, 29/04/12).....	10
Figure 4 : localisation des stations DPM de la campagne DYPHYMA avec le leg 3 (31/05/12, 01/06/12, 02/06/12, 04/06/12).....	11
Figure 5 : diagramme fonctionnel d'un cytomètre en flux (CytoSense – gauche). Exemple d'un cytogramme (au centre, chaque groupe ou cluster représente un groupe phytoplanctonique et chaque point, une cellule ou colonie). Le détail d'un profil optique d'une cellule de diatomée (<i>Dytilum brightwellii</i> , droite), associé à une photo prise par une caméra couplée au cytomètre en flux.....	13
Figure 6 : distribution des paramètres hydrologiques (température (°C) à gauche et salinité à droite) de surface sur le leg 2 de la campagne DYPHYMA 2012 (ODV).....	15
Figure 7 : courbes représentant la quantité de chlorophylle a le long des 3 legs de la campagne DYPHYMA selon les différentes méthodes de quantification.....	17
Figure 8 : carte représentant la localisation des différents assemblages phytoplanctoniques durant le leg1 (mi avril 2012) de la campagne DYPHYMA. Diagrammes des contributions relatives de chaque groupe phytoplanctonique à l'abondance phytoplanctonique totale, mis en évidence par cytométrie en flux au sein des assemblages. CM1 = communauté 1, CM2 = communauté 2, CM3 = communauté 3.....	18
Figure 9 : carte représentant la localisation des différents assemblages phytoplanctoniques durant le leg2 (fin avril 2012) de la campagne DYPHYMA. Diagrammes des contributions relatives de chaque groupe phytoplanctonique à l'abondance phytoplanctonique totale, mis en évidence par cytométrie en flux au sein des assemblages. CM1 = communauté 1, CM2 = communauté 2, CM3 = communauté 3, CM4 = communauté 4 (Bonato <i>et al.</i> , 2015).....	20
Figure 10 : carte représentant la localisation des différents assemblages phytoplanctoniques durant le leg3 (mai/juin 2012) de la campagne DYPHYMA. Diagrammes des contributions relatives de chaque groupe phytoplanctonique à l'abondance phytoplanctonique totale, mis en évidence par cytométrie en flux au sein des assemblages. CM1 = communauté 1, CM2 = communauté 2, CM3 = communauté 3.....	21
Figure 11 : ordination des échantillons dans l'espace défini par les axes 1 et 2 de la NMDS sur la répartition des espèces du phytoplancton sur les stations DPM de la campagne DYPHYMA pour les comptages réalisés par l'IFREMER. Le stress est de 0,1332.....	23
Figure 12 : ordination des échantillons dans l'espace défini par les axes 1 et 2 de la NMDS sur	

Convention ONEMA-Ifremer 2014

la répartition des espèces du phytoplancton sur les stations DPM de la campagne DYPHYMA pour les comptages réalisés par le LOG-ULCO. Le stress est de 0,1779.....	24
Figure 13 : comparaison des groupes algaux obtenus à partir du Fluoroprobe en pourcentage relatif (A : empreinte diatoms, B : <i>Phaeocystis</i> , C : bluegreen, D : cryptophytes) sur les différentes stations DPM des legs 1, 2 et 3, lors de la campagne DYPHYMA	26
Figure 14 : diagramme présentant les principaux groupes algaux sur le leg 1 de la campagne DYPHYMA suivant les différentes méthodes en pourcentage relatif (%). A : groupes phytoplanctoniques par comptages du LOG-ULCO. B : groupes phytoplanctoniques par comptages de l'IFREMER. C : groupes phytoplanctoniques par le Fluoroprobe. C : groupes phytoplanctoniques par cytométrie.....	28
Figure 15 : diagramme présentant les principaux groupes algaux sur le leg 2 de la campagne DYPHYMA suivant les différentes méthodes en pourcentage relatif (%). A : groupes phytoplanctoniques par comptages du LOG-ULCO. B : groupes phytoplanctoniques par comptages de l'IFREMER. C : groupes phytoplanctoniques par le Fluoroprobe. D : groupes phytoplanctoniques par cytométrie.....	29
Figure 16 : diagramme présentant les principaux groupes algaux sur le leg 3 de la campagne DYPHYMA suivant les différentes méthodes en pourcentage relatif (%). A : groupes phytoplanctoniques par comptages du LOG-ULCO. B : groupes phytoplanctoniques par comptages de l'IFREMER. C : groupes phytoplanctoniques par le Fluoroprobe. D : groupes phytoplanctoniques par cytométrie.....	30
Figure 17 : évolution de la salinité sur le point R1 de la radiale Wimereux-Slack entre 2011 et 2014.....	31
Figure 18 : évolution de la température (°C) sur le point R1 de la radiale Wimereux-Slack entre 2011 et 2014.....	32
Figure 19 : courbes représentant la quantité de chlorophylle <i>a</i> au cours du temps (entre 2011 et 2014) sur le point R1 selon les différentes méthodes de quantification	33
Figure 20 : suivi saisonnier du point R1 de la radiale Wimereux-Slack par cytométrie en flux, entre mai 2011 et juin 2014 : abondance cellulaire (graphique du haut) et fluorescence (graphique du bas)	34
Figure 21 : évolution de l'abondance phytoplanctonique au niveau du point R1 de la Radiale Wimereux-Slack en 2012.....	35
Figure 22 : abondance relative des principaux groupes algaux identifiés par la méthode de comptage microscopique sur le point R1 de la Radiale Wimereux-Slack en 2012	36
Figure 23 : suivi saisonnier du point R1 de la radiale Wimereux-Slack par fluorimétrie spectrale, entre mars 2011 et juin 2014	36
Figure 24 : évolution spatio-temporelle des paramètres environnementaux le long de la radiale Wimereux-Slack. DIN : Azote Inorganique Dissous, DIP : Phosphate Inorganique Dissous, DSi : Silice Dissoute	39
Figure 25 : évolution de la chlorophylle <i>a</i> totale sur les 5 points de la radiale Wimereux-Slack en 2012.....	40
Figure 26 : distribution spatio-temporelle de l'abondance des différents groupes	

phytoplanctoniques identifiés par cytométrie en flux, le long de la radiale Wimereux-Slack, entre février et juillet 2012 (Bonato <i>et al.</i> , soumis)	42
Figure 27 : analyse de co-inertie réalisée sur les variables environnementales et les abondances de groupes phytoplanctoniques identifiés par cytométrie en flux, entre février et juillet 2012, le long de la radiale Wimereux-Slack (Bonato <i>et al.</i> , soumis)	43
Figure 28 : abondance cellulaire totale sur les 5 points de la Radiale Wimereux-Slack en 2012 - campagne DYPHYRAD	44
Figure 29 : distribution spatio-temporelle des groupes phytoplanctoniques identifiés par comptage, le long de la radiale Wimereux-Slack, entre février et juillet 2012.	45
Figure 30 : ordination des échantillons dans l'espace défini par les axes 1 et 2 de la NMDS sur la répartition des espèces du phytoplancton sur la radiale Wimereux-Slack au cours de l'année 2012	47
Figure 31 : distribution spatio-temporelle des quatre groupes phytoplanctoniques identifiés par le Fluoroprobe, le long de la radiale Wimereux-Slack, entre février et décembre 2012. .	49

I) Contexte de l'action

Les micro-organismes phytoplanctoniques jouent un rôle majeur dans le bon fonctionnement des écosystèmes. En effet, ce sont les premiers producteurs primaires dans la plupart des écosystèmes aquatiques et ils se retrouvent à la base de presque tous les réseaux trophiques. Ils sont également capables d'intégrer des perturbations naturelles ou induites par l'homme, en modifiant leur physiologie, leur taux de croissance et/ou en conduisant à la dominance d'une espèce ou groupe fonctionnel (modification de la biodiversité). Ils peuvent par conséquent être utilisés comme indicateurs de changements à court et long terme de la qualité de l'eau. De plus, le phytoplancton peut représenter une menace lorsqu'il est responsable de floraisons nuisibles.

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

Depuis le 22 décembre 2000, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) établit un cadre pour la protection de l'ensemble des eaux des pays européens. Elle impose notamment de définir et suivre l'état chimique et écologique des masses d'eau à partir d'éléments biologiques, hydromorphologiques, chimiques et physico-chimiques. Parmi les éléments biologiques, l'indicateur phytoplancton est évalué à partir de trois indices : la biomasse, l'abondance et la composition.

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

Dans ce contexte, le projet INTERREG IV A « 2 Mers » DYMAPHY (Développement d'un système d'observation DYNAMIQUE pour la détermination de la qualité des eaux MARINES, basé sur l'analyse du PHYtoplancton), a été créé. Il visait à améliorer les connaissances et l'évaluation des eaux marines de La Manche et de la Mer du Nord à travers le compartiment phytoplanctonique et ses paramètres complémentaires (<http://www.dymaphy.eu>).

La caractéristique essentielle de ce projet a été le couplage des méthodes traditionnelles avec des méthodes innovantes semi-automatisées permettant d'accéder à un échantillonnage à haute résolution, ainsi que la mise en place des traitements de données qui en découlent (Artigas *et al.*, 2014).

II) Description de l'action

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

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

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

Il s'agissait donc ici d'approfondir les analyses des assemblages phytoplanctoniques dans le but d'avancer dans la construction d'un indice de composition du phytoplancton, basé sur les données de cytométrie en flux, en utilisant comme référence les données environnementales ainsi que les assemblages phytoplanctoniques déterminés par les techniques traditionnelles. En effet, la diversité taxonomique du micro-phytoplancton est également importante pour l'élaboration d'un indice de composition complet du phytoplancton. Les comptages microscopiques faits par deux laboratoires seront analysés en parallèle afin de comparer les méthodes et d'établir la pertinence des indicateurs proposés.

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

III) Matériel et méthodes

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

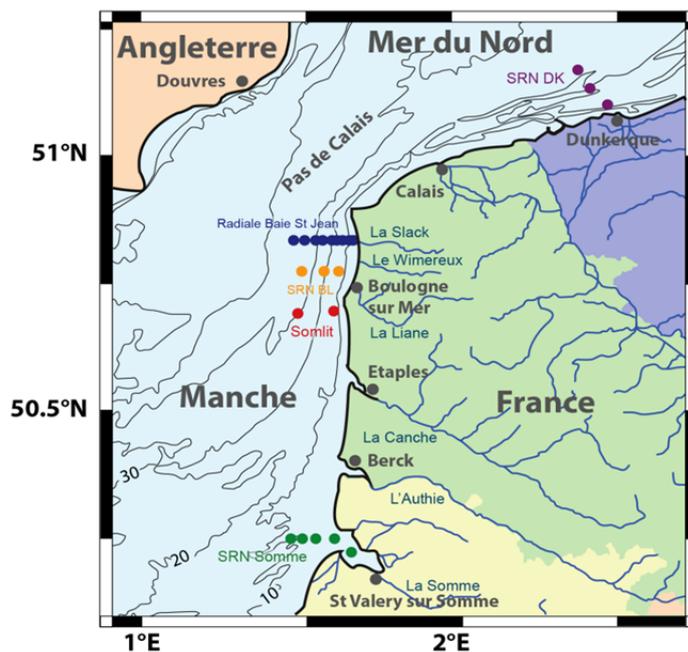


Figure 1 : localisation des sites d'observation/surveillance du phytoplancton en Manche Orientale et baie sur Mer du Nord (SRN-IFREMER, SOMLIT-INSU, radiale Wimereux-Slack – RESOMAR – DYMAPHY)

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

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

Pour cette radiale, les données traitées dans ce rapport concernent les prélèvements effectués entre février et juillet 2012, à savoir sur 12 radiales complètes de 9 points et 2

radiales de 3 à 7 points.

Le point R1 de cette radiale a été particulièrement suivi. Les données traitées entre 2011 et 2014 seront également présentées dans ce rapport.

Ce rapport est donc focalisé principalement sur la campagne DYPHYMA, la radiale Wimereux-Slack en 2012, et le point R1 de la radiale Wimereux-Slack entre 2011 et 2014. Les données issues des réseaux de surveillance SOMLIT et SRN ne sont pas présentées ici, elles le seront dans un livrable ultérieur visant à approfondir l'analyse des données inter-annuelles de cytométrie en flux (livrable AIII – 2, 2015).

2) Campagnes océanographiques côtières DYPHYMA I et II

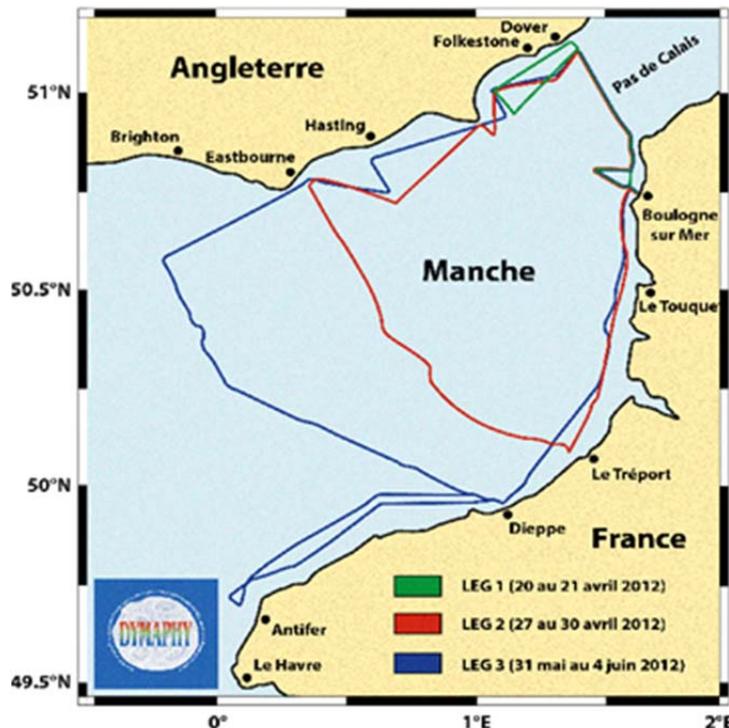


Figure 2 : trajet des trois Legs des campagnes DYPHYMA I et II (printemps 2012) – Projet INTERREG IVA « 2 Mers » DYPHYMA

Les campagnes DYPHYMA se sont déroulées à bord du navire océanographique « Côtes de la Manche » (INSU-CNRS) du 19 au 30 avril et du 31 mai au 4 juin 2012 (Figure 2) afin de suivre les blooms de phytoplancton printaniers. Des mesures ont été effectuées à haute résolution spatiale et temporelle le long des gradients côte large et est-ouest des deux côtés de la Manche. Des enregistrements en continu, toutes les 1 à 10 minutes ont été réalisés dans les eaux de surface, à partir d'un système « Pocket Ferrybox » (PFB, 4H-JENA) permettant

Convention ONEMA-Ifremer 2014

d'analyser de façon automatisée plusieurs paramètres hydrologiques et biogéochimiques. L'abondance et la diversité des assemblages de phytoplancton ont été déterminés *in vivo* et *in situ* par le couplage de la fluorimétrie spectrale (Algae Online Analyser - AOA) et d'un cytomètre en flux de type CytoSense au PFB, et en complément des profils de sonde (Fluoroprobe). En complément, des prélèvements discrets ont été réalisés pour des comptages microscopiques et analyse pigmentaires. Pour plus de renseignements sur la campagne DYMAPHY, voir le rapport n° AII (Artigas *et al.*, 2014).

L'ensemble des échantillonnages a été réalisé sur trois périodes distinctes (Figure 3, Figure 4) :

- Stations DPM 1 à DPM 15 (Leg 1) : entre le 20 et le 21 avril 2012
- Stations DPM 34 à DPM 53 (Leg 2) : entre le 27 et le 29 avril 2012
- Stations DPM 54 à DPM 80 (Leg 3) : entre le 31 mai et le 4 juin 2012

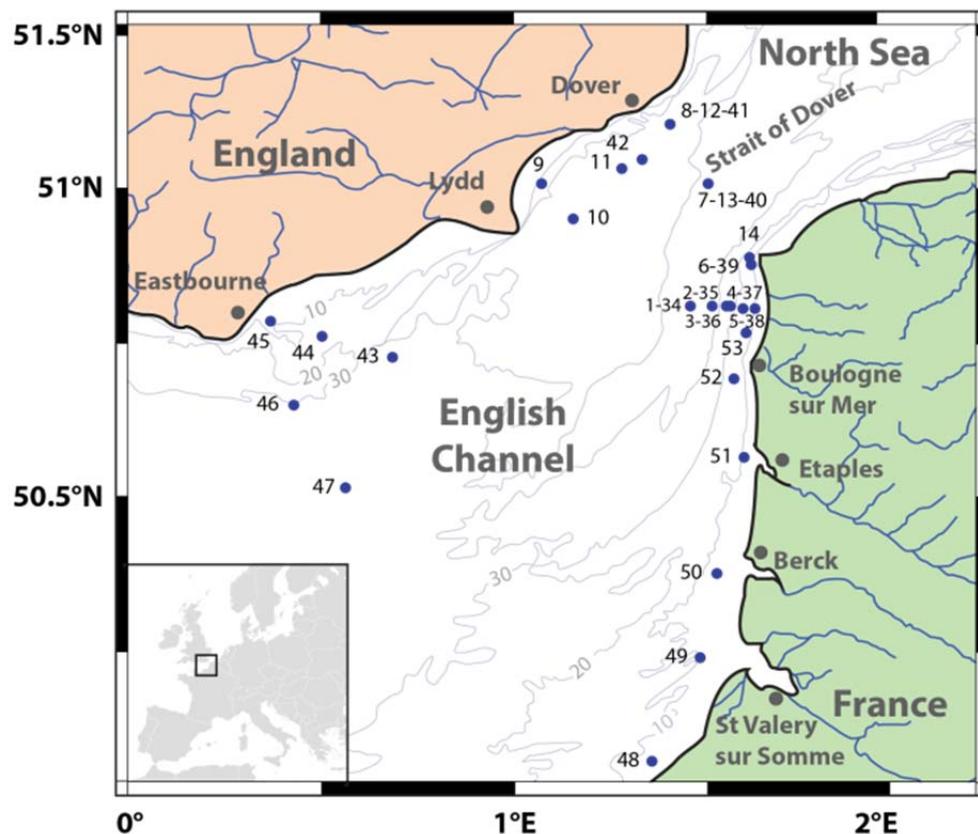


Figure 3 : localisation des stations DPM de la campagne DYPHYMA avec le leg 1 (20/04/12, 21/04/12) et le leg 2 (27/04/12, 28/04/12, 29/04/12)

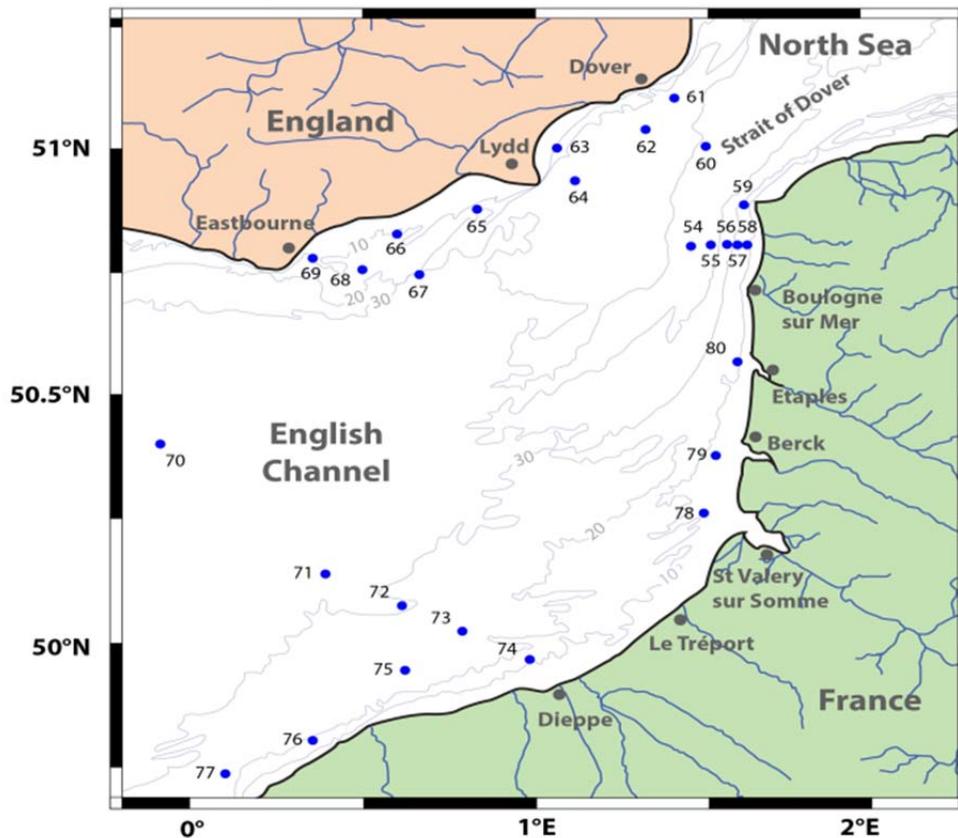


Figure 4 : localisation des stations DPM de la campagne DYPHYMA avec le leg 3 (31/05/12, 01/06/12, 02/06/12, 04/06/12)

3) La méthode de fluorescence spectrale

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

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

- les « algues vertes » (Chlorobiontes),
- les « algues bleu-vertes » (Cyanobactéries à phycocyanine majoritaire),
- les « algues brunes » (Straménopiles (dont les Bacillariophyceae ou Diatomées),

Haptobiontes, Dinobiontes)

- le groupe mixte « cryptophytes » (Cryptobiontes, Rhodobiontes et Cyanobactéries à phycoérythrine majoritaire).

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

Afin de faciliter le déploiement en mer d'un système compact de mesures à haute résolution intégrant l'information relative aux groupes spectraux du phytoplancton mais aussi aux paramètres supports à la biologie, l'AOA a été intégré à un Pocket Ferry Box (4H-JENA[®]). Une description simplifiée du système Pocket Ferry Box a été faite par Schroeder *et al.*, 2008.

Pour une description plus approfondie de cette méthode et du système d'enregistrement en continu, ainsi que leur utilisation lors de la campagne océanographique DYPHYMA, se référer au livrable n° AII (Artigas *et al.*, 2014).

4) La cytométrie en flux automatisée de type « Pulse-shape-recording Flow Cytometry »

Le cytomètre en flux Cytosense (Cytobuoy BV[®], Pays-Bas) est un cytomètre en flux permettant d'analyser individuellement et de caractériser des particules en suspension dans un milieu liquide (Dubelaar *et al.*, 1999). Il a été tout particulièrement utilisé pour suivre les communautés phytoplanctoniques en Manche Orientale (Guiselin 2010 ; Guiselin *et al.*, 2010), permettant d'analyser une gamme de tailles étendue allant de 1 à 800 µm de diamètre et plusieurs mm de longueur (pour les chaînes). Les cellules phytoplanctoniques, individualisées par un flux laminaire, passent une à une devant un faisceau laser de longueur d'onde définie (couleur bleue). Il en résulte une diffraction et une diffusion de la lumière, accompagnées éventuellement d'une émission de fluorescence suite à l'excitation d'un pigment photosynthétique.

La principale particularité de ce cytomètre est la capacité d'enregistrer les profils optiques de chaque particule de manière individuelle (« pulse-shape-recording »), et de pouvoir consulter par la suite chaque signature. Tous les renseignements issus de la rencontre entre le laser et les cellules sont traduits en cytogrammes contenant de nombreux profils et, en cas de couplage avec un système d'acquisition d'images, des photos associées (Figure 5).

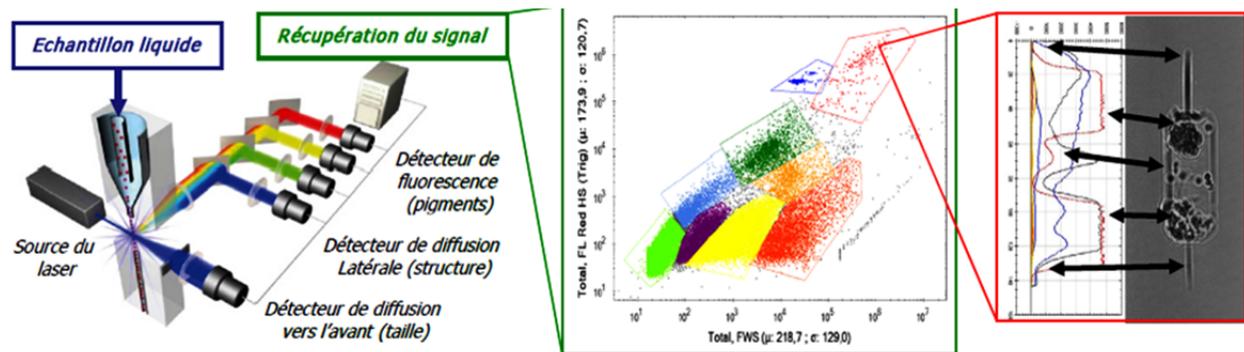


Figure 5 : diagramme fonctionnel d'un cytomètre en flux (CytoSense – gauche). Exemple d'un cytogramme (au centre, chaque groupe ou cluster représente un groupe phytoplanctonique et chaque point, une cellule ou colonie). Le détail d'un profil optique d'une cellule de diatomée (*Dytilum brightwellii*, droite), associé à une photo prise par une caméra couplée au cytomètre en flux

En Manche Orientale, différents groupes ont été détectés depuis 2011 lors de surveillances régulières (Guiselin 2010 ; Guiselin *et al.*, 2010):

- i) picoplancton (0-3 µm) : cyanobactéries du type *Synechococcus*, pico-eucaryotes, cellules pico-nano-planctoniques non identifiées à forte teneur en chlorophylle *a* (haut niveau en fluorescence rouge),
- ii) nanoplancton (3 µm – 10 µm) : de un à trois groupes de *Phaeocystis globosa* (comportant différents stades de vie, grosses cellules diploïdes coloniales, cellules flagellées haploïdes de différentes tailles), Cryptophytes, Coccolithoporidés,
- iii) microplancton (> 20 µm) : un à deux groupes, le groupe composite des « diatomées » (diatomées majoritaires, solitaires ou coloniales, colonies de *Phaeocystis* et dinoflagellés) à forte teneur en chlorophylle *a* (fortes valeurs de fluorescence rouge) et celui des diatomées pennées (principalement du genre *Pseudonitzschia*) à faible contenu en chlorophylle *a* (donc, à faible fluorescence rouge associée).

Pour une description plus précise de la technique de cytométrie en flux, se référer au livrable n° All (Artigas *et al.*, 2014).

5) L'approche chémotaxonomique par HPLC

Ces analyses ont précédemment été présentées dans la partie Matériels et Méthodes du rapport n° All (Artigas *et al.*, 2014). Certaines informations seront reprises dans le présent rapport afin de comparer les résultats et les méthodes d'estimation des groupes phytoplanctoniques et de la chlorophylle *a*.

Le principe de cette méthode est basée sur l'extraction des pigments (Jeffrey 1961; Jeffrey 1968) qui permet de différencier des grands groupes algaux et ainsi définir des biomarqueurs capables de représenter des catégories taxonomiques ou fonctionnelles qui soient suffisamment spécifiques et discriminantes d'une classe algale. La méthode CHEMTAX a été appliquée pour mieux discriminer les classes algales par des rapports multi-pigmentaires. Cette méthode définie par Mackey *et al.* (1996), permet d'éviter les problèmes de valeurs négatives et incohérentes qui peuvent être obtenues par les régressions multiples et ainsi permet d'obtenir la contribution de chaque classe algale par rapport à la biomasse totale. Il est cependant nécessaire d'avoir des connaissances préalable sur les différentes espèces et la composition phytoplanctonique du milieu étudié afin d'établir la matrice de départ (Lampert, 2014).

6) Extraction de la chlorophylle a pour mesures fluorimétriques et comptage phytoplanctonique

Afin de comparer les données à haute résolution et obtenues par des méthodes novatrices, des méthodes de référence ont été utilisées.

Des prélèvements ont été effectués en sub-surface sur les différentes stations échantillonnées de 2011 à 2014 (DYPHYMA – stations DPM et points de la radiale Wimereux-Slack).

Une partie des échantillons a servi pour l'identification microscopique du phytoplancton présent. La méthode utilisée suit la technique classique de sédimentation du phytoplancton telle que définie par Utermöhl en 1958. Les échantillons ont été conservés au lugol acide à 4°C jusqu'à leur comptage moins de 6 mois après prélèvement. Un sous échantillon a été placé dans des chambres de sédimentation de volume pouvant être différent en fonction de la densité cellulaire (10, 25 ou 50 ml). Le but est d'obtenir un nombre assez important d'individus sans que ceux-ci ne se chevauchent et empêchent leur identification.

En parallèle, des échantillons ont été filtrés sur des filtres GF/F en fibre de verre pour extraire la chlorophylle a et l'estimer par fluorescence (Yentsch and Menzel, 1963) en utilisant un fluorimètre Turner Designs (Modèle 10-AU).

La concentration de la chlorophylle a a ensuite été mesurée avant et après acidification avec HCL (Lorenzen (1966)).

IV) Résultats

1) Distribution du phytoplancton - Campagnes DYPHYMA

a) Paramètres hydrologiques

Les paramètres hydrologiques du leg 2 sont présentés dans la Figure 6. En effet, les cartes, réalisées à partir des données en continu du PFB, couvrent une plus grande zone et permettent ainsi une meilleure définition de la différence entre les masses d'eaux. Les cartes réalisées à partir des données ponctuelles (stations DPM) pour les trois legs, donc moins précises, sont représentées en annexe 1.

Sur les trois legs, la salinité s'avère être plus importante près des côtes anglaises avec une moyenne de 35,2. Près des côtes françaises, la salinité moyenne est de 34,5. Les eaux dessalées apparaissent au large des estuaires, puis du Cap Gris-Nez (effet de Cap). Cette légère différence s'explique par la présence de plus de fleuves sur le littoral français, dont la Seine et la Somme pour les plus importants, et de nombreux petits fleuves locaux dont le cumul des apports confirme ce que Brylinski et al. (1991) ont défini comme le « fleuve côtier ».

La température mesurée varie entre les legs 1, 2 et 3 puisque ce dernier a lieu fin mai-début juin. La température de l'eau augmente, passant en moyenne de 9,6 °C à 13,6 °C.

On observe le plus fort gradient de température au niveau du détroit entre la France et l'Angleterre.

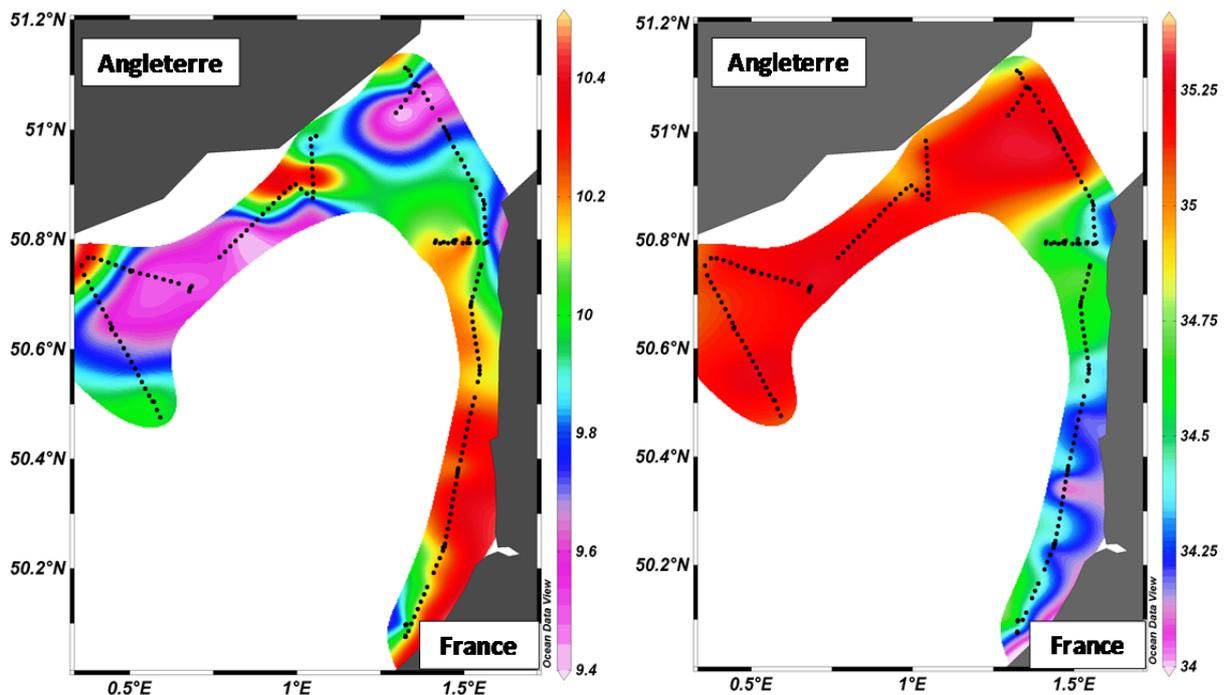


Figure 6 : distribution des paramètres hydrologiques (température (°C) à gauche et salinité à droite) de surface sur le leg 2 de la campagne DYPHYMA 2012 (ODV)

b) Chlorophylle a totale

La Figure 7 ci-dessous rends compte de l'évolution de la chlorophylle *a* totale sur les trois legs de la campagne DYPHYMA en 2012 entre la France et l'Angleterre. Les résultats sont exprimés (i) en $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour la méthode de fluorimétrie extractive et par HPLC, (ii) en équivalents de chlorophylle *a* $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour les sondes Fluoroprobe et CTD et (iii) en $10^8.\text{ml}^{-1}$ (A.U.) pour les données de cytométrie en flux tenant compte de la fluorescence rouge totale (de toutes les cellules).

Malgré les différences d'amplitude (en partie dues aux unités différentes), les courbes montrent les mêmes tendances. Les méthodes par fluorescence ont tout de même tendance à surestimer la quantité de chlorophylle *a* par rapport aux méthodes d'extraction. C'est notamment le cas pour la courbe de la sonde CTD (en violet sur la Figure 7).

Les concentrations maximales ont été détectées d'abord en avril près du détroit et surtout, le 29 avril, correspondant à des situations de poussée phytoplanctonique printanière au large des estuaires français. Par la suite, une remontée des valeurs a été observée début juin.

Convention ONEMA-Ifremer 2014

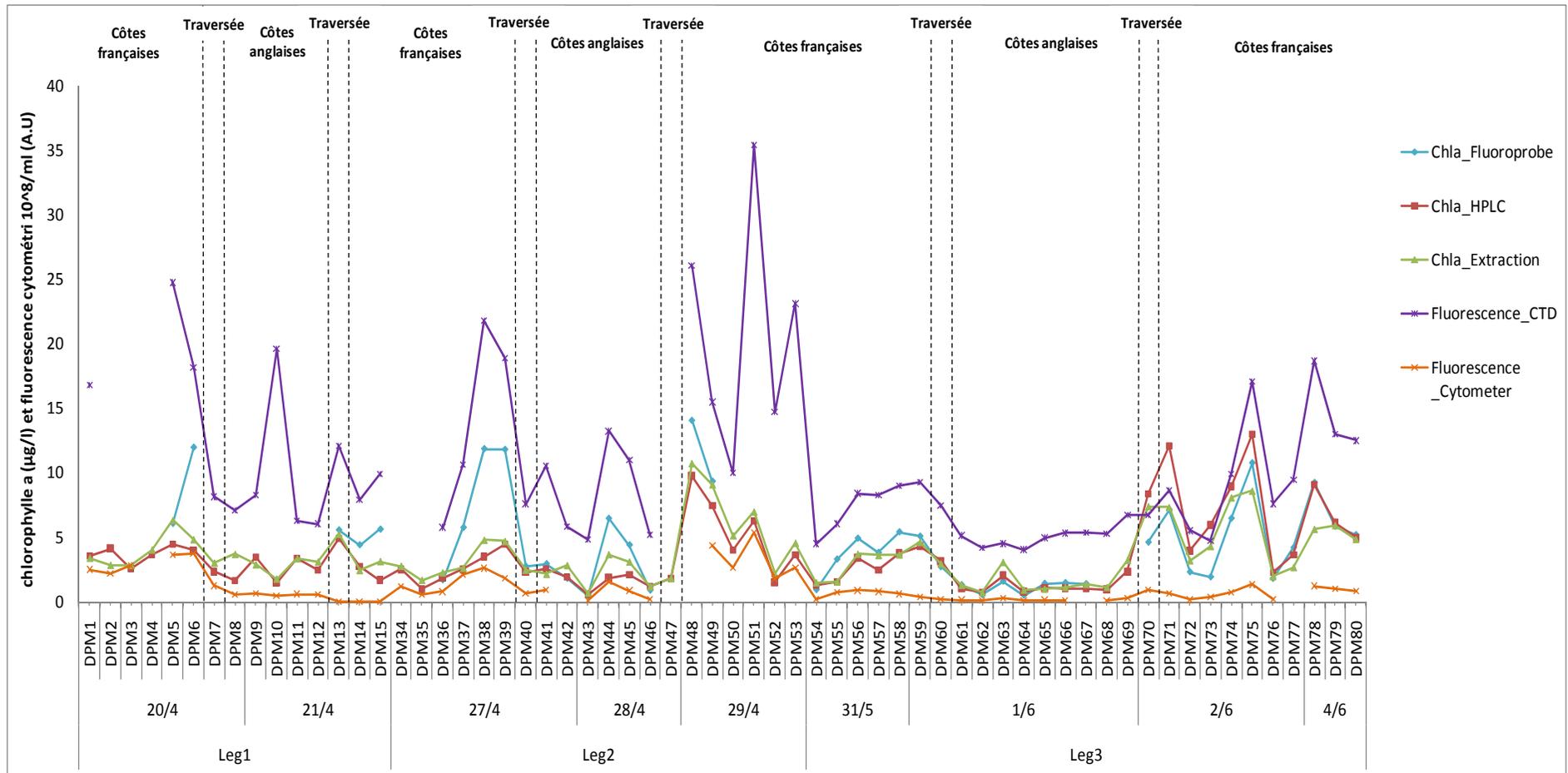


Figure 7 : courbes représentant la quantité de chlorophylle a le long des 3 legs de la campagne DYPHYMA selon les différentes méthodes de quantification

c) Analyses cytométriques en continu

Afin de déterminer les différents assemblages phytoplanctoniques au cours des trois legs de la campagne, des analyses statistiques ont été réalisées sur les données d'abondance enregistrées en continu par le cytomètre en flux, à savoir une matrice de Bray-Curtis (analyse de dissimilarité) couplée à la méthode de classification de Ward (Husson *et al.*, 2010, Bonato *et al.*, 2015).

Concernant le leg1, trois communautés ont pu être mises en évidence : CM1 correspondant aux eaux côtières et du large anglaises, CM2 représentant les eaux du centre du détroit et CM3 correspondant aux eaux côtières et du large françaises (Figure 8). Aucune corrélation n'est cependant mise en évidence avec les paramètres hydrologiques.

La communauté 1 est caractérisée par une forte présence de Picoeucaryotes I (43%) et de *Synechococcus sp* (37%). La communauté 2 est caractérisée par une plus forte présence de *Phaeocystis* haploïde (34%) et diploïde (12%), et un peu moins de *Synechococcus* (19%) et de Picoeucaryotes I (30%). La communauté 3 est composée à 86% de *Phaeocystis globosa*, avec une dominance de la forme diploïde (57%), le reste étant donc très peu représenté.

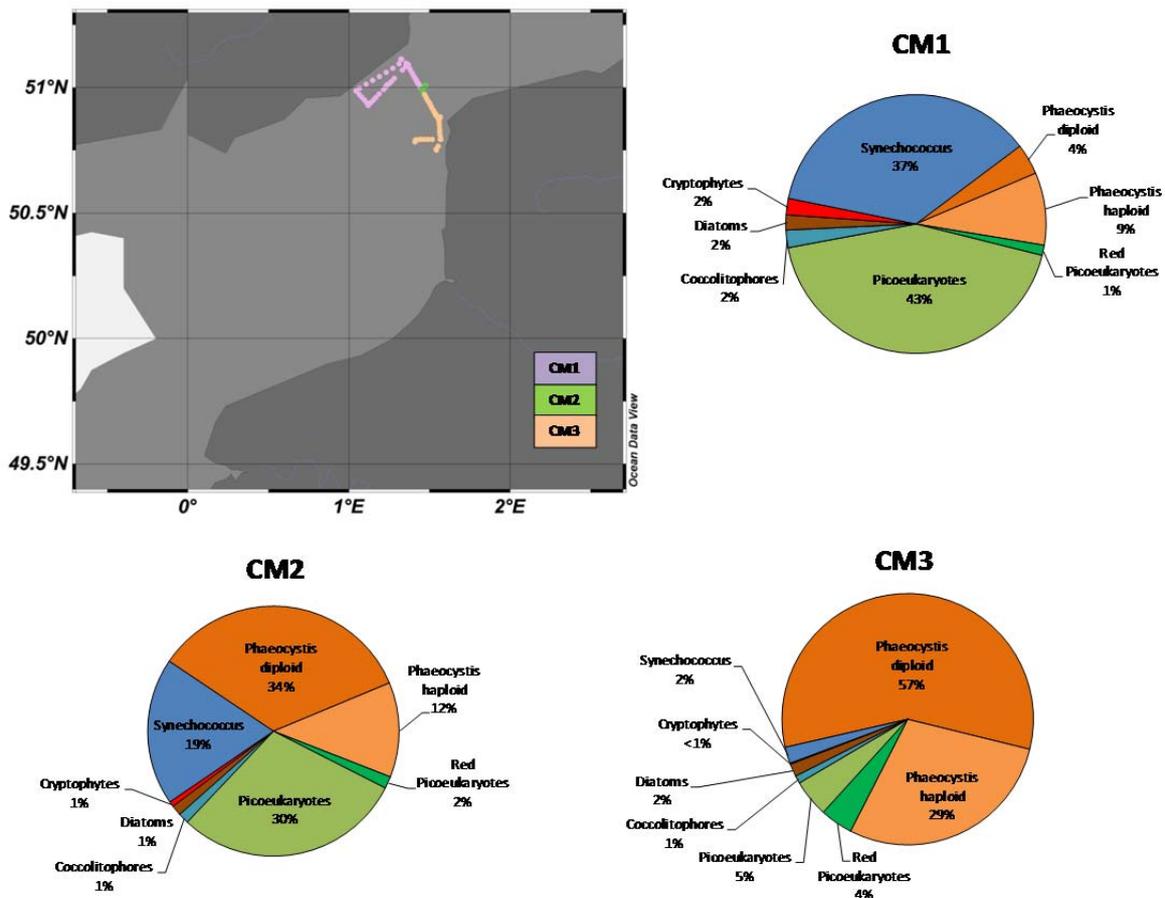


Figure 8 : carte représentant la localisation des différents assemblages phytoplanctoniques durant le leg1 (mi avril 2012) de la campagne DYPHYMA. Diagrammes des contributions relatives de chaque groupe phytoplanctonique à l'abondance phytoplanctonique totale, mis en évidence par cytométrie en flux au sein des assemblages. CM1 = communauté 1, CM2 = communauté 2, CM3 = communauté 3

Concernant le leg 2, quatre communautés phytoplanctoniques ont été identifiées (Figure 9, Bonato et al. 2015). Les communautés 3 et 4 correspondent surtout aux eaux côtières et du large françaises, ainsi qu'à Eastbourne. La communauté 2 est localisée dans les eaux du large du détroit. La communauté 1 enfin caractérise surtout les eaux côtières anglaises, ainsi que les eaux du large au niveau du détroit. Excepté pour les eaux côtières françaises directement sous l'influence des estuaires, la transition entre les communautés est parfois nette sur de courtes distances, comme mesuré dans les eaux côtières françaises au niveau du détroit du Pas-de-Calais avec presque toutes les communautés présentent sur une faible échelle spatiale : CM4 dans les eaux côtières ; CM1 dans les eaux du large et CM2 dans les eaux du centre du détroit. La distribution inégale des communautés phytoplanctoniques se retrouve aussi au niveau d'Eastbourne, où l'on peut observer les communautés 1,2 et 3 qui s'alternent sur seulement quelques kilomètres. Ceci ne montre malheureusement aucune corrélation évidente avec les paramètres physicochimiques.

Les communautés 3 et 4 sont caractérisées par une forte proportion de *Phaeocystis globosa* (58% et 79% de l'abondance totale respectivement, avec la dominance des cellules haploïdes). Les Picoeucaryotes sont plus représentés dans la communauté 4 que dans la communauté 3. Il en est de même pour les diatomées, à une échelle beaucoup plus faible. La CM2 est caractérisée par une forte contribution des Picoeucaryotes I (54%) et de *Synechococcus sp* (35%). Enfin, la CM1 est aussi caractérisée par une forte présence de Picoeucaryotes I (47%), mais avec moins de *Synechococcus* (23%) et plus de *Phaeocystis globosa* (11% haploïdes et 14% diploïdes).

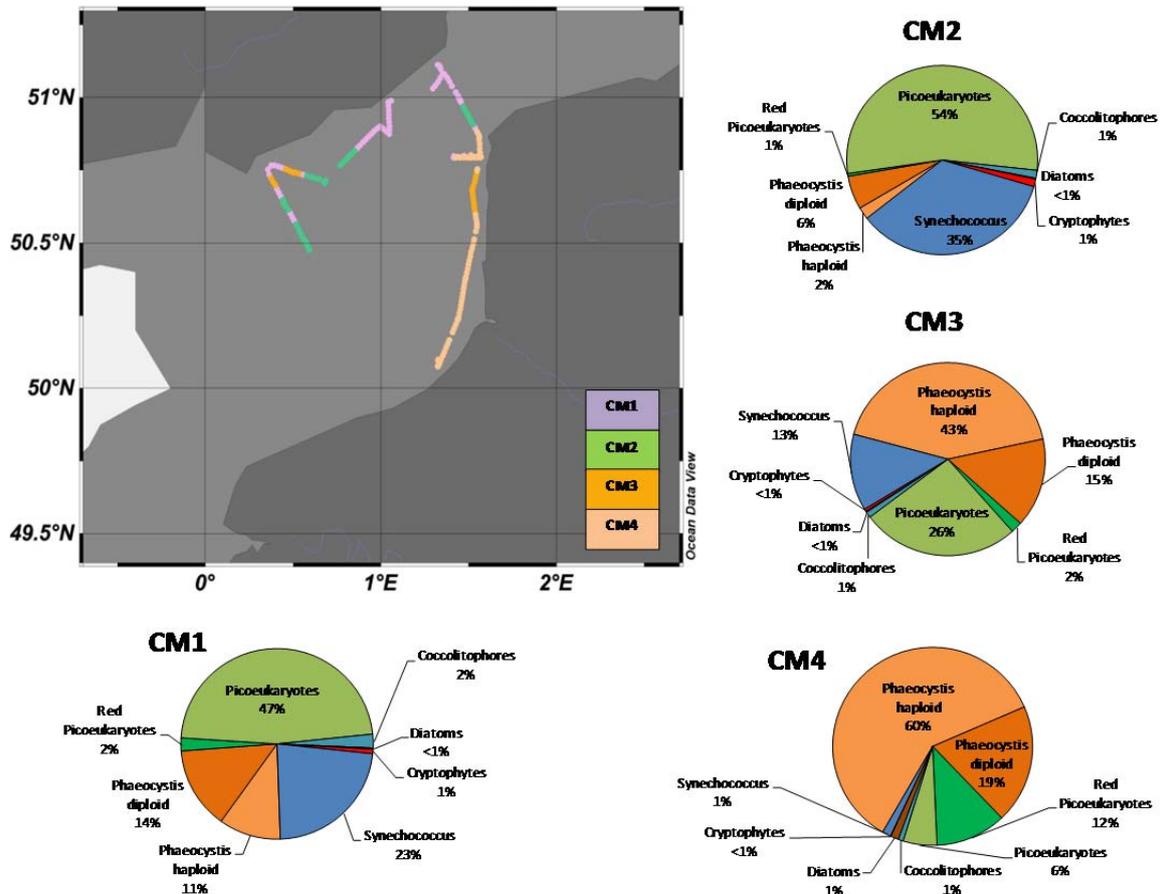


Figure 9 : carte représentant la localisation des différents assemblages phytoplanctoniques durant le leg2 (fin avril 2012) de la campagne DYPHYMA. Diagrammes des contributions relatives de chaque groupe phytoplanctonique à l'abondance phytoplanctonique totale, mis en évidence par cytométrie en flux au sein des assemblages. CM1 = communauté 1, CM2 = communauté 2, CM3 = communauté 3, CM4 = communauté 4 (Bonato *et al.*, 2015)

Concernant le leg 3, trois communautés ont pu être mises en évidence (Figure 10) : CM2 correspondant aux eaux côtières françaises soumises aux estuaires, CM1 correspond aux eaux côtières et du large anglaises, ainsi qu'aux eaux françaises entre Dieppe et Antifer, enfin CM3 correspond d'une part aux eaux de la côte vers le large au nord du détroit, aux eaux centrales du sud du détroit et aux eaux côtières autour d'Antifer. Aucune corrélation spatiale, ni avec les données environnementales n'a pu être mise en évidence, sauf pour la communauté 2, qui semble représenter une zone précise (influencée par les estuaires) et correspondant à des eaux de faible salinité et de forte température.

La CM1 est caractérisée par les Picoeucaryotes I avec 61% de l'abondance totale, et *Synechococcus sp* avec 22%. La CM2 correspond surtout à trois groupes : *Phaeocystis* haploïde et Picoeucaryotes I en quantité équivalente (environ 30%) et Picoeucaryotes II (26%). La CM3 enfin, est dominée par *Phaeocystis* haploïde (40%), avec une présence de *Synechococcus sp*, Picoeucaryotes I et Picoeucaryotes II à peu près identique (autour de 16%).

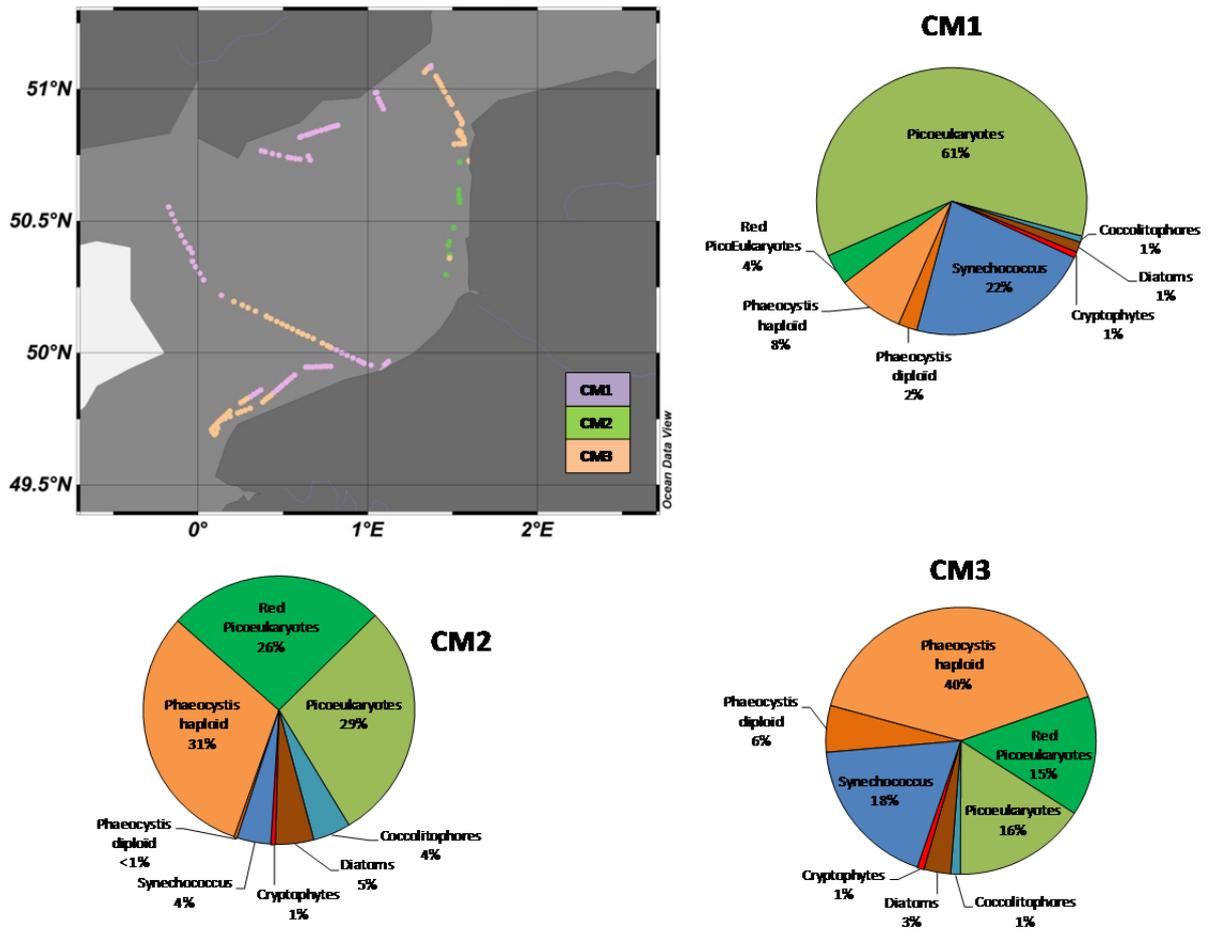


Figure 10 : carte représentant la localisation des différents assemblages phytoplanctoniques durant le leg3 (mai/juin 2012) de la campagne DYPHYMA. Diagrammes des contributions relatives de chaque groupe phytoplanctonique à l'abondance phytoplanctonique totale, mis en évidence par cytométrie en flux au sein des assemblages. CM1 = communauté 1, CM2 = communauté 2, CM3 = communauté 3

d) Analyses taxonomiques

Les analyses réalisées à partir des données taxonomiques du phytoplancton sur les différents legs de la campagne DYPHYMA, correspondent à l'identification et aux comptages microscopiques réalisés par deux laboratoires : l'IFREMER LER/BL et le LOG-ULCO. L'IFREMER a dénombré 67 espèces sur 23 stations échantillonnées et le LOG-ULCO a dénombré 51 espèces différentes sur 51 stations échantillonnées. Ces différences peuvent s'expliquer par les changements d'opérateurs puisqu'ils sont différents pour les deux laboratoires. Mais également par l'échantillonnage qui fut parfois différent (juste certaines stations communes).

Des analyses statistiques ont été effectuées afin de mettre en évidence, dans un premier temps, les regroupements entre les stations pour ensuite faire ultérieurement la correspondance avec les communautés phytoplanctoniques et les conditions environnementales impactant la Manche orientale.

Toutes ces analyses ont été effectuées avec le logiciel PAST (PAleontological STatistics). L'analyse descriptive des données passe par la réalisation de tests multi-variés comme l'analyse multidimensionnelle non métrique (NMDS). De plus, l'exécution d'une NMDS est relativement courante dans le milieu des sciences et principalement de la biologie (Winder and Hunter, 2008). En effet, c'est souvent la méthode choisie pour représenter graphiquement les relations entre les communautés (Clarke, 1993).

Les données d'abondance de chaque espèce du phytoplancton pour chaque station DPM de la campagne DYPHYMA de 2012 ont donc été traitées par cette analyse.

Cette méthode cherche à représenter dans un nombre d'axes pré-imposé et réduit, les relations d'ordre entre les objets. Le cadrage des objets est réalisé en minimisant de manière répétitive une fonction de stress et cela permet de représenter une matrice avec moins de déformations qu'avec une Analyse en Composantes Principales (ACP). Ainsi, cette analyse permet la recherche de la meilleure position de n objets sur k dimensions (axes) pour minimiser le stress résultant de la configuration à k dimensions. Il est possible de situer les objets dans un espace de dimension réduite, qui préserve autant que possible l'échelle des distances entre eux.

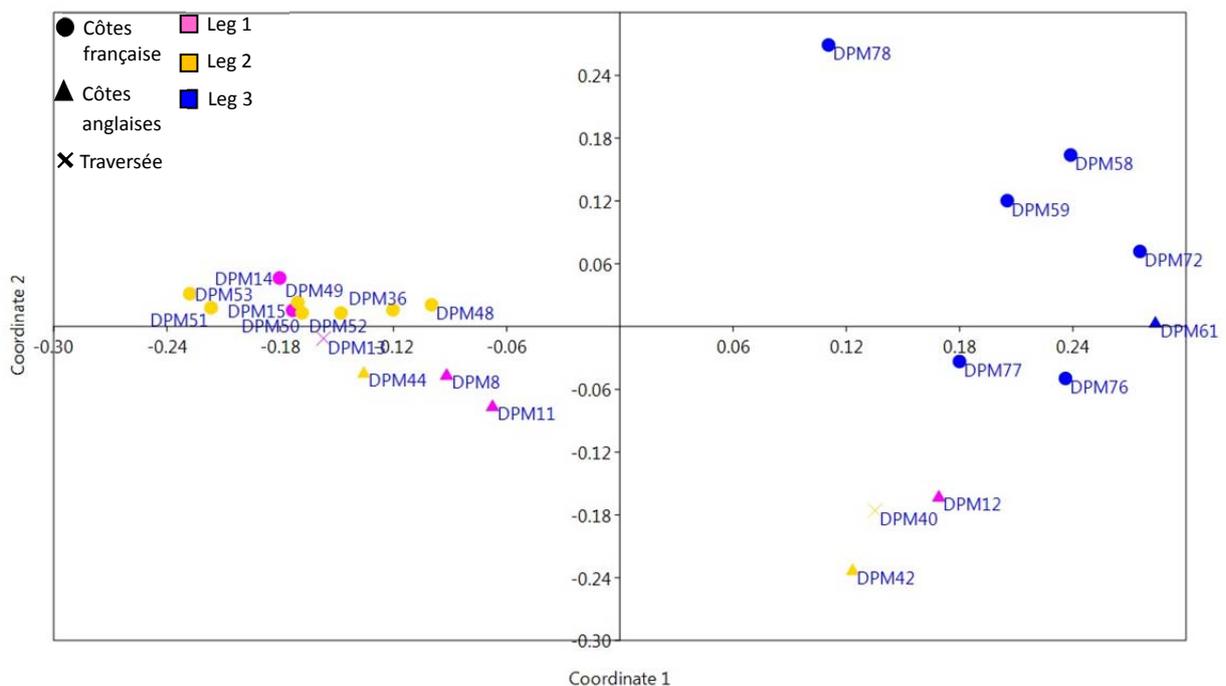
Dans notre cas, une analyse non-métrique (NMDS) est appliquée, c'est-à-dire que les données sont ordinales (rang). Ainsi, l'analyse s'intéresse plus à l'ordre des dissimilarités plutôt qu'à leur étendue (dans le cas de l'analyse métrique la mesure des dissimilarités utilisée est une distance euclidienne). La NMDS permet l'approximation de l'ordre des entrées dans la matrice des dissimilarités par l'ordre des distances dans l'espace de dimension réduit.

Le calcul des distances a été effectué automatiquement par la méthode de Bray-Curtis grâce

au logiciel PAST.

La représentation graphique de Shepard (Annexe 2, A et B) montre les distances de l'ordination représentées contre les dissimilarités de la communauté et l'ajustement est comptabilisé comme une ligne de pas monotone. La faible dispersion des points suggère que les dissemblances d'origines sont bien conservées. Cette figure nous fournit également une valeur de stress dont la valeur est importante. En effet, plus le stress est faible, plus la représentation sera fiable. Généralement, celui-ci ne doit pas dépasser 0,20 (Clarke, 1993). Le stress obtenu pour les comptages de l'IFREMER est de 0,1332 et de 0,1779 pour les comptages réalisés par le LOG-ULCO.

Les Figure 11 et 12 ci-dessous représentent les graphiques des NMDS d'après les comptages de l'IFREMER et du LOG-ULCO.



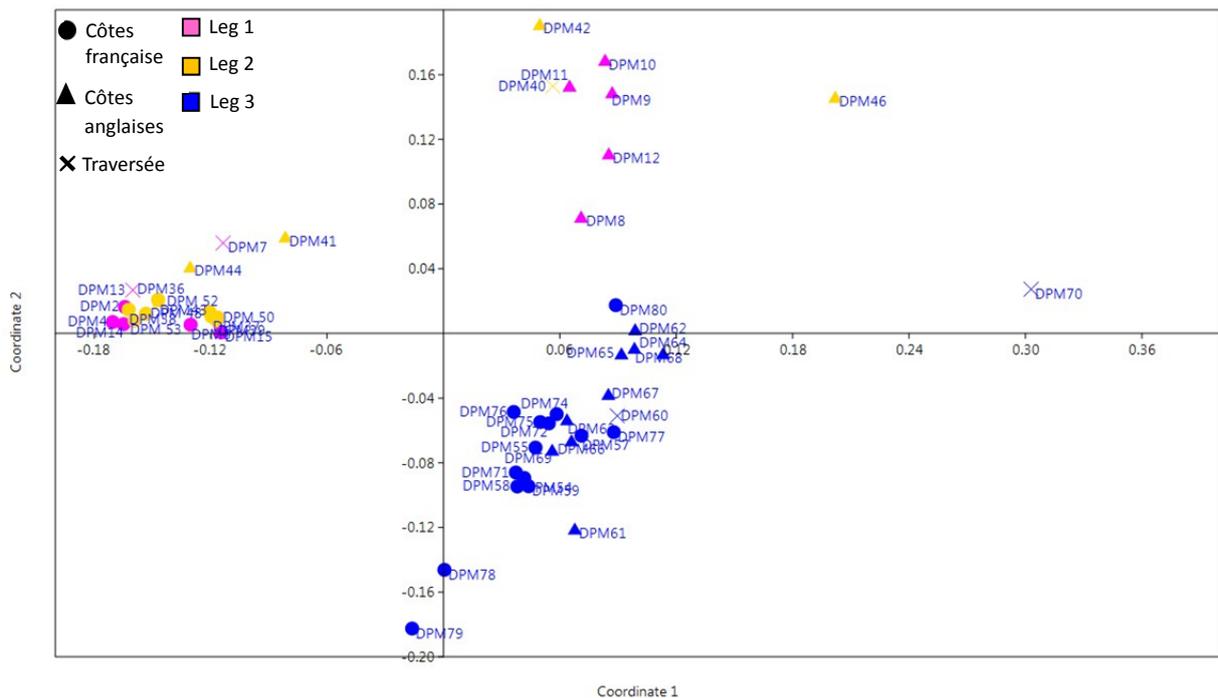


Figure 12 : ordination des échantillons dans l'espace défini par les axes 1 et 2 de la NMDS sur la répartition des espèces du phytoplancton sur les stations DPM de la campagne DYPHYMA pour les comptages réalisés par le LOG-ULCO. Le stress est de 0,1779

Malgré les différences au niveau du nombre de stations échantillonnées et en termes de richesse spécifiques, les graphiques des NMDS montrent globalement les mêmes tendances. Le leg 3, représenté en bleu, est bien isolé par rapport aux deux autres legs. Les communautés phytoplanctoniques semblent donc plus similaires au cours du mois de mai-juin puisque l'analyse a regroupé les stations DPM. Les comptages réalisés par le LOG-ULCO (Figure 12) permettent également de distinguer légèrement les côtes anglaises (représentées par un triangle) des côtes françaises (représentées par un rond). Les communautés seraient donc différentes entre les deux côtes même fin mai-début juin, ce qui semble logique au vu des apports nutritifs majoritaires sur les côtes françaises, mais également de part la séparation nette au niveau de la salinité (pour rappel, les côtes anglaises possèdent un gradient de salinité plus élevé que les côtes françaises).

En annexe 3 figurent les dendrogrammes. Ceux-ci permettent la même distinction que sur le diagramme des NMDS.

e) Analyses fluorimétriques sur les DPM de la campagne DYPHYMA

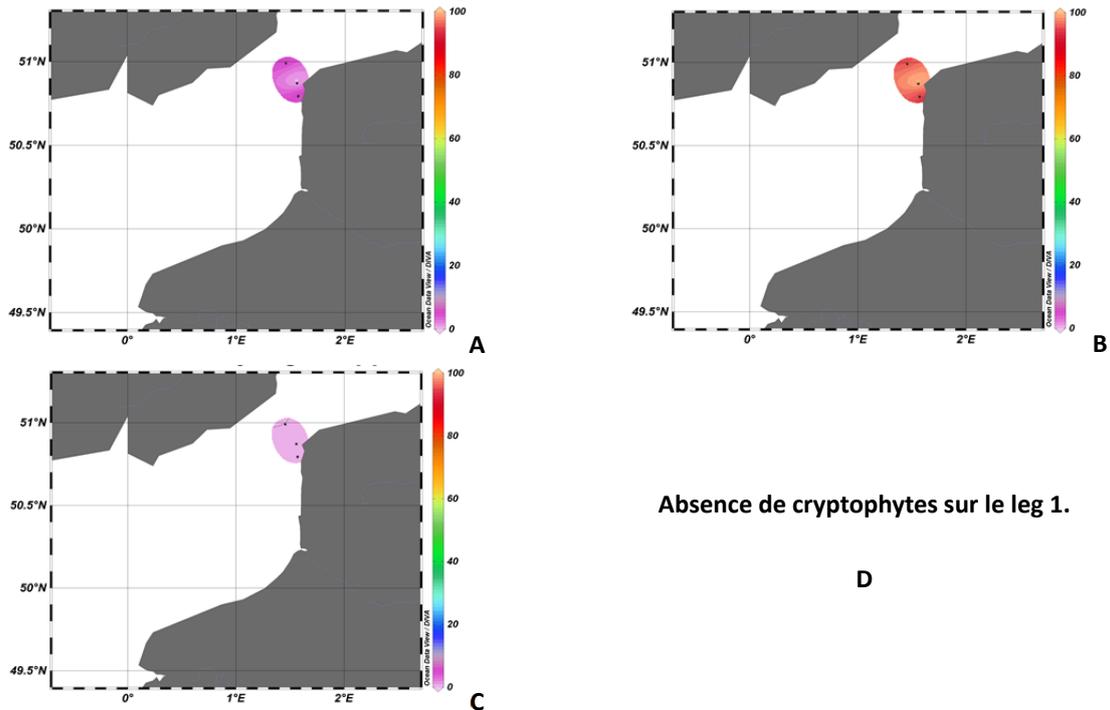
La Figure 13 présente la comparaison des groupes algaux obtenus à partir du Fluoroprobe en pourcentage relatif (empreintes *Phaeocystis*, Bluegreen, Diatoms, Cryptophyta) sur les différentes stations DPM des legs 1, 2 et 3, lors de la campagne DYPHYMA.

Le leg 1 présente trop peu de points échantillonnés pour faire une comparaison adéquate. Malgré tout, l'empreinte créée de *Phaeocystis* (Houliet *et al.*, 2012), semble dominer.

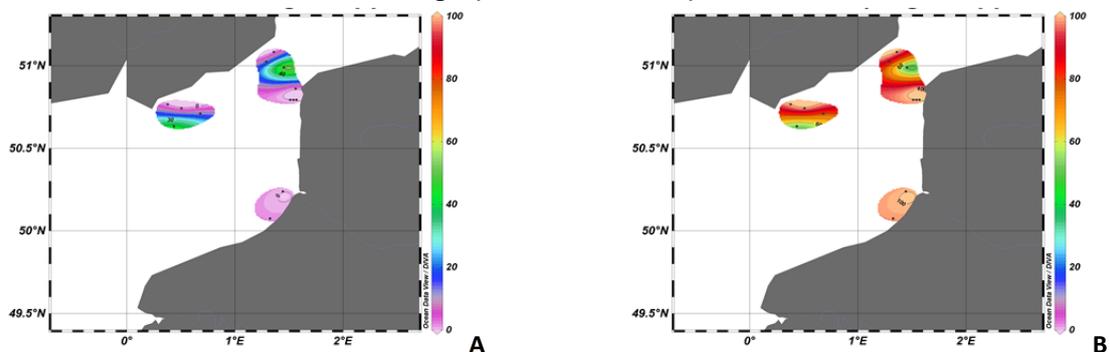
Le leg 2 permet d'observer la différence entre les côtes anglaises, les côtes françaises et la traversée au niveau du détroit. Il en ressort que spatialement et quantitativement, les côtes anglaises sont plus touchées par la dominance des diatomées alors que *Phaeocystis* semble plus importante sur les côtes françaises.

Enfin, le leg 3 permet d'observer une répartition plus complète entre la France et l'Angleterre. On constate que les zones où les diatomées sont peu présentes (zones rosées), le groupe de *Phaeocystis* domine. Ces derniers résultats semblent légèrement étonnants, car sur le leg 3, les autres méthodes ne distinguent pas autant de *Phaeocystis*, alors qu'ici il s'agit clairement du groupe dominant.

Leg 1 (20 et 21/04/12)



Leg 2 (27, 28 et 29/04/12)



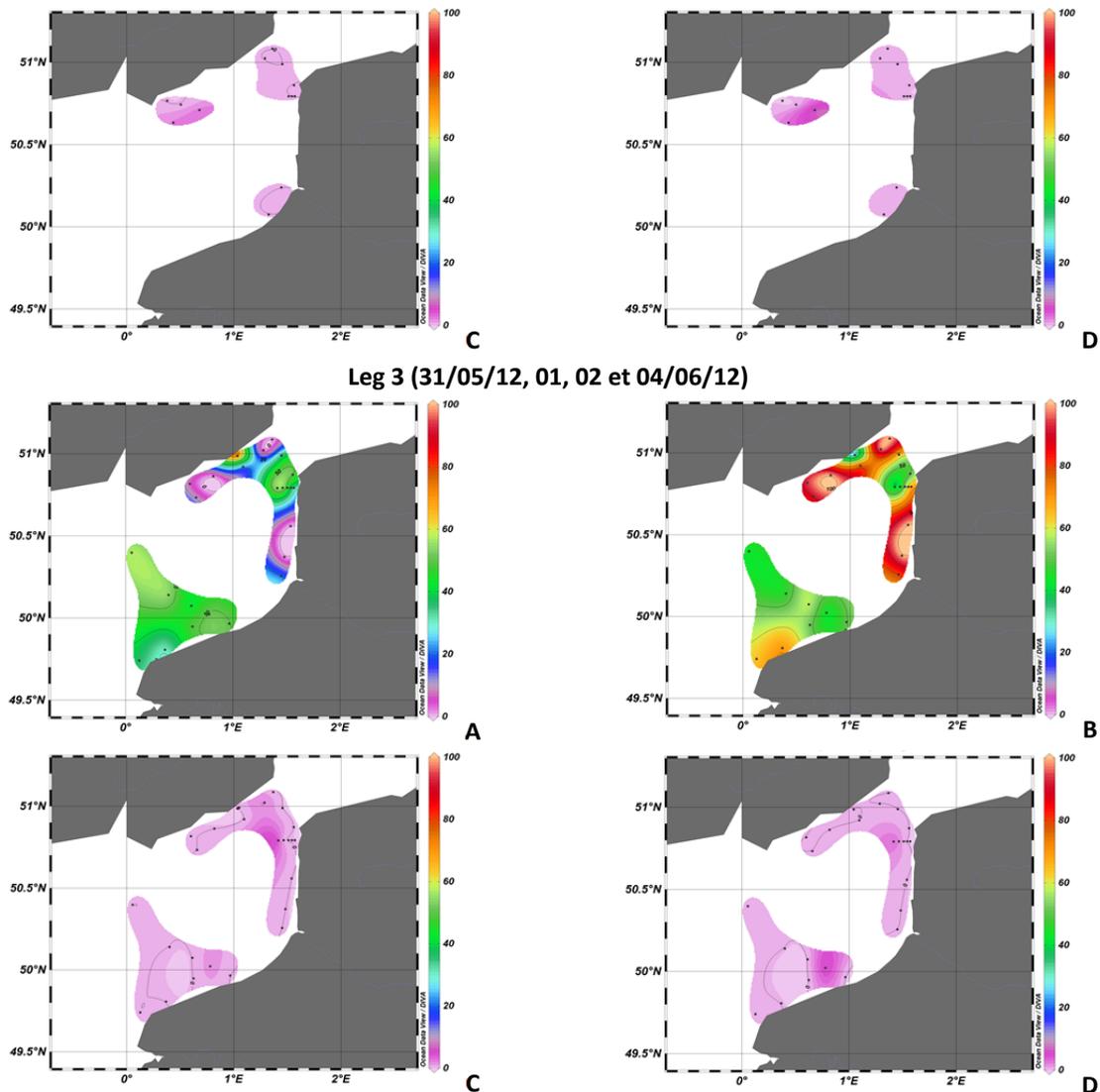


Figure 13 : comparaison des groupes algues obtenus à partir du Fluoroprobe en pourcentage relatif (A : empreinte diatoms, B : *Phaeocystis*, C : bluegreen, D : cryptophytes) sur les différentes stations DPM des legs 1, 2 et 3, lors de la campagne DYPHYMA

f) Comparaison de la résolution des communautés phytoplanctoniques par différentes techniques (campagne DYPHYMA)

Les figures 14, 15 et 16 représentent le pourcentage relatif de chaque groupe d'algues identifié par les différentes méthodes (comptages, cytométrie et fluoroprobe).

Le leg 1 (Figure 14) est difficilement comparable entre les méthodes du fait de l'absence de nombreuses stations (DPM) pour les comptages réalisés par l'IFREMER et pour le Fluoroprobe. Cependant, on peut tout de même observer que les stations DPM 1 à 7 sont caractérisées par une forte fluorescence de l'espèce *Phaeocystis*. A ce niveau de la

Convention ONEMA-Ifremer 2014

campagne, les prélèvements ont été effectués au niveau des côtes françaises. Puis entre les stations DPM 8 à 12, qui caractérisent les côtes anglaises, les diatomées prennent le dessus sur *Phaeocystis*. Sur la station DPM 12, les données de comptages (IFREMER) et de cytométrie montrent une augmentation de la proportion des Cryptophytes. La station DPM 13 est également intéressante, particulièrement au regard des résultats par la cytométrie. En effet, cette station est située au milieu de la Manche et présente une répartition quasiment égale, entre *Phaeocystis*, *Synechococcus* et les Picoeucaryotes. Ces cellules étant très petites, elles sont difficilement observables et quantifiables par les autres méthodes.

Enfin, jusqu'à la station DPM 15 (côtes françaises), la communauté est dominée par *Phaeocystis*.

Le leg 2 (Figure 15) est caractérisé par une dominance de *Phaeocystis globosa* sur les autres groupes phytoplanctoniques, quelle que soit la méthode, en termes de fluorescence. De plus, il est important de rappeler que la cytométrie permet d'identifier un plus grand nombre de groupes algaux dont les plus petits comme par exemple les Picoeucaryotes.

Pour le leg 3 (Figure 16), les trois méthodes ne sont pas similaires. Les comptages indiquent une dominance des diatomées avec la présence de dinoflagellés principalement aux stations DPM 54 et 62. La cytométrie permet de distinguer les côtes françaises (stations DPM 54 à 59 puis DPM 71 à 80) des côtes anglaises (stations DPM 61 à 69). En effet, le long des côtes françaises, les diatomées contribuent pour une majeure partie à la fluorescence, alors que le long des côtes anglaises, les Picoeucaryotes et *Phaeocystis globosa* contribuent aux valeurs de fluorescence de façon équivalente aux diatomées.

Convention ONEMA-Ifrermer 2014

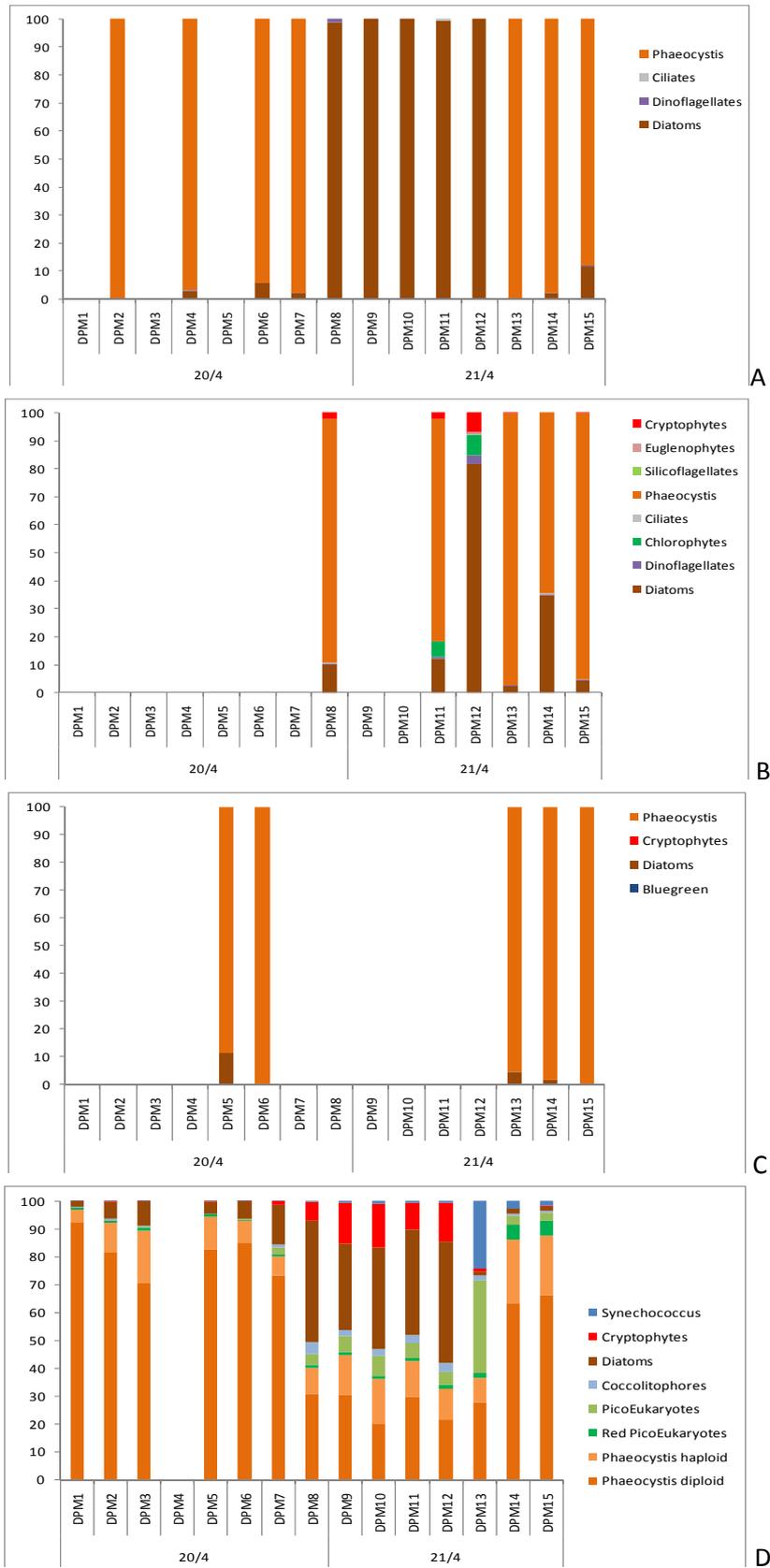


Figure 14 : diagramme présentant les principaux groupes algaux sur le leg 1 de la campagne DYPHYMA suivant les différentes méthodes en pourcentage relatif (%). A : groupes phytoplanktoniques par comptages du LOG-ULCO. B : groupes phytoplanktoniques par comptages de l'IFREMER. C : groupes phytoplanktoniques par le Fluoroprobe. C : groupes phytoplanktoniques par cytométrie

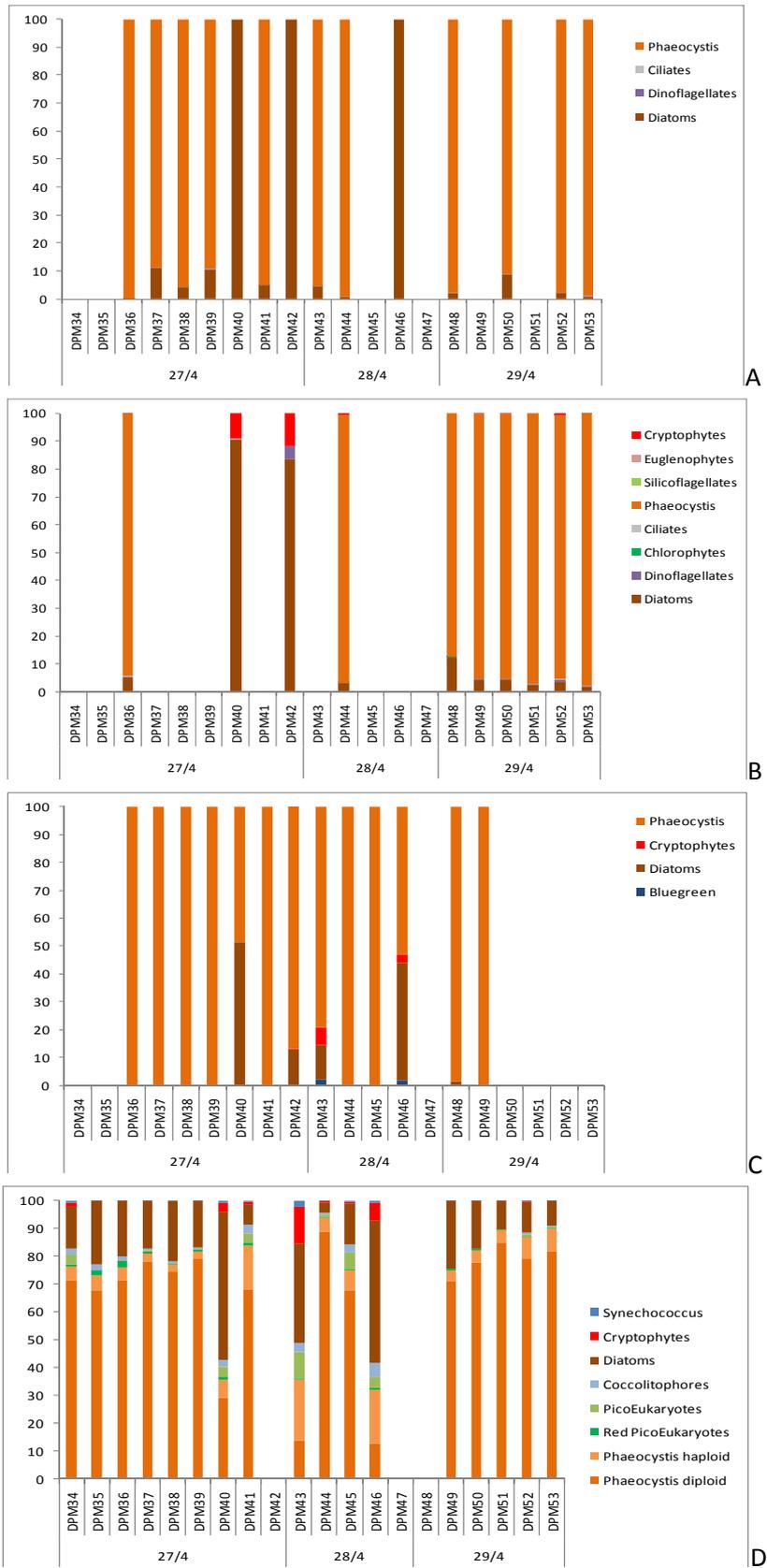


Figure 15 : diagramme présentant les principaux groupes algaux sur le leg 2 de la campagne DYPHYMA suivant les différentes méthodes en pourcentage relatif (%). A : groupes phytoplanktoniques par comptages du LOG-ULCO. B : groupes phytoplanktoniques par comptages de l'IFREMER. C : groupes phytoplanktoniques par le Fluoroprobe. D : groupes phytoplanktoniques par cytométrie

Convention ONEMA-Ifremer 2014

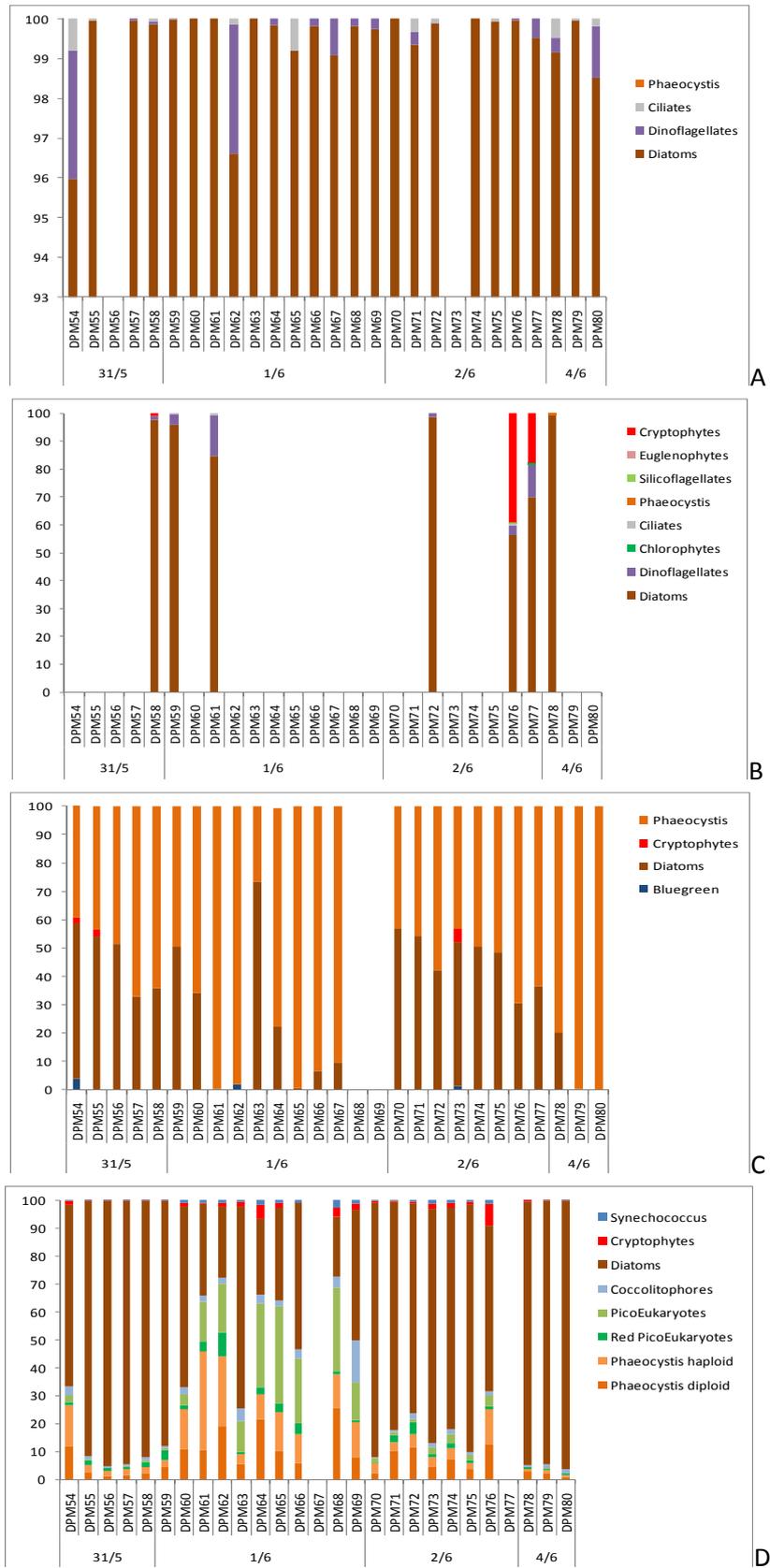


Figure 16 : diagramme présentant les principaux groupes algaux sur le leg 3 de la campagne DYPHYMA suivant les différentes méthodes en pourcentage relatif (%). A : groupes phytoplanctoniques par comptages du LOG-ULCO. B : groupes phytoplanctoniques par comptages de l'IFREMER. C : groupes phytoplanctoniques par le Fluoroprobe. D : groupes phytoplanctoniques par cytométrie

2) Dynamique saisonnière et inter-annuelle du phytoplancton en Manche Orientale (Station côtière R1 – radiale Wimereux-Slack)

La dynamique saisonnière du phytoplancton a été suivie à haute résolution temporelle (toutes les semaines lorsque cela fut possible). Pour cela, les techniques de cytométrie en flux, de fluorescence, mais également de comptage phytoplanctonique, ont été appliquées.

a) Nutriments et paramètres hydrologiques

Les Figure 17 et Figure 18 présentent les évolutions temporelles de la salinité et de la température au niveau du point R1 de la radiale Wimereux-Slack. 87 mesures ont été utilisées pour la réalisation des profils temporels, soit 28 mesures en 2011, 21 en 2012, 19 en 2013 et 19 en 2014.

La salinité (Figure 17) varie au cours des saisons de chaque année. Cette variabilité s'explique également par le cycle des marées et des épisodes sporadiques des pluies qui ont une influence notable sur ce gradient. Cependant, la valeur moyenne reste globalement stable variant entre 34 et 34,3.

On constate, tout de même, une dessalure entre juillet 2013 et janvier 2014 où le minimum est atteint en janvier à une salinité de 33.

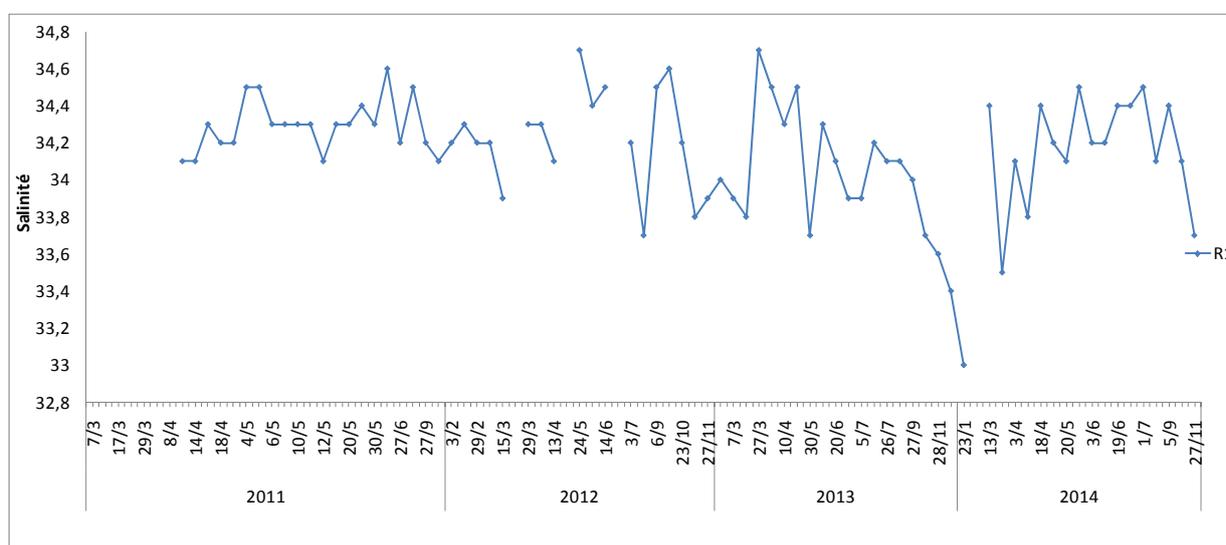


Figure 17 : évolution de la salinité sur le point R1 de la radiale Wimereux-Slack entre 2011 et 2014

La Figure 18, permet de voir le gradient de température suivant les saisons. La courbe est bien marquée et permet d'observer un cycle avec des températures maximales en été (entre juin et septembre de chaque année) et minimales en hiver (entre janvier et avril lorsque les données sont disponibles). De plus, il apparaît que les températures augmentent légèrement au fil des années (notamment en fin de période) pour les minimums, maximums et les

Convention ONEMA-Ifremer 2014

moyennes (Tableau 1).

Tableau 1 : température (°C) moyenne, maximale et minimale entre 2011 et 2014 sur le point R1 de la Radiale Wimereux-Slack

Température (°C)	2011	2012	2013	2014
Moyenne	13,1	11,5	11,2	13,4
Max	17,1	18,0	18,2	18,5
Min	9,8	5,5	5,3	8,4

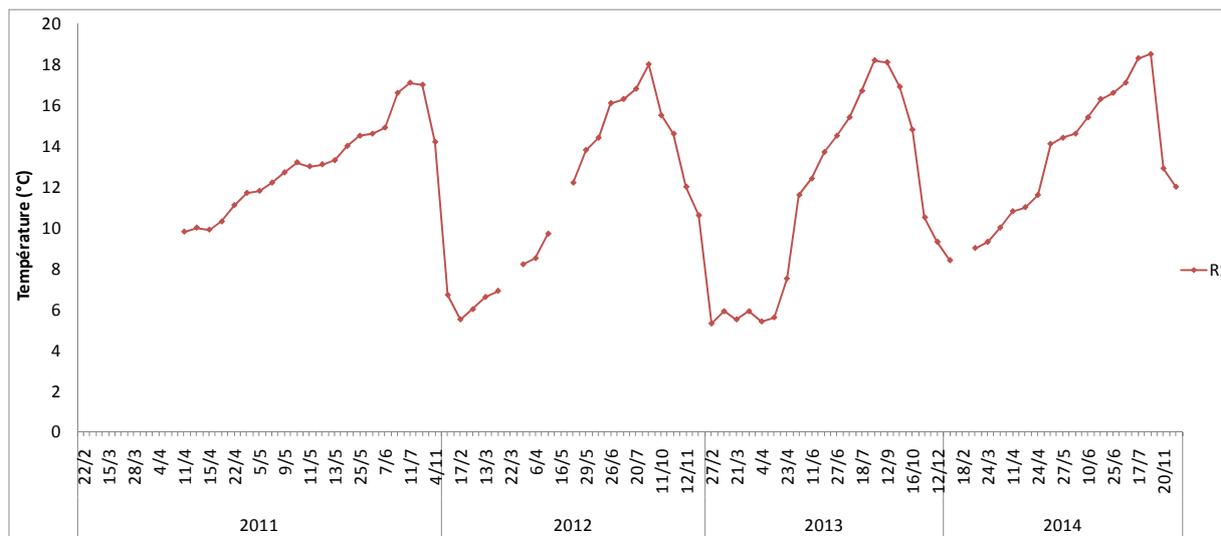


Figure 18 : évolution de la température (°C) sur le point R1 de la radiale Wimereux-Slack entre 2011 et 2014

b) Chlorophylle a

Au niveau du point R1, le graphique présentant les différentes concentrations en chlorophylle *a* (Figure 19), montre son évolution de 2011 à 2014.

Les analyses n'étant pas toujours effectuées, il manque certaines données. C'est notamment le cas pour les données issues de la cytométrie, ce qui explique les différences qui semblent importantes dans la figure ci-dessous. Pour les données du Fluoroprobe il manque certaines données de 2014 qui seront ajoutées dans la suite. Ces analyses seront par ailleurs complétées, analysés statistiquement et discutées en profondeur dans le prochain rapport.

Cependant, en première analyse, nous pouvons observer que les méthodes de fluorescence (fluorescence *In vivo* et par Fluoroprobe) se suivent particulièrement bien en 2012. D'un point de vue annuel, la courbe de chlorophylle *a* par extraction (courbe verte) et celle par fluorescence *In vivo* (courbe rouge) suivent très bien les mêmes tendances.

Convention ONEMA-Ifremer 2014

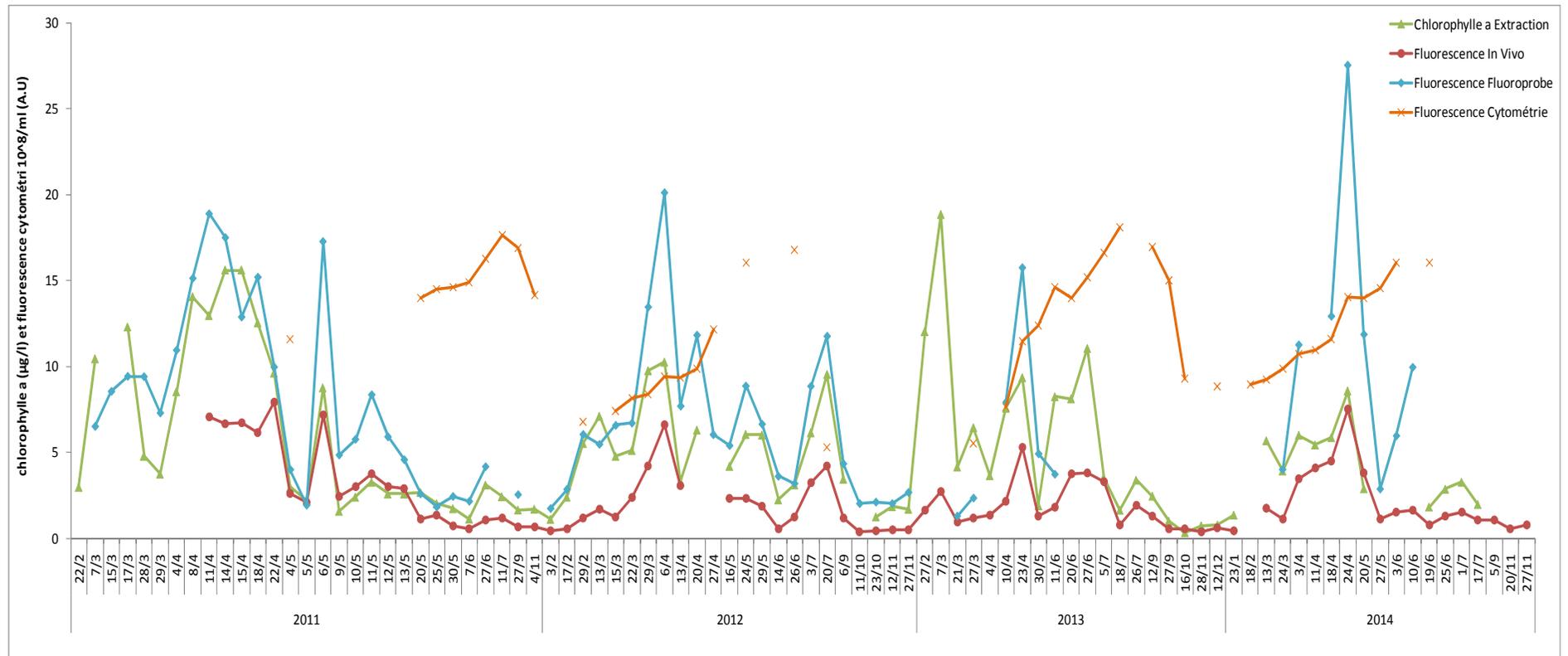


Figure 19 : courbes représentant la quantité de chlorophylle a au cours du temps (entre 2011 et 2014) sur le point R1 selon les différentes méthodes de quantification

c) Analyses cytométriques en continu

Le suivi saisonnier du point R1 de la radiale Wimereux-Slack par cytométrie en flux a été réalisé sur l'abondance et la fluorescence des groupes phytoplanctoniques (Figure 20).

L'abondance permet de mettre en évidence deux blooms successifs au cours de l'année : le premier en avril/mai dominé par *Phaeocystis globosa*, le second autour de juillet/septembre dominé par *Synechococcus* et les Picoeucaryotes I.

En ce qui concerne les données de fluorescence, on remarque des pics de fluorescence par *Phaeocystis* autour du mois d'avril, alors que le reste de l'année, ce sont les diatomées qui sont responsables des pics de fluorescence, avant et/ou après les maxima de *Phaeocystis*.

Les Coccolithophoridés et les Cryptophytes sont très peu représentés, que ce soit en termes d'abondance ou de fluorescence.

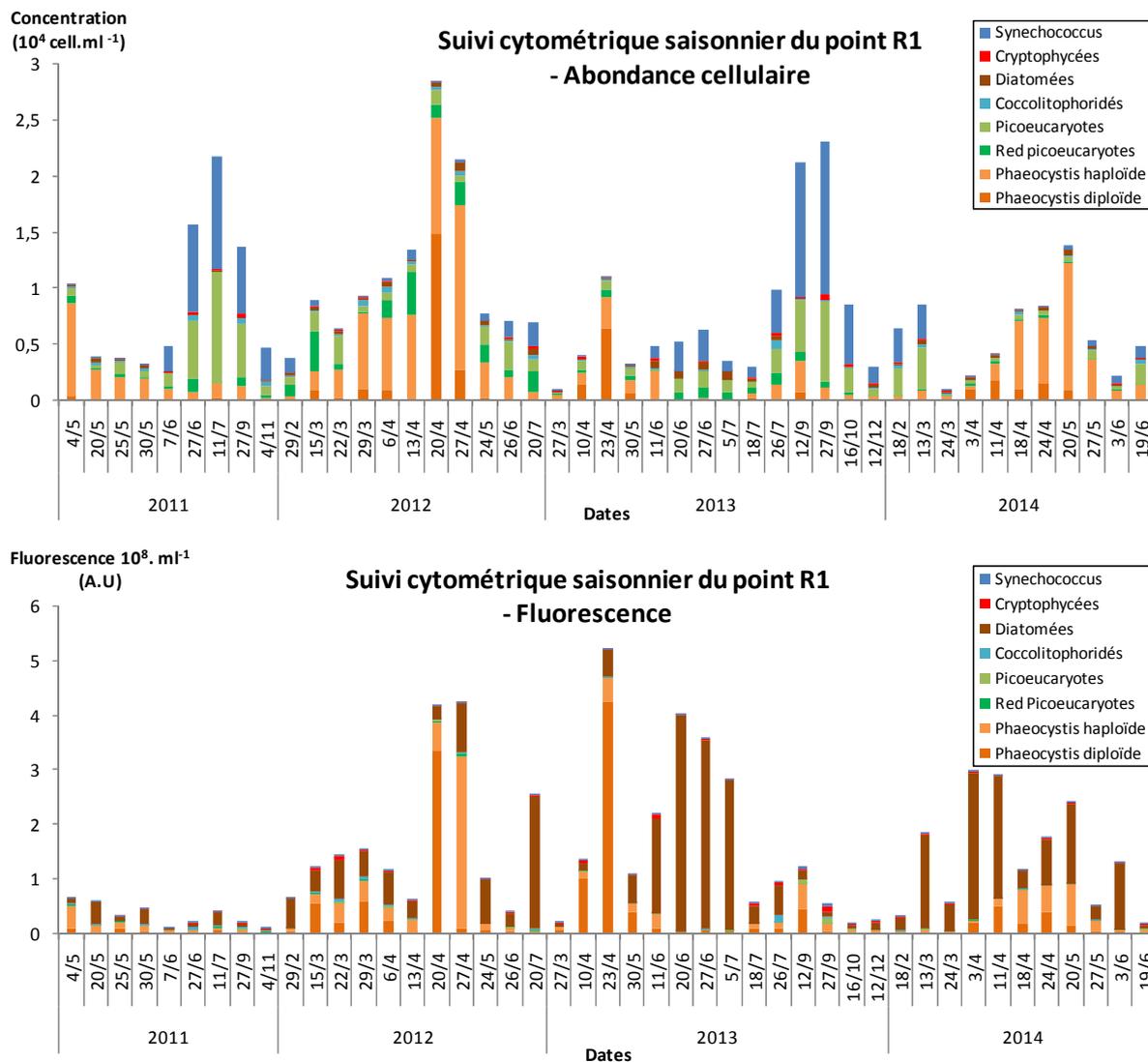


Figure 20 : suivi saisonnier du point R1 de la radiale Wimereux-Slack par cytométrie en flux, entre mai 2011 et juin 2014 : abondance cellulaire (graphique du haut) et fluorescence (graphique du bas)

d) Analyses taxonomiques

Pour les comptages, le suivi à plus haute fréquence permet de caractériser le premier semestre 2012 avec des prélèvements réalisés 15 fois entre février et juin. L'abondance est présentée sur la Figure 21. Elle permet d'observer l'augmentation des populations phytoplanctoniques dès la mi-mars pour ensuite diminuer au mois de mai.

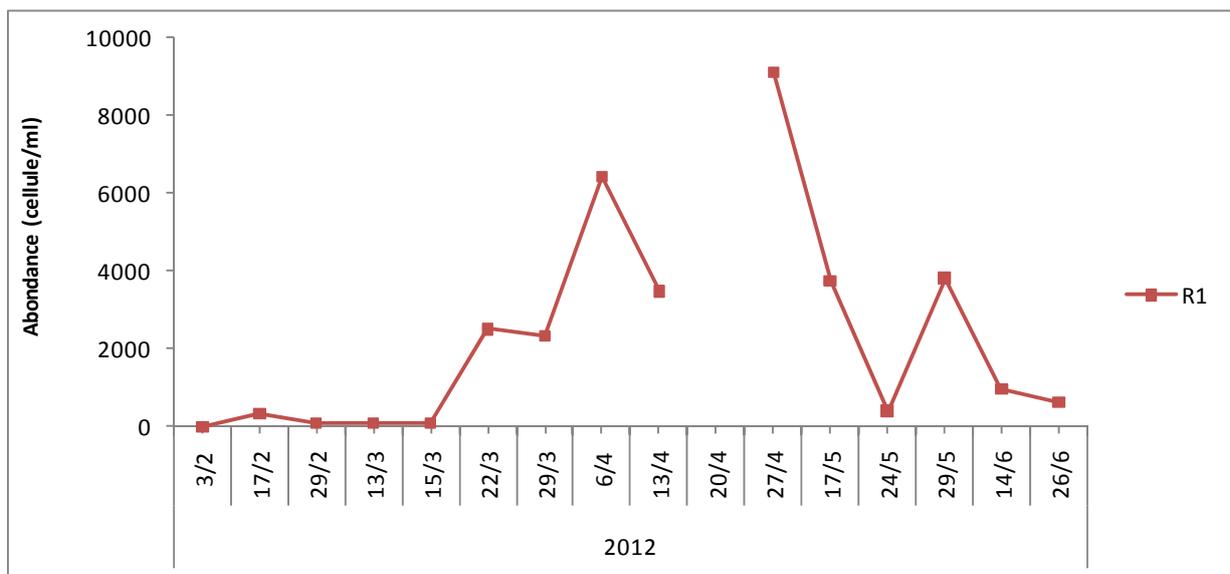


Figure 21 : évolution de l'abondance phytoplanctonique au niveau du point R1 de la Radiale Wimereux-Slack en 2012

La répartition des groupes algaux change au fil des mois de l'année comme cela a été observé par les autres méthodes (cf partie cytométrie et fluoroprobe sur le point R1).

La Figure 22 ci-dessous, permet d'observer la succession des groupes phytoplanctoniques. La communauté est clairement dominée, au début de l'année, par les diatomées. On voit, par ailleurs, l'apparition de quelques dinoflagellés à la même période. Puis à partir du mois de mars, le genre *Phaeocystis* domine jusqu'à fin avril où les diatomées prennent ensuite le relais.

Si l'on compare la succession obtenue par comptage avec celle obtenue par l'abondance cytométrique en 2012, on observe bien la dominance de *Phaeocystis* entre mars et avril. Cependant, les diatomées ne dominent pas avant et après ce bloom, il s'agit des Picoeucaryotes et des Red Picoeucaryotes qui sont des espèces de petites tailles théoriquement non visibles par microscope optique classique.

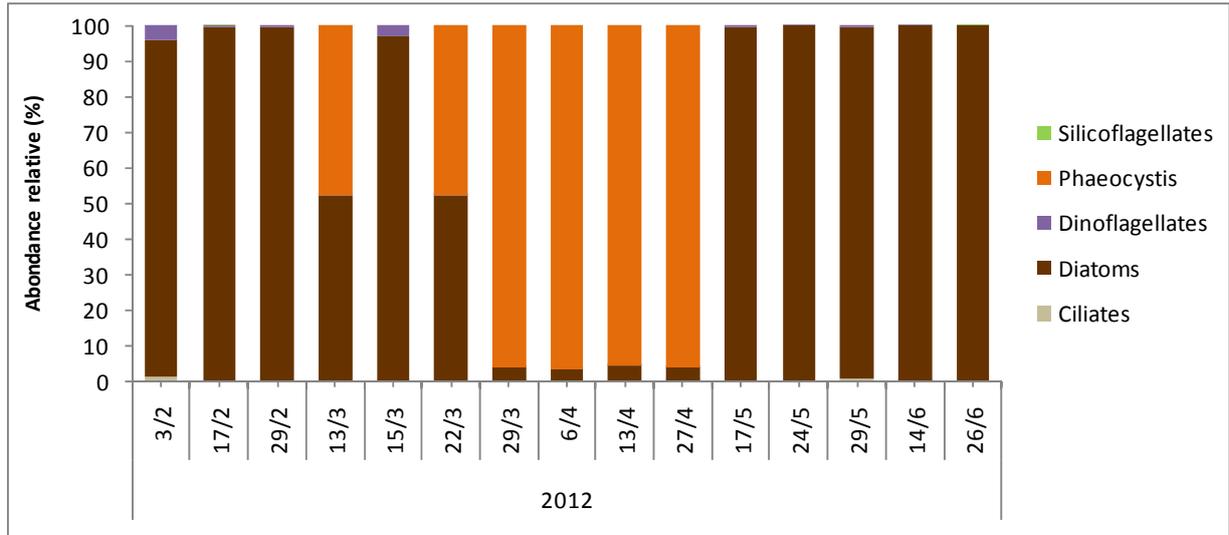


Figure 22 : abondance relative des principaux groupes algaux identifiés par la méthode de comptage microscopique sur le point R1 de la Radiale Wimereux-Slack en 2012

e) Analyses fluorimétriques du point R1 entre 2011 et 2014

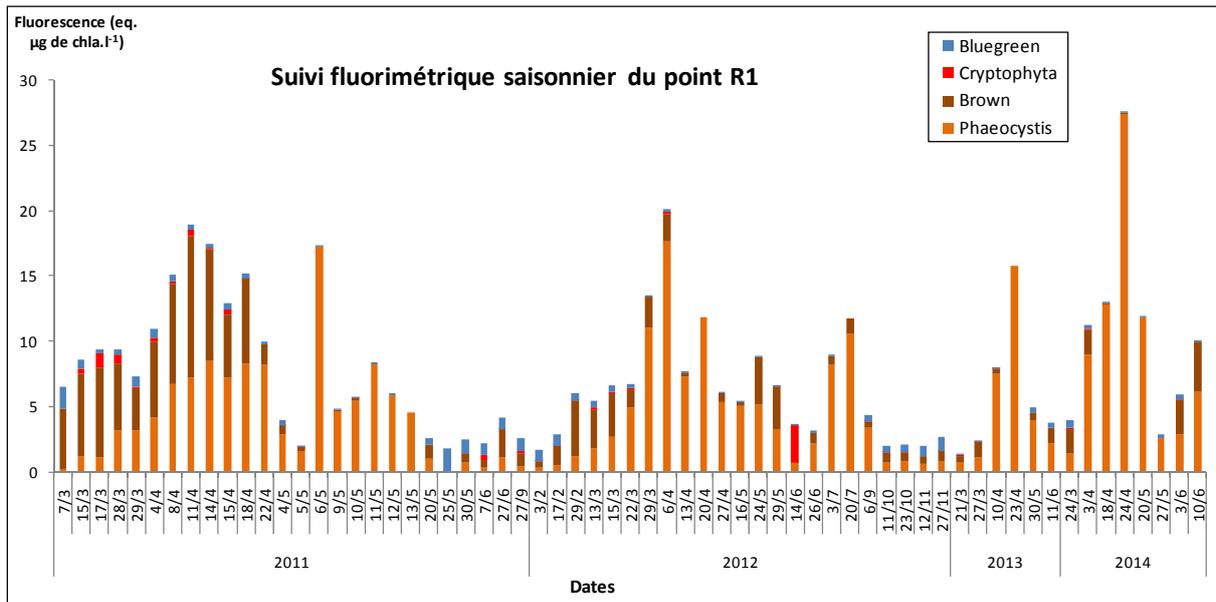


Figure 23 : suivi saisonnier du point R1 de la radiale Wimereux-Slack par fluorimétrie spectrale, entre mars 2011 et juin 2014

Le suivi saisonnier du point R1 par fluorimétrie spectrale (Figure 23, ci-dessus) met en évidence le développement d'un bloom autour du mois d'avril avec des valeurs de fluorescence variant entre 15 et 25 équivalent de μg de chlorophylle *a* par litre.

On remarque une présence importante de diatomées durant le printemps 2011, équivalente à celle de *Phaeocystis globosa*. Au cours des années suivantes, les diatomées sont présentes avant et après les blooms de *Phaeocystis*, mais en moindre quantité. Ceci peut-être dû, non

seulement à la fréquence plus faible d'échantillonnage, mais également au fait que le fluoroprobe, au delà d'un certain seuil de concentration d'une micro-algue donnée (dont l'empreinte a été enregistrée au préalable), considèrerait qu'elle représente la majorité du signal.

Le développement des *Synechococcus* observé à partir de juillet rejoint quant à lui ce qui a déjà été démontré par les résultats de la cytométrie (Voir partie c).

3) Dynamique de la distribution spatiale du phytoplancton (à haute résolution) en Manche Orientale (radiale Wimereux-Slack) en 2012

La distribution spatiale à haute résolution suivie de façon hebdomadaire est également intéressante à étudier puisqu'elle permet de se rendre compte de l'évolution des différentes espèces de phytoplancton de la côte vers le large par exemple. En effet, il est intéressant de considérer l'évolution de la distribution spatiale pendant la saison typiquement caractérisée par des blooms d'algues, dans un milieu soumis à de fortes variations de la répartition des masses d'eau (marée, apports locaux, effet hydrodynamique du Cap au niveau du Déroit, etc.).

Pour cela, la radiale Wimereux-Slack (Figure 1) a été échantillonnée de manière régulière hebdomadairement (lorsque possible), au cours de l'année 2012.

Ainsi, l'examen de la distribution spatiale des groupes phytoplanctoniques a été réalisé en référence à la répartition des concentrations en chlorophylle *a* totale. Mais aussi par la distinction des groupes algaux majoritaires suivant les méthodes de cytométrie en flux, de fluorescence par le Fluoroprobe et par des comptages microscopiques.

a) Nutriments et paramètres hydrologiques

La gamme de valeurs des variables physico-chimiques enregistrées le long de la radiale entre février et juillet 2012 montre que le phytoplancton a supporté différentes conditions environnementales, bien que les valeurs correspondent à celles habituellement mesurées dans cette région (Figure 24).

Les variables température, DIN (Azote Inorganique Dissous), DSi (Silice Dissoute) et le niveau de luminosité journalier montrent tous des distributions saisonnières typiques des systèmes côtiers tempérés.

Ainsi, la température et le niveau de luminosité journalier augmentent au fur et à mesure que l'on se rapproche des mois estivaux, tandis que les valeurs maximales de DIN et DSi

Convention ONEMA-Ifremer 2014

apparaissent au mois de février et décroissent ensuite au fil des mois, avec un réel appauvrissement respectif à partir de mi-mars et mi-avril.

Le DIP (Phosphate Inorganique Dissous) montre une dynamique différente, avec des valeurs maximales en février et une forte diminution à partir de fin février, jusqu'à un niveau faible conservé jusqu'en juillet.

Spatialement, la salinité montre un gradient longitudinal typique, avec les valeurs maximales enregistrées dans les eaux du large, mais une variabilité de la limite entre les eaux dessalées (moins de 34,5) et les eaux du large, dépendant du niveau et coefficient de marée considéré et de la plus ou moins grande importance des apports continentaux en raison des régimes de pluies avant ou pendant la période échantillonnée. Ceci résulte des apports d'eau douce par les rivières de la zone côtière et de la plus forte influence de la remise en suspension de la matière aux stations côtières moins profondes.

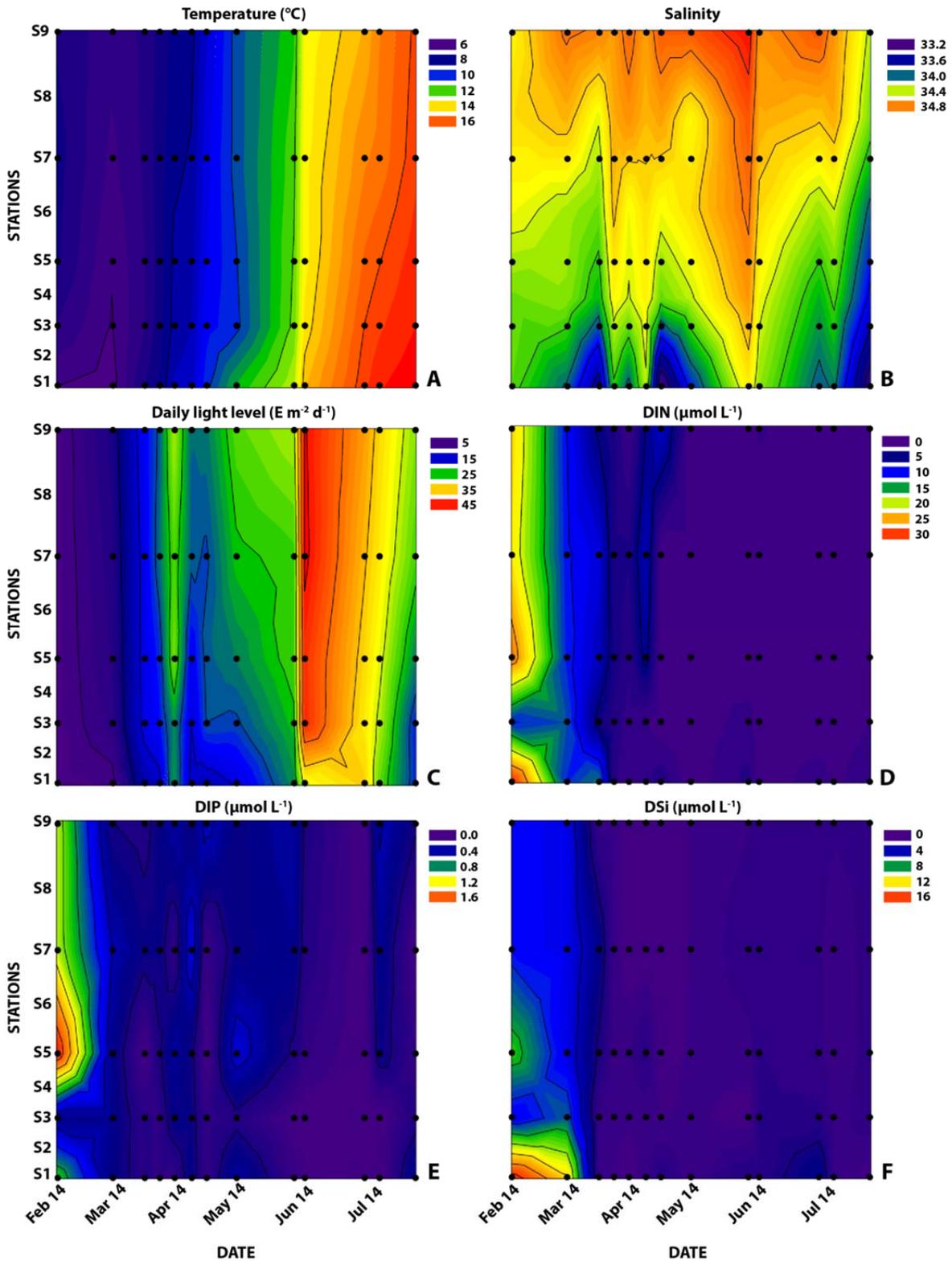


Figure 24 : évolution spatio-temporelle des paramètres environnementaux le long de la radiale Wimereux-Slack. DIN : Azote Inorganique Dissous, DIP : Phosphate Inorganique Dissous, DSi : Silice Dissoute

b) Chlorophylle a

La Figure 25 rends compte de l'importance quantitative de chlorophylle *a* totale mais également sur chaque point de la radiale Wimereux-Slack. Il faut tout de même noter que sur les 16 dates échantillonnées, seules 12 sont complètes, c'est-à-dire avec les 9 points de la radiale (3/2, 22/3, 29/3, 6/4, 13/4, 24/5, 29/5, 16/6, 26/6).

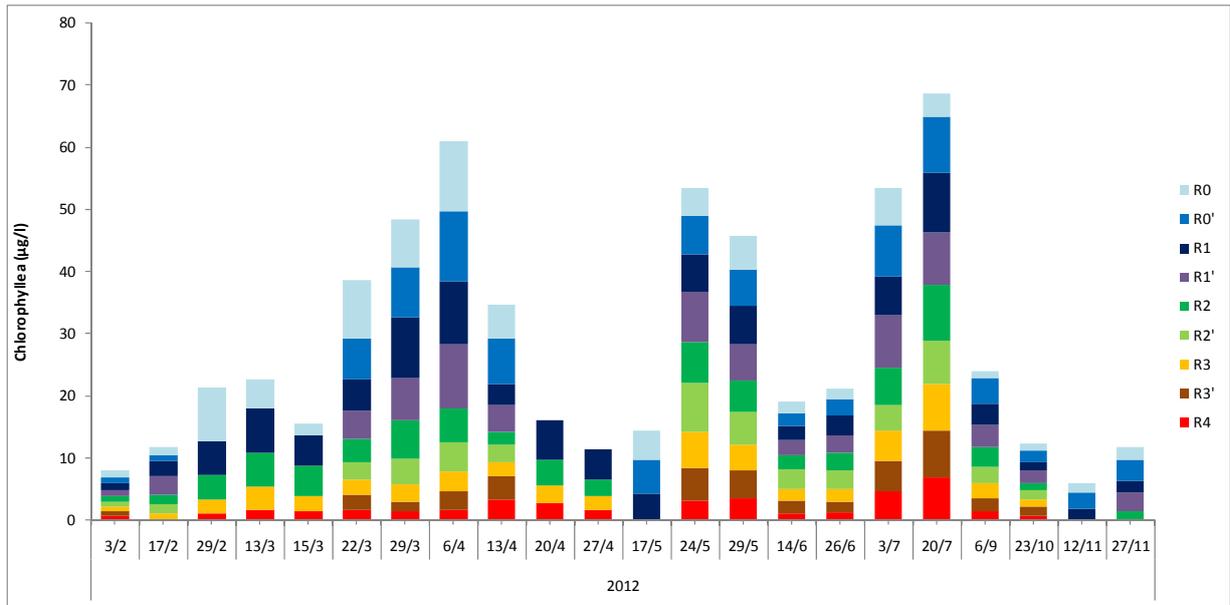


Figure 25 : évolution de la chlorophylle *a* totale sur les 5 points de la radiale Wimereux-Slack en 2012

c) Analyses cytométriques en continu

Huit groupes phytoplanctoniques ont été identifiés entre février et juillet 2012 en Manche orientale (Figure 26, Bonato *et al.*, soumis). Le picophytoplancton, qui comprend *Synechococcus* et les deux groupes de Picoeucaryotes, sont le groupe de taille (par rapport au micro et nano-phytoplancton) dominant sur toute la période, représentant 47% de l'abondance phytoplanctonique totale. Les stades haploïdes et diploïdes de *Phaeocystis globosa* sont le second cluster dominant, représentant environ 44% de l'abondance phytoplanctonique. Les diatomées sont peu représentées, avec seulement 3% de cette abondance. De même pour les Cryptophytes et les Coccolitophoridés, qui comptent pour moins de 5%.

Une analyse en co-inertie a révélé un couplage significatif ($p < 0.001$ et $RV = 0.27$) entre les groupes phytoplanctoniques et les variables environnementales (Figure 27). Ainsi, les deux premiers axes étaient clairement dominants et expliquaient ensemble 93% de la variance totale. Les résultats de cette analyse indiquent que les nitrates+nitrite, phosphates et silicates dissous, ainsi que le niveau de luminosité journalier sont les variables les plus importantes dans la structuration de la transition hiver/été des groupes de phytoplancton. Cependant, la position plutôt centrale des Cryptophytes, Coccolitophoridés et Picoeucaryotes I sur la carte factorielle indique qu'aucune des variables environnementales utilisées dans cette étude ne peut expliquer significativement leur dynamique saisonnière. Parmi les huit groupes de phytoplancton, les deux stades de vie de *Phaeocystis globosa* et la cyanobactérie procaryote *Synechococcus sp* contribuent le plus à la structure saisonnière, les deux premiers étant associés aux faibles valeurs de nutriments mais à une forte luminosité journalière et le dernier étant associé à une faible luminosité mais de fortes concentrations en nutriments (Figure 24). Cependant, le stade diploïde de *Phaeocystis globosa* semble plutôt associé à l'épuisement des silicates, alors que le stade haploïde est associé à l'épuisement des nitrates et du phosphate à la fois. Enfin, le cluster des Picoeucaryotes II (ou Red Picoeucaryotes) était quant à lui associé à une forte température et une faible salinité. En regardant de plus près le début du développement du bloom de chaque groupe phytoplanctonique identifié, on a pu mettre en évidence que les Picoeucaryotes I et *Synechococcus sp* ont développé des blooms en février, quand la luminosité journalière était faible et les nitrates+nitrites et phosphates élevés, et en juillet, quand ces derniers se sont épuisés mais que la luminosité était forte. De plus, les Coccolitophoridés, les Cryptophytes et *Phaeocystis globosa* ont proliféré juste après l'épuisement des silicates, ainsi que, pour les deux premiers seulement, début juillet quand tous les nutriments étaient épuisés et que la luminosité était assez forte. Enfin, les Picoeucaryotes II ont montré une abondance maximale fin avril, ainsi qu'en mai, pendant le déclin du bloom printanier de *Phaeocystis globosa*.

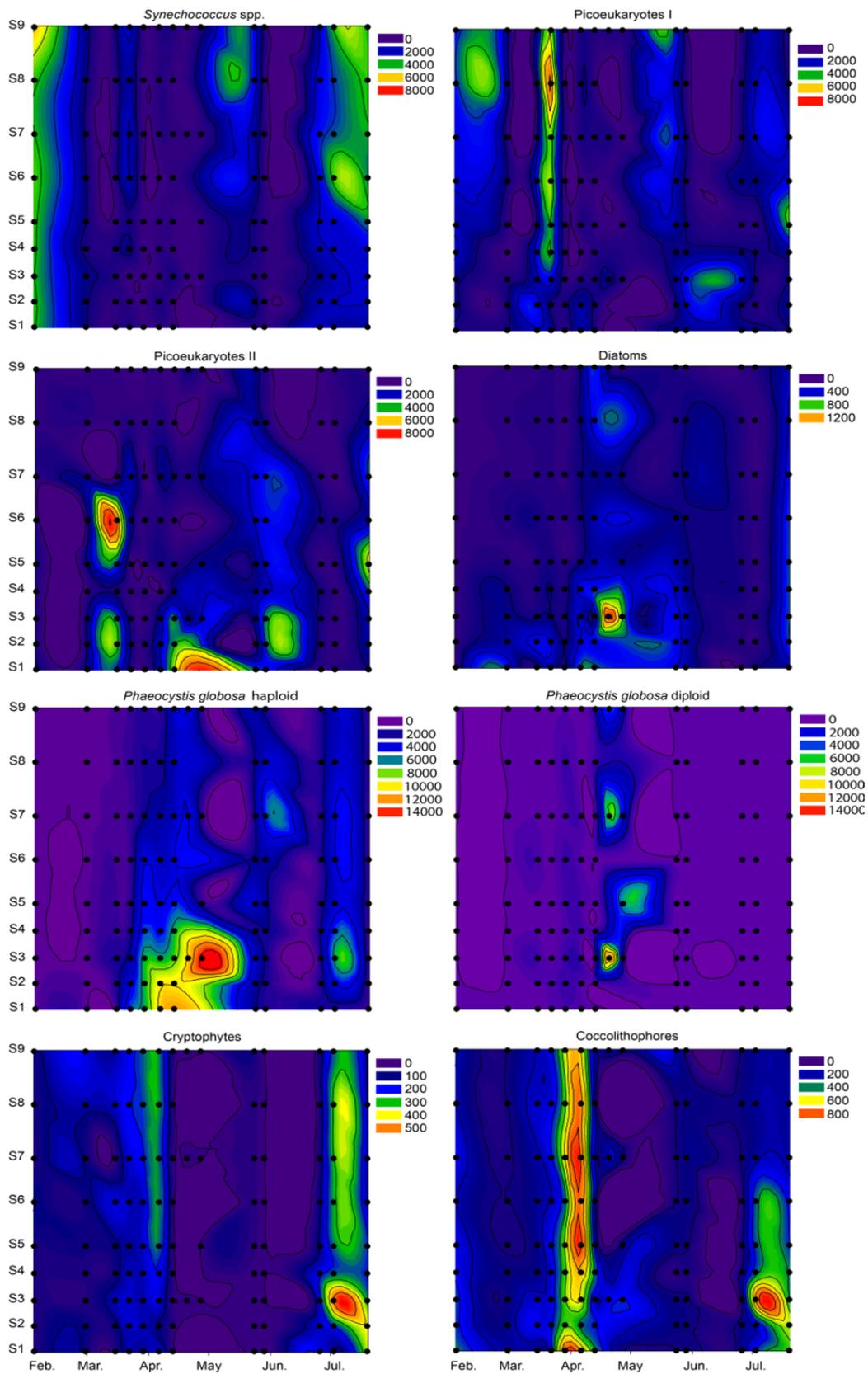


Figure 26 : distribution spatio-temporelle de l'abondance des différents groupes phytoplanctoniques identifiés par cytométrie en flux, le long de la radiale Wimereux-Slack, entre février et juillet 2012 (Bonato *et al.*, soumis)

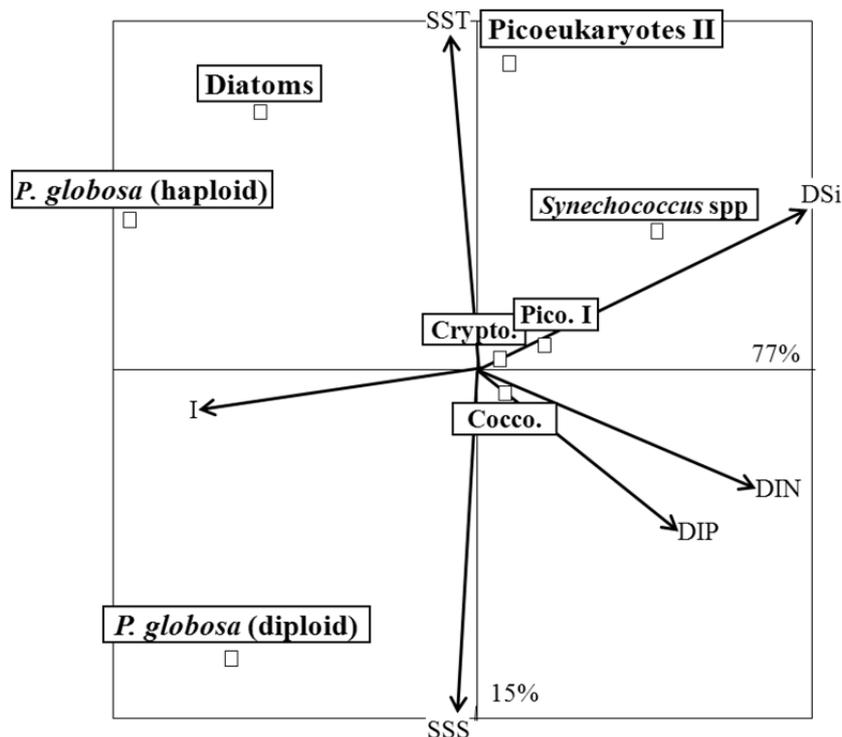


Figure 27 : analyse de co-inertie réalisée sur les variables environnementales et les abondances de groupes phytoplanctoniques identifiés par cytométrie en flux, entre février et juillet 2012, le long de la radiale Wimereux-Slack (Bonato *et al.*, soumis)

d) Analyses taxonomiques

Ces analyses, bien que coûteuses en temps, restent indispensables pour bien évaluer la diversité de la population présente. De plus, cette méthode permet d'identifier jusqu'à l'espèce, ce qui donne des informations supplémentaires, notamment sur l'écologie du phytoplancton.

Les résultats ont été obtenus après échantillonnage sur les différents points de la radiale Wimereux-Slack (R0, R1, R2, R3 et R4) et les comptages ont été réalisés au LOG-ULCO. Les points intermédiaires n'ont pas été échantillonnés. Cependant, sur les 16 campagnes de l'année 2012, seules 11 ont été réalisées sur les 5 points de la radiale (03/02, 29/02, 13/03, 15/03, 22/03, 06/04, 13/04, 24/05, 29/05, 14/06, 26/06).

Malgré cela, la Figure 28 permet d'observer que l'abondance est plus importante au mois d'avril. Le point R4 semble être celui où l'abondance en phytoplancton est la plus importante durant cette période, avec une abondance de 11923 cellules/ml contre 1862 pour R3, 2405 pour R2, 6425 pour R1 et 9443 pour R0.

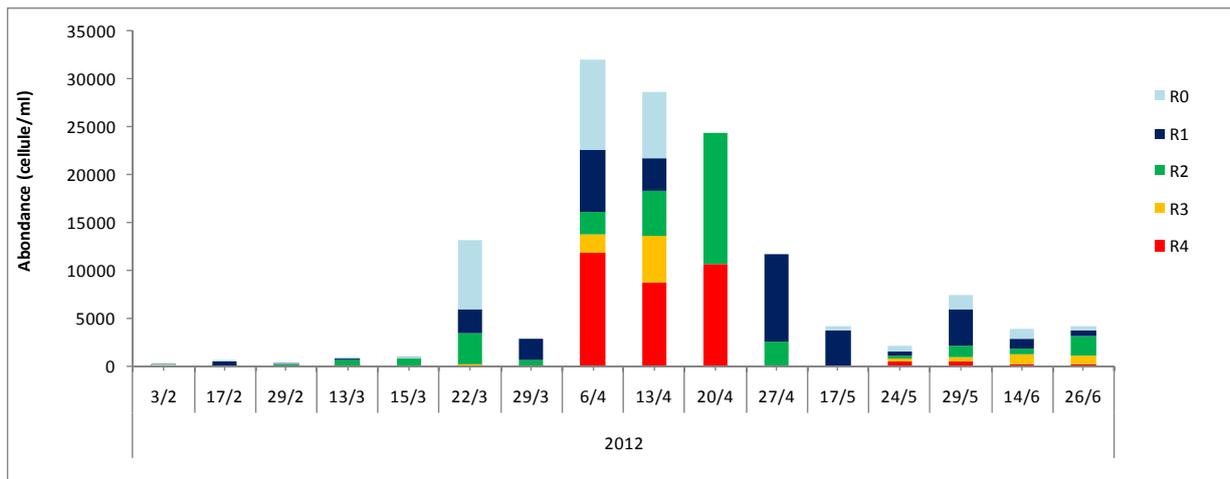


Figure 28 : abondance cellulaire totale sur les 5 points de la Radiale Wimereux-Slack en 2012 - campagne DYPHYRAD

La Figure 29 (ci-dessous) permet de visualiser la répartition spatio-temporelle des principaux groupes algaux.

Les comptages permettent d'identifier *Phaeocystis globosa* principalement en avril-mai et entre le point R1 (S3 sur la figure) et le point R2 (S5). Si l'on compare avec les résultats précédents de cytométrie (Figure 27 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), les concentrations maximales pour l'espèce *Phaeocystis globosa* apparaissent entre R0 (S1) et R1 (S3). Cependant, cette différence peut s'expliquer par le fait que la cytométrie peut distinguer de façon plus précise les petits organismes de *Phaeocystis*.

Les diatomées apparaissent surtout en avril au large, alors que la cytométrie montrait une présence maximale des diatomées dans les eaux côtières à cette période. Il est pourtant important de noter que les valeurs de cytométrie présentées plus haut correspondent à l'abondance et non à la fluorescence. Ainsi, les résultats devraient être similaires. Cependant, ces différences peuvent s'expliquer par le fait que le cytomètre considère une colonie comme une seule particule et sous-estime donc les espèces coloniales.

Une description et analyse plus complète sera effectuée dans la version finale du rapport, introduisant les espèces clés des groupes majoritaires.

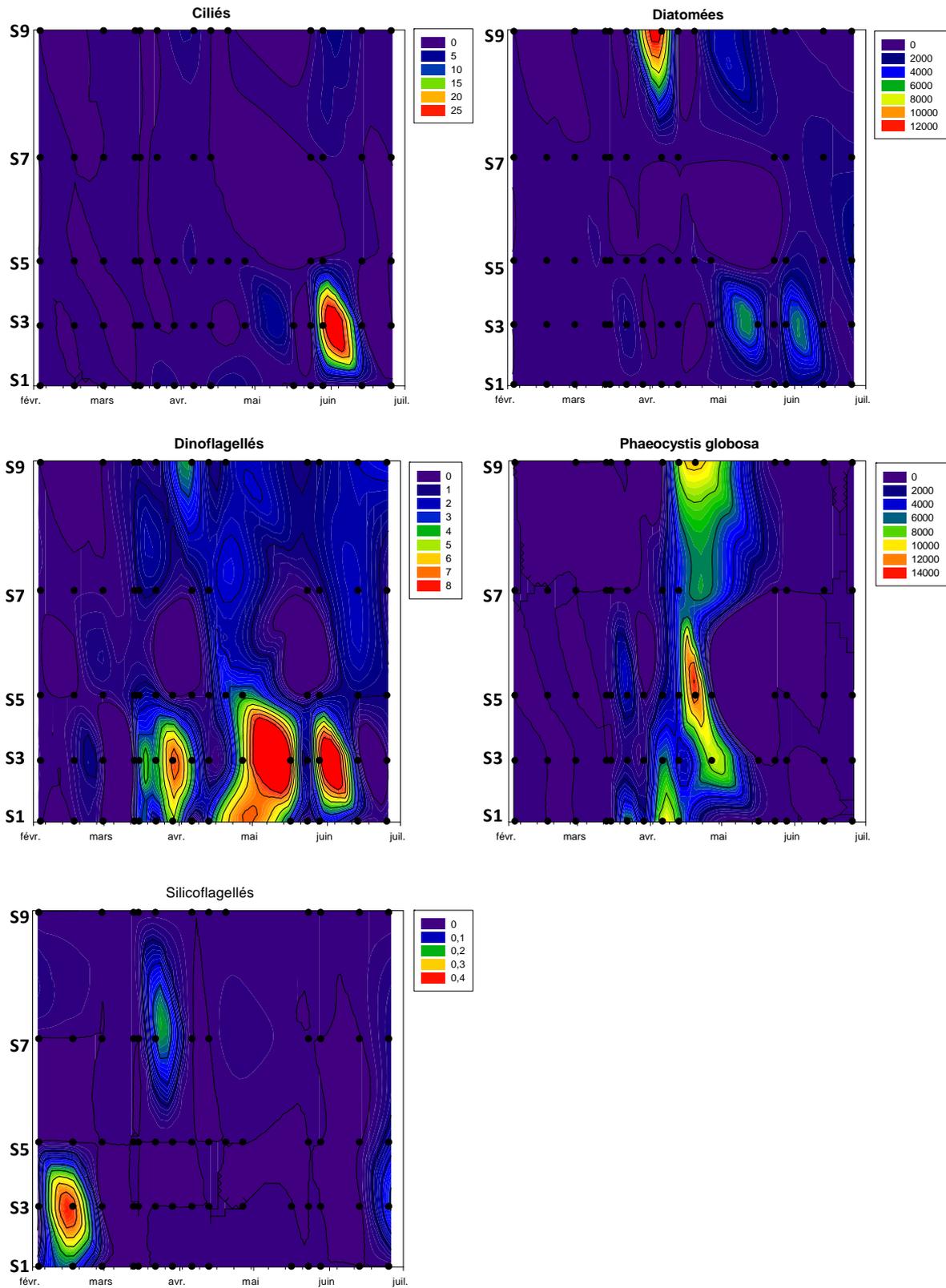


Figure 29 : distribution spatio-temporelle des groupes phytoplanctoniques identifiés par comptage, le long de la radiale Wimreux-Slack, entre février et juillet 2012.

Convention ONEMA-Ifremer 2014

Des analyses statistiques ont également été effectuées sur les résultats des comptages phytoplanctoniques, dans le but de mettre en évidence les communautés importantes de nos échantillons et les stations les plus pertinentes.

La méthode est la même que celle expliquée ci-dessus dans la partie relative à la campagne DYPHYMA. Elle repose sur la réalisation d'une NMDS qui a permis d'analyser les données d'abondance de chaque espèce du phytoplancton pour chaque point de la radiale Wimereux-Slack au cours de l'année 2012.

La représentation graphique de Shepard est donnée dans l'Annexe 4. Le stress obtenu est de 0,1736.

La NMDS est présentée dans la Figure 30. Elle ne permet pas de différencier les points de la radiale entre eux mais elle met en avant un gradient saisonnier important. En effet, sur cette figure, les couleurs font références aux mois de février à juin. On observe une séparation des mois hivernaux et estivaux, ce qui laisse penser à une séparation des communautés phytoplanctoniques selon un gradient saisonnier. De même, les communautés semblent relativement distinctes au cours de la transition hiver - été, avec la séparation nette des mois de février, mars et avril.

Convention ONEMA-Ifremer 2014

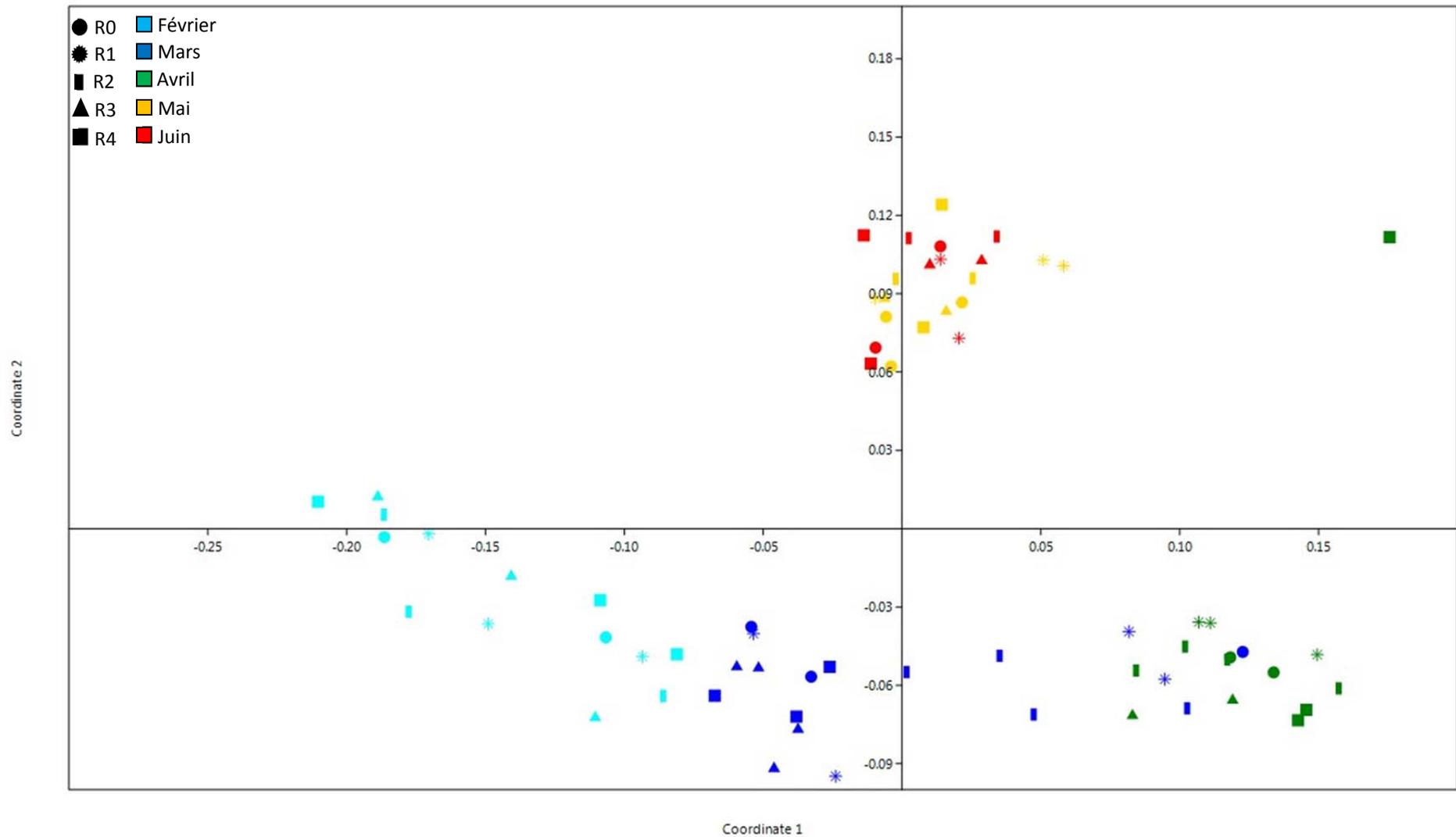


Figure 30 : ordination des échantillons dans l'espace défini par les axes 1 et 2 de la NMDS sur la répartition des espèces du phytoplancton sur la radiale Wimereux-Slack au cours de l'année 2012

e) Analyses fluorimétriques de la radiale Wimereux-Slack en 2012

La Figure 31 représente la distribution spatio-temporelle des quatre groupes phytoplanctoniques identifiés par le Fluoroprobe, le long de la radiale Wimereux-Slack, entre février et décembre 2012.

Le groupe dominant identifié par fluorescence spectrale est clairement *Phaeocystis*, avec des valeurs maximales entre avril et juin tout le long de la radiale, puis entre juillet et août entre R0 et R3.

Les diatomées apparaissent majoritaires à la côte entre mars et avril.

Les cryptophytes et les algues bleu-vertes sont moins présentes, avec des pics en juin au point R1 et en mars/décembre sur toute la radiale, respectivement.

Si l'on compare avec les données des autres méthodes (cytométrie et comptage), il apparaît clairement que la sonde surestime la présence de *Phaeocystis* sur la radiale et sous estime la présence des algues brunes (« brown » sur la figure). Effectivement, au cours du mois d'avril, *Phaeocystis* semble bien réparti tout au long de la radiale alors que pour la cytométrie les points les plus marqués étaient entre R0 et R1 et pour les comptages la dominance était principalement marquée entre R1 et R2 ainsi que plus légèrement au point R4.

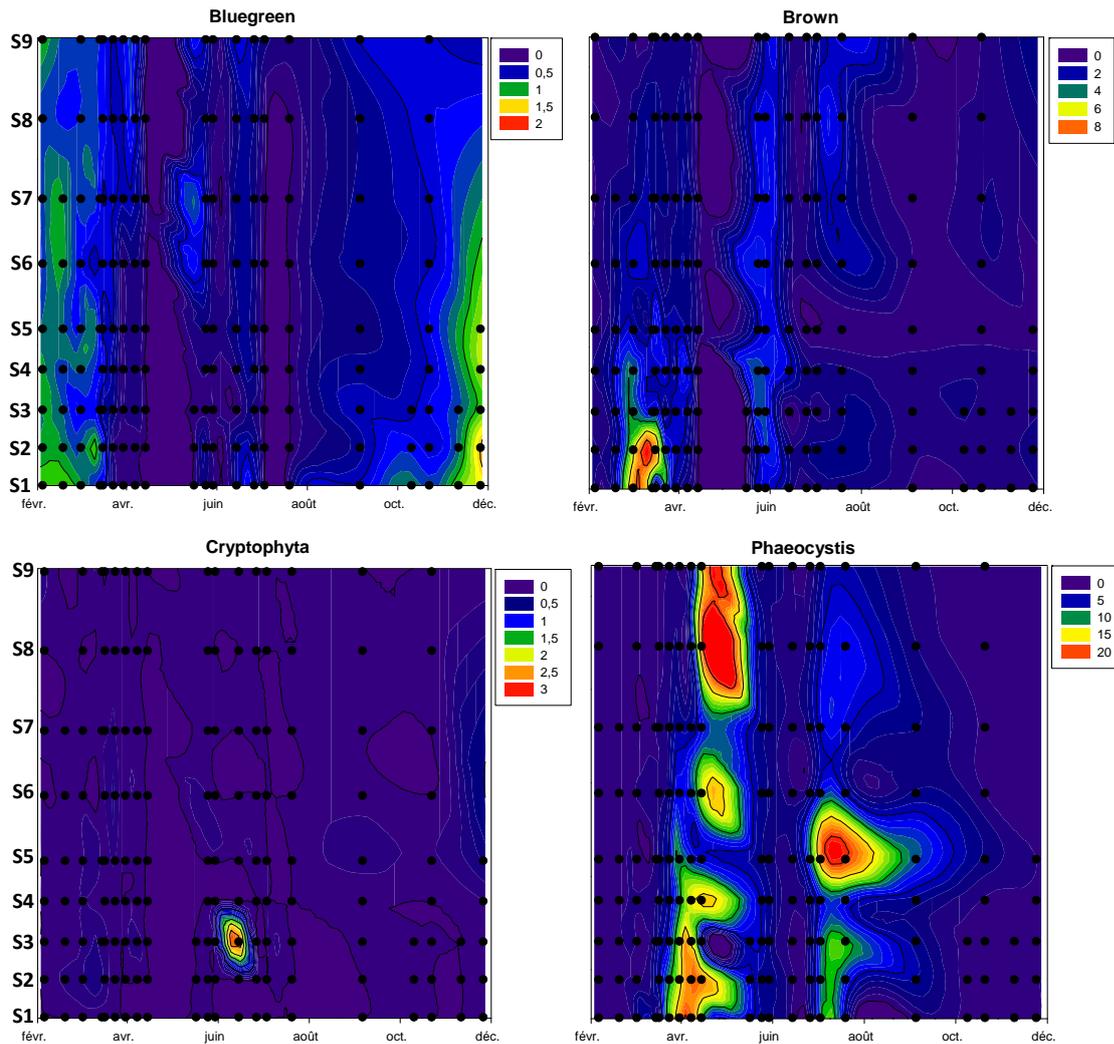


Figure 31 : distribution spatio-temporelle des quatre groupes phytoplanctoniques identifiés par le Fluoroprobe, le long de la radiale Wimereux-Slack, entre février et décembre 2012.

Les données fluorimétriques extraites à partir des mesures en cytométrie en flux ont montré, avant tout, que le picophytoplancton était le plus abondant durant toute la durée des mesures, sauf bien sûr durant le bloom printanier de *Phaeocystis globosa*, où son abondance a diminué d'un facteur deux, résultant du déclin à la fois des Picoeucaryotes I et de *Synechococcus sp.* Ces deux groupes de picophytoplancton ont montré une dynamique temporaire similaire, avec des abondances maximales en février et juillet. L'ubiquité de *Synechococcus sp.* durant notre étude confirme la capacité de ce genre à s'adapter à des environnements variables, grâce à sa capacité de saturer à la fois sa photosynthèse et sa croissance à de faibles niveaux, ainsi qu'à entrer en concurrence avec de plus grosses cellules pour la consommation de nutriments. C'est ainsi qu'il a pu maintenir des abondances relativement élevées dans des environnements pourtant contrastés. Ces caractéristiques démontrent également que les variables environnementales utilisées ici ne sont pas les seuls facteurs pouvant expliquer la dynamique spatio-temporelle des groupes phytoplanctoniques

(broutage, mortalité virale...).

Les Picoeucaryotes II montrent une dynamique différente des autres groupes de picophytoplancton, avec une abondance maximale entre fin avril et fin mai (correspondant au bloom de *Phaeocystis globosa*). Bien que cette période marque le début de l'épuisement des nitrates+nitrites, il est connu qu'à cette époque de l'année les concentrations en ammonium augmentent considérablement, à cause du développement d'un intense réseau trophique microbial.

La prymnesiophycée *Phaeocystis globosa* représentait le second groupe majeur de phytoplancton dans l'étude. Des études précédentes considèrent que les cellules diploïdes de *Phaeocystis* développent des blooms seulement quand les silicates se sont appauvris, alors que d'autres suggèrent que les cellules ont besoin d'un seuil de lumière en plus de fortes concentrations en nitrates+nitrites et phosphates. Ici, le bloom printanier de *Phaeocystis globosa* apparaît deux semaines après le début de la limitation en silicates, et à un niveau de luminosité proche du seuil observé par Peperzak. Cependant, notre étude montre que même de faibles niveaux de lumière peuvent soutenir le développement des cellules de *Phaeocystis globosa* en hiver (ce qui rejoint Moisan and Mitchell, 1999). La succession diploïde-haploïde observée ici concorde avec de plus anciennes études sur le cycle de vie de *Phaeocystis globosa*. Selon la littérature, le stade diploïde représente une stratégie de développement r avec de forts taux de croissance, une consommation de nutriments inorganiques (surtout des nitrates) et une résistance à la turbulence ; alors que le stade haploïde, qui montre une abondance maximale quand le DIN diminue, adopte une stratégie K, avec une meilleure adaptation à la limitation en nutriments, de faibles taux de croissance, la mobilité et la mixotrophie.

Comme les autres groupes, les Cryptophytes et les Coccolitophoridés étaient présents pendant toute la saison et ont suivi une dynamique temporelle similaire, avec des proliférations en mars et à partir de fin juin. Bien qu'aucune variable environnementale utilisée ici ne puisse expliquer leur dynamique, leur premier bloom est apparu une semaine après la limitation en silicates. Ceci correspond à ce qu'on trouve dans la littérature (Tyrrell and Merico, 2004), à savoir que le facteur environnemental majeur favorisant le développement des Coccolitophoridés est un faible niveau en DSi. L'écologie des Cryptophytes est peu connue, car ces flagellés sont souvent difficiles à identifier par microscopie et mal préservés par fixation. Cependant, plusieurs études ont montré une association des Cryptophytes avec des niveaux élevés de nitrates et phosphates dissous. Ils sont aussi considérés comme bien adaptés à de faibles luminosités, avec une consommation de carbone inorganique dissous pour contrebalancer ces faibles conditions lumineuses.

Conclusion – Perspectives

Le but de cette étude était d'améliorer notre connaissance sur l'occurrence et la distribution spatio-temporelle des principaux groupes de phytoplancton présents dans les eaux de la Manche Orientale, afin de pouvoir proposer un indice de composition du phytoplancton, à partir des données de cytométrie en flux comparées aux méthodes de référence et innovantes. Bien que la cytométrie en flux de type scanning ne propose pas une résolution taxonomique pointue, il semble qu'elle soit bien adaptée pour la détermination de l'abondance des taxons principalement étudiés dans des études précédentes, comme le picophytoplancton ou les Coccolitophoridés.

Cependant, la cytométrie en flux automatisée de type « pulse-shape recording » semble sous-estimer l'abondance de certains taxons formant des chaînes ou des colonies, tels que les diatomées ou *Phaeocystis globosa*. En effet, chaque particule est comptée comme une entité, que ce soit une seule cellule ou une colonie de plusieurs milliers de cellules, et la limite de détection des particules (environ 800µm) empêche de compter les larges chaînes et colonies qui peuvent atteindre plusieurs millimètres. Cela dit, la succession saisonnière récurrente des diatomées et de *Phaeocystis globosa*, ainsi que leurs abondances étaient cohérentes avec celles rapportées dans les précédentes études de cette zone côtière (Grattepanche *et al.*, 2011a,b; Lefebvre *et al.*, 2011).

D'autres données doivent encore être explorées pour évaluer la récurrence des patrons de distribution et de successions observés ici. De plus, certains assemblages de phytoplancton identifiés par cytométrie en flux n'étaient corrélés avec aucune des variables environnementales mesurées dans cette étude (voir la partie concernant la répartition spatio-temporelle du phytoplancton le long de la radiale Wimereux-Slack) et il serait pertinent d'utiliser d'avantage de variables environnementales, telles que le coefficient d'atténuation de la lumière pénétrant dans la colonne d'eau, par exemple. Il serait également intéressant de prendre en compte d'autres facteurs, comme le broutage, ou encore d'analyser des données sur toute la colonne d'eau, à différentes profondeurs.

Egalement, d'autres analyses statistiques pourraient être effectuées sur les résultats de comptages microscopiques et de fluorimétrie spectrale, afin de corrélérer les assemblages de groupes phytoplanctoniques identifiés aux conditions environnementales, et de comparer les résultats obtenus aux assemblages cytométriques définis au sein de la présente étude.

Cette réflexion autour de la proposition d'un indice de composition du phytoplancton sera approfondie avec l'analyse, en 2015, des données issues des réseaux d'observation et de surveillance SRN-REPHY et SOMLIT. Le lien pourra de même être fait avec les analyses pigmentaires.

Bibliographie

Artigas LF., Didry M., Lampert L., Broutin M., Bonato S., Lizon F., Lefebvre A. Participation à la définition d'un indice composition pour le phytoplancton en Manche-Atlantique. Action Indice Composition. Livrable n° A II. 2014

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

Bonato S., Christaki U., Lefebvre A., Lizon F., Thyssen M., Artigas LF. (2015) High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area, in spring : the eastern English Channel. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 154 : 214-223.

Bonato S., Breton E., Didry M., Lizon F., Cornille V., Lécuyer E., Christaki U., Artigas LF. Spatio-temporal patterns in phytoplankton assemblages in relation to their environment using a new generation of flow cytometry: a case study in the eastern English Channel. (soumis)

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

Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*. 18, 117-143.

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

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

Grattepanche, J.-D., Breton, E., Brylinski, J.-M., Lécuyer, E., Christaki, U., 2011a. Succession of primary producers and micrograzers in a coastal ecosystem dominated by *Phaeocystis globosa* blooms. *J. Plankton Res.*, 33, 37-50.

Grattepanche, J.-D., Vincent, D., Breton, E., Christaki, U., 2011b. Microzooplankton herbivory during the diatom-*Phaeocystis* spring succession in the eastern English

Channel. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 404, 87–97.

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

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

Houliiez E., Lizon F., Thyssen M., Artigas L.F., Schmitt F. (2012) Spectral fluorometric characterization of Haptophytes dynamics using the Fluoroprobe: an application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *Journal of Plankton Research* vol.34, n°2, pp. 136-151.

Husson F., Josse J., Pages J. (2010) Principal Component Methods - Hierarchical Clustering - Partitional Clustering : Why would we need to choose for visualizing data ? Technical Report Agrocampus.

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

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

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

Lefebvre, A., Guiselin, N., Barbet, F., Artigas, F.L., 2011. Long-term hydrological and phytoplankton monitoring (1992-2007) of three potentially eutrophic systems in the eastern English Channel and the Southern Bight of the North Sea. *ICES J. Mar. Sci.*, 68, 2029–2043.

Lorenzen C.J. (1966) A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstract*. 13 : 223-227

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

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

Convention ONEMA-Ifremer 2014

Utermöhl H. 1958. *Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt. Int. Verein. Limnol.*9: 1–38

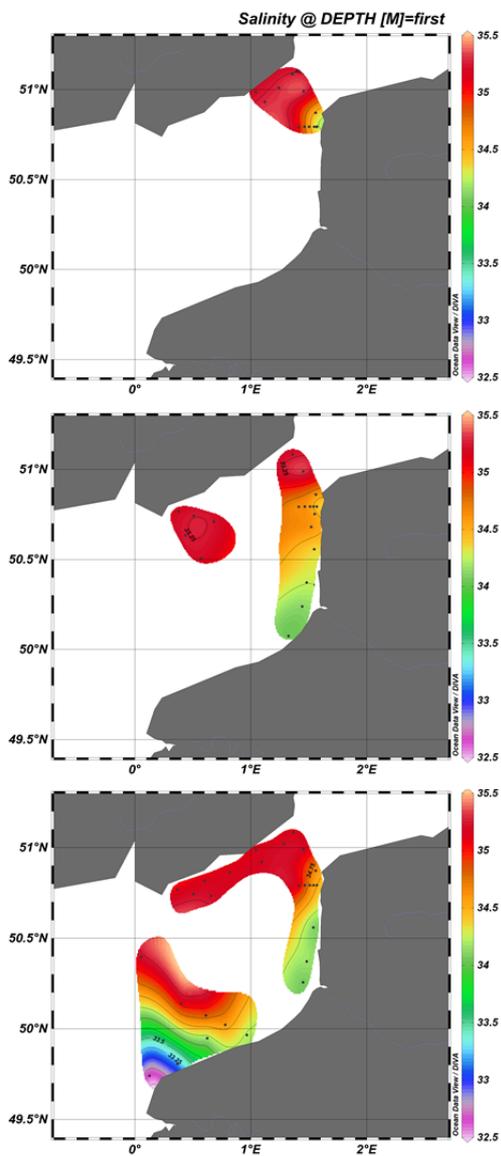
Winder M ., Hunter D. (2008) Temporal organization of phytoplankton communities linked to physical forcing. *Oecologia* 156:179-172

Yentsch CS., Menzel DW. (1963) A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep Sea Research.* 10 : 221-231

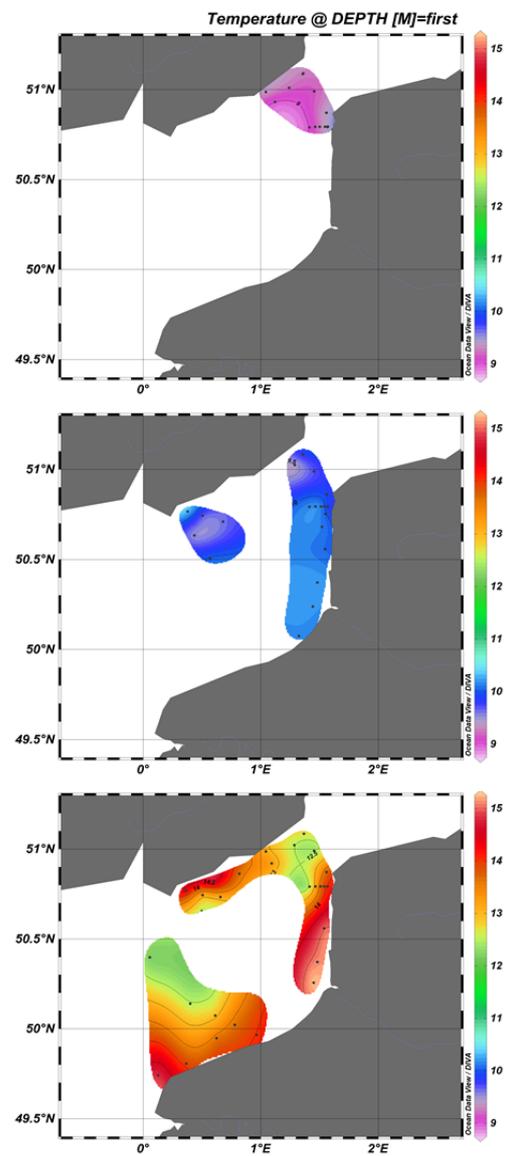
ANNEXES

1. Evolution de la salinité et de la température de surface (données sonde CTD) sur les trois legs de la campagne DYPHYMA (haut : leg1, milieu : leg2, bas : leg3)

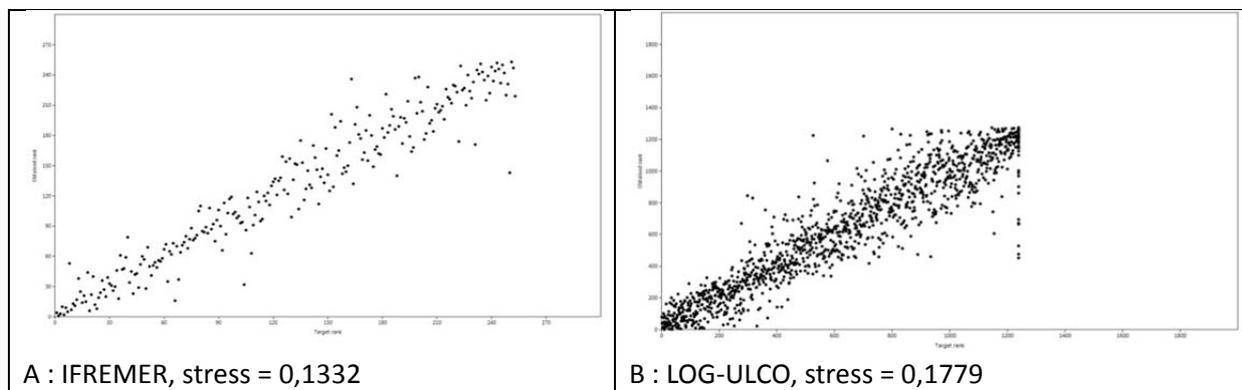
Distribution de la salinité de surface



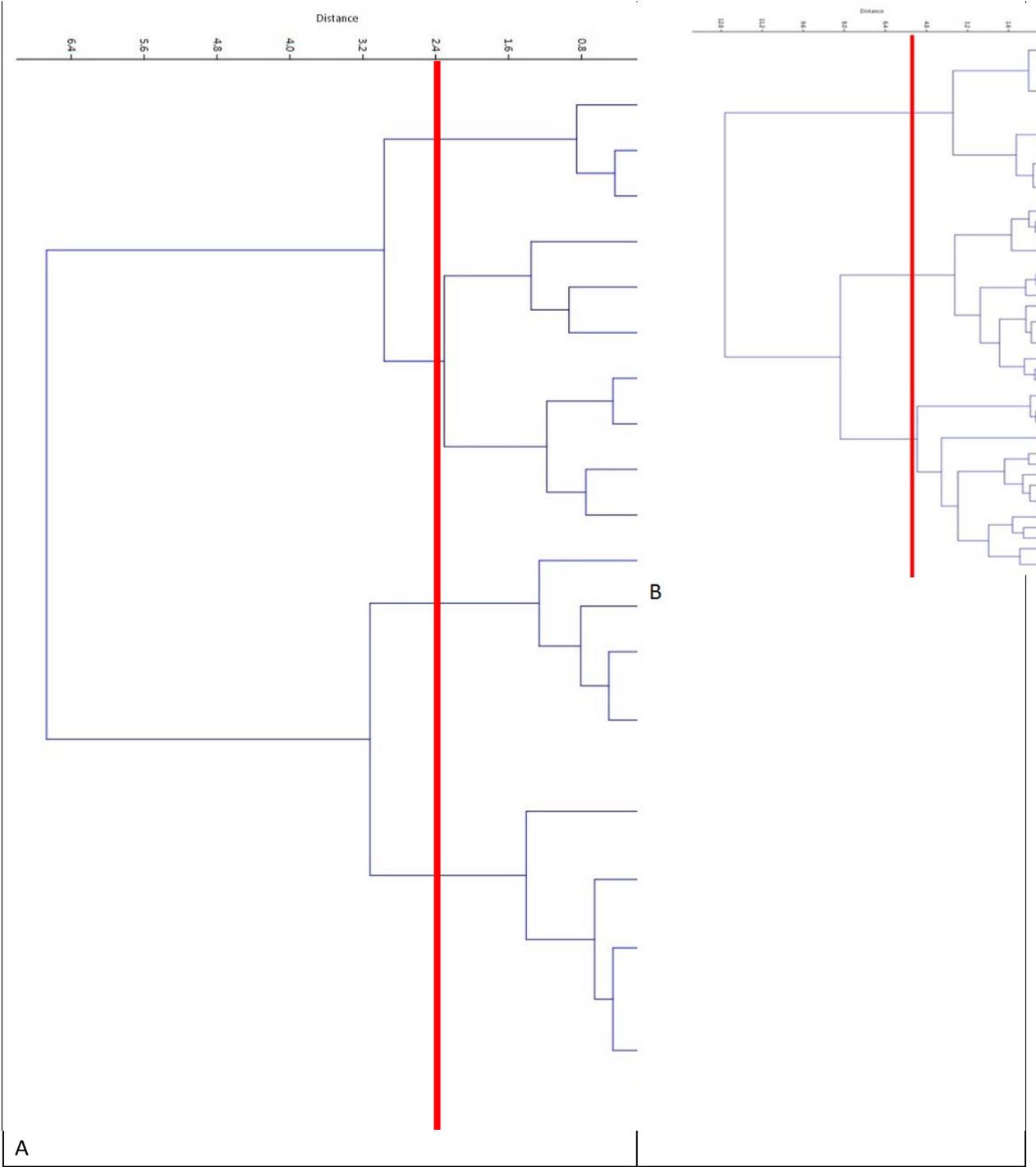
Distribution de la température (°C) de surface



2. Représentations de Shephard permettant de déterminer le stress pour les NMDS réalisées sur les comptages pour la campagne DYPHYMA. A : comptage IFREMER. B : comptage LOG-ULCO



3. Dendrogramme représentant les stations échantillonnées par l'IFREMER (A) et le LOG-ULCO (B) lors de la campagne DYPHYMA sur les trois legs



4. Représentations de Shephard permettant de déterminer le stress pour les NMDS réalisées sur les comptages du LOG-ULCO sur la radiale de la Baie Wimereux-Slack (stress = 0,1736)

