

2015–Domaine Evolution, fonctionnement et évaluation des écosystèmes littoraux

Action 3 – Indice composition

Définition d'un indice composition pour le phytoplancton en Manche-Atlantique, à partir des données du micro-phytoplancton du REPHY et des réseaux régionaux, et des mesures complémentaires de la flore phytoplanctonique acquises avec des techniques novatrices

Action 3 – Livrable 1. Propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basé sur les résultats des méthodes microscopie, pigments et diversité génétique

Rapport final, février 2016

Tania HERNANDEZ FARIÑAS

Mélanie BRUN

Raffaele SIANO

Daniel DELMAS

AUTEURS

Tania HERNANDEZ FARIÑAS (UPMC – Station Biologique de Roscoff), tania.hernandez-farinas@sb-roscoff.fr

Mélanie BRUN (Ifremer – Vigies, Nantes), melanie.brun@ifremer.fr

Raffaele SIANO (Ifremer – Dyneco/Pelagos, Brest), raffaele.siano@ifremer.fr

Daniel DELMAS (Ifremer – Dyneco/Pelagos, Brest), daniel.delmas@ifremer.fr

CORRESPONDANTS

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

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

AUTRES CONTRIBUTEURS

Nathalie SIMON (UPMC – Station Biologique de Roscoff), simon@sb-roscoff.fr

Droits d'usage : **libre accès**

Niveau géographique : **national**

Couverture géographique : **nationale**

Niveau de lecture : **experts**

RESUME

Ce livrable est composé de deux rapports faisant des propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basés respectivement sur les résultats des méthodes de diversité pigmentaire et génétique, et sur les résultats de la méthode microscopie.

Propositions basées sur les résultats des méthodes de diversité pigmentaire et génétique (19 pages, pages 13 à 31 du document pdf)

Ce travail s'inscrit dans la continuité des études effectuées précédemment (Siano et Delmas, 2013, 2015) sur la recherche d'un indicateur de diversité du phytoplancton en utilisant deux méthodes complémentaires à la microscopie optique : la diversité génétique analysée par approche de *metabarcoding* (analyse exhaustive de la diversité et abondance relative des OTUs, *i.e.* groupes des séquences identifiés pour leur ressemblance génétique) et la diversité pigmentaire (analyse de la diversité et de l'abondance des pigments produits par les cellules photosynthétiques). Dans le cadre de cette étude nous avons cherché à : (i) approfondir nos connaissances sur la structure spatio-temporelle des assemblages phytoplanctoniques en rapport aux forçages environnementaux pour trois classes de taille (0,2-3 μm , 3-20 μm , >20 μm , ici définies par convention respectivement picophytoplancton, nanophytoplancton et microphytoplancton) et (ii) vérifier l'hypothèse que certains groupes du phytoplancton pourraient être représentatifs et descripteurs de leur classe de taille correspondante.

Cette étude s'est basée sur les données recueillies lors de quatre campagnes d'échantillonnage : trois d'entre elles à l'échelle spatiale (campagnes Pelgas 2012, 2013 et campagne Phytéc) et une à l'échelle temporelle (Dynapse). Lors des campagnes Pelgas 2012 et 2013, l'échantillonnage a été réalisé dans le panache de la Gironde au mois de mai, sur trois radiales côte-large. La campagne Phytéc a été effectuée en juin dans la mer d'Iroise (rade de Brest) et la zone Bretagne sud, incluant le panache de la Loire, les Baies de Quiberon et de la Vilaine et la Baie de Concarneau. Enfin, la campagne Dynapse a été réalisée dans la Baie de Concarneau, entre mars et juillet 2012.

Les analyses statistiques effectuées sur les données de *metabarcoding* montrent une nette séparation des trois classes de taille étudiées et suggèrent que le picophytoplancton est moins variable dans l'espace-temps que le nano- et le microphytoplancton. Ceci est lié à la présence récurrente et proportionnellement plus abondante dans cette fraction de taille de certains OTUs tels que *Micromonas*, *Ostreococcus* (Mamiellophyceae) et *Chrysochromulina rotalis* (Haptophyceae). Au sein du picophytoplancton nous avons retrouvé une bonne correspondance entre certains OTUs du groupe des Mamiellophyceae et la chlorophylle *b*, le pigment caractéristique de cette classe de microalgues. Cette correspondance conforte la bonne inter-calibration des données de diversité pigmentaire et génétique. La chlorophylle *b* s'est avéré être un bon descripteur de la biomasse et de la variabilité du picophytoplancton. En effet, au sein du picophytoplancton, la chlorophylle *b* est positivement corrélée à la chlorophylle *a* totale, cette dernière étant elle-même indicatrice de la biomasse picophytoplanctonique totale.

La variabilité du phytoplancton, étudiée par l'analyse génétique et des pigments, n'est pas expliquée par les paramètres environnementaux mesurés, certainement à cause de gradients environnementaux insuffisamment prononcés retrouvés au moment de l'échantillonnage des campagnes. Au vue des résultats obtenus, nous recommandons de tester la pertinence des OTUs (notamment ceux identifiés au sein du picophytoplancton) et de la chlorophylle *b* en tant que descripteurs de l'état des masses d'eau sur un gradient plus contrasté en termes de pressions. Il faudrait donc réaliser un échantillonnage sur un gradient environnemental bien établi au préalable afin de tester l'hypothèse selon laquelle la chlorophylle *b* et les abondances relatives des OTUs *Micromonas* et *Bathycoccus prasinos* peuvent être utilisées pour la détection et la quantification des

conditions environnementales qui relèvent des influences anthropiques.

Propositions basées sur les résultats de la méthode microscopie (37 pages, pages 32 à 68 du document pdf)

Dans le cadre de la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), l'évaluation de l'état écologique des eaux littorales repose notamment sur le suivi de la composition du phytoplancton, indice non défini à ce jour en France. Dans le cadre du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie (REPHY), mis en place en 1984, des dénombrements de l'ensemble des espèces phytoplanctoniques échantillonnées dans l'eau sont réalisés par microscopie optique. La présente étude a pour objectif de proposer un ou plusieurs indice(s) de composition phytoplanctonique, basé(s) sur les dénombrements réalisés au microscope, pour évaluer la qualité des eaux littorales de la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE.

Dans leur article, Spatharis et Tsirtsis (2010) proposent une méthode pour la sélection d'indices de composition, basée sur l'étude de la monotonie et de la linéarité de la relation entre l'indice et le logarithme de l'abondance totale. Dans la présente étude, la liste d'indices et la méthode de sélection proposées par Spatharis et Tsirtsis (2010) sont reprises et appliquées aux données issues de 16 lieux de surveillance, répartis sur l'ensemble de la façade Manche-Atlantique. Cette étude a permis de sélectionner six indices : les indices « Odum », « Menhinick », « Camargo », « Sheldon », « E3 » et « Simpson E ». Une étude plus approfondie de la relation indice vs pressions, autre que l'abondance totale, au moyen d'autres outils statistiques serait nécessaire pour confirmer la pertinence de ces indices. De plus, pour que l'indice soit opérationnel dans le cadre de la DCE, des travaux complémentaires relatifs à l'agrégation temporelle des mesures, à la définition des valeurs de référence et par conséquent au calcul des EQR restent à faire, en lien avec les experts thématiques.

MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

Metabarcoding, OTUs, pigments, picophytoplancton, indice composition, niche écologique, Mamiellophyceae, chlorophylle b, Rade de Brest, Bretagne sud, Panache de la Gironde, dénombrements du micro-phytoplancton, abondance totale, monotonie, linéarité, pressions, façade Manche-Atlantique

TITLE

Proposals for an indice of phytoplankton composition, based on the results of the microscopy, pigments and genetic diversity methods

ABSTRACT

This deliverable is composed of two reports which propose indice of phytoplankton composition, based respectively on the results of pigment and genetic diversity methods, and the results of microscopy method.

Proposals based on the results of pigment and genetic diversity methods

The present work is a continuation of several studies carried out in the past (Siano and Delmas, 2013, 2015) on investigating an indicator of phytoplankton diversity using two methods complementary to optical microscopy: the genetic diversity analyzed with metabarcoding (exhaustive analysis of the diversity and relative abundance of OTUs, *i.e.* groups of sequences identified by their genetic resemblance) and the pigmentary diversity (analysis of the diversity and abundance of pigments produced by photosynthetic cells). As part of the present study we aim to (i) to deepen our knowledge on the spatio-temporal structure of phytoplankton assemblages in relation with environmental forcings for three size classes (0.2-3 μm , 3-20 μm , >20 μm , here respectively defined by convention as picophytoplankton, nanophytoplankton and microphytoplankton), and (ii) to verify the hypothesis that certain groups of the phytoplankton could be representative and descriptor of their corresponding size class.

This work relies on data collected during four sampling campaigns: three of them at spatial scale (Pelgas 2012, 2013, and Phyttec campaigns) and one at temporal scale (Dynapse). During Pelgas 2012 and 2013 campaigns, the sampling was done in the Gironde plume during May, on three coast-to-offshore transects. The Phyttec campaign was carried out in the Iroise sea (Bay of Brest) and the south area of Britain, including the Loire plume, bays of Quiberon, Vilaine, and Concarneau. Finally, the Dynapse campaign was carried out in the bay of Concarneau, between March and July 2012.

The statistical analyses performed on metabarcoding data show a clear separation of the three size classes studied and suggest that picophytoplankton is less variable in the time space than nano- and microphytoplankton. This is related to the recurrent presence in this size fraction of some OTUs such as *Micromonas sp*, *Ostreococcus sp* and *Chrysochromulina rotalis*. Within picophytoplankton, we found a good correlation between certain OTUs of the Mamiellophyceae group and chlorophyll *b*, the pigment characteristic of this class of microalgae. This correspondence confirms the good inter-calibration of pigment and genetic diversity data. Chlorophyll *b* appeared to be a good descriptor of biomass and variability of picophytoplankton. Indeed, within the picophytoplankton, chlorophyll *b* is positively correlated to the total chlorophyll *a*, the latter being an indicator of the total picophytoplankton biomass.

The phytoplankton variability, studied through the genetic and pigmentary analysis, is not explained by measured environmental parameters, certainly because of insufficiently pronounced environmental gradients during the sampling campaigns. Given the results obtained, we recommend testing the relevance of OTUs (especially those identified within picophytoplankton) and chlorophyll *b* as descriptors of the state of water masses on a more contrasted gradient of pressures. A sampling should be carried out on a well-established environmental gradient beforehand in order to test the hypothesis that chlorophyll *b* and relative abundances of OTUs *Micromonas* and *Bathycoccus prasinos* could be used for the detecting and quantifying environmental conditions that fall

anthropogenic influences.

Proposals based on the results of microscopy method

As part of the implementation of the Water Framework Directive (WFD), the evaluation of the ecological status of coastal waters is based in particular on the monitoring of phytoplankton composition, indice not defined to date in France. As part of the observation and surveillance network for phytoplankton and hydrology (REPHY), established in 1984, counts of all phytoplankton species sampled in water are made by optical microscopy. This study aims to propose one or more indices of phytoplankton composition, based on counts made in microscope, to evaluate the quality of coastal waters of the Channel-Atlantic coast, as part of the WFD.

In their article, Spatharis and Tsirtsis (2010) propose a method for the selection of composition indices, based on the study of the monotonicity and linearity behavior of the relationship between the indice and the logarithm of the total abundance. In this study, the list of indices and the selection method proposed by Spatharis and Tsirtsis (2010) are taken and applied to the data from 16 monitoring locations spread across the Channel-Atlantic coast. This study selected six indices: the indices "Odum", "Menhinick", "Camargo", "Sheldon," "E3" and "Simpson E." Further study of the relationship indice vs pressures, other than total abundance, using other statistical tools would be needed to confirm the relevance of these indices. In addition, for the indice to be operational within the WFD framework, additional work on temporal aggregation of measurements, on the definition of reference values and therefore on the calculation of EQR, are still required in connection with thematic experts.

KEY WORDS (THEMATIC AND GEOGRAPHICAL AREA)

Metabarcoding, OTUs, pigments, picophytoplankton, composition indice, ecological niche, Mamiellophyceae, chlorophyll b, Brest Bay, Southern Britain, Gironde plume, micro-phytoplankton counts, total abundance, monotonicity, linearity, pressure, Channel-Atlantic coast

SYNTHESE POUR L'ACTION OPERATIONNELLE

Ce livrable est composé de deux rapports faisant des propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basés respectivement sur les résultats des méthodes de diversité pigmentaire et génétique, et sur les résultats de la méthode microscopie.

Propositions basées sur les résultats des méthodes de diversité pigmentaire et génétique

Depuis des décennies, les analyses des échantillons de phytoplancton en microscopie optique ont permis d'observer et d'identifier de nombreux organismes, contribuant ainsi à améliorer les connaissances sur ce compartiment biologique. Néanmoins, dans un contexte d'étude de la diversité biologique, la microscopie optique pose certaines contraintes, notamment pour l'identification d'espèces de la petite fraction de taille (<20 µm) ou des espèces cryptiques (espèces identiques morphologiquement mais différenciables génétiquement) ou pseudocryptiques (espèces différenciables par des caractéristiques morphologiques ultrafines appréciables en microscopie électronique). Ainsi, l'identification du phytoplancton est un défi pour les planctonologistes qui étudient sa biodiversité et son évolution. Depuis quelques années, l'approche de *metabarcoding* d'analyse de la diversité génétique de tous les protistes marins (organismes unicellulaires eucaryotes autotrophes et hétérotrophes confondus) s'est développé afin d'évaluer exhaustivement (en terme de quantité de données acquises et de finesse de caractérisation spécifique) un échantillon de phytoplancton. Cette approche standardisable (qui permet de s'affranchir des problèmes liés à la subjectivité d'un opérateur en microscopie optique) apporte une information sur la taxinomie des organismes et a permis des avancées considérables dans la compréhension de l'écologie microbienne marine.

De manière complémentaire, l'analyse pigmentaire par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) permet d'obtenir une distribution des groupes photosynthétiques par l'étude de leurs pigments bio-marqueurs. Cette méthode présente l'avantage d'avoir une bonne résolution sur toutes les classes de taille du phytoplancton ainsi qu'une bonne reproductibilité. Bien qu'il soit impossible de déterminer les espèces, la diversité pigmentaire apporte une information sur les différentes classes d'organismes photosynthétiques et sur leur abondance en termes de biomasse.

Depuis 2012, quatre campagnes d'échantillonnage ont été réalisées dans le Golfe de Gascogne et des échantillons destinés à l'analyse de la diversité génétique des protistes autotrophes par *metabarcoding* et de diversité pigmentaire ont été prélevés. Trois campagnes ont été effectuées à l'échelle spatiale (campagnes Pelgas 2012, 2013 et campagne Phyttec) et une à l'échelle temporelle (Dynapse). Lors des campagnes Pelgas 2012 et 2013, l'échantillonnage a été réalisé dans le panache de la Gironde au mois de mai, sur trois radiales côte-large. La campagne Phyttec a été effectuée en juin dans la mer d'Iroise (rade de Brest) et la zone Bretagne sud, incluant le panache de la Loire, les Baies de Quiberon et de la Vilaine et la Baie de Concarneau. Enfin, la campagne Dynapse a été réalisée dans la Baie de Concarneau, entre mars et juillet 2012. Les échantillons prélevés pendant ces campagnes ont été utilisés pour répondre aux objectifs de la présente étude.

Les premières analyses effectuées sur les données acquises de diversité génétique et pigmentaire (voir Siano et Delmas, 2013, 2015) ont mis en évidence la bonne résolution taxinomique de l'approche de *metabarcoding* pour l'étude de la diversité génétique phytoplanctonique, et la bonne corrélation entre ces données et celles de diversité pigmentaire (voir Siano et Delmas, 2013, 2015). La validation des méthodes utilisées et la vérification de leur comparabilité et complémentarité a été une première étape à la définition d'indicateurs de composition des communautés (voir Siano et Delmas, 2013, 2015).

A partir de travaux effectués auparavant, dans le cadre de ce travail nous avons cherché à : (i) approfondir nos connaissances sur la structure spatio-temporelle des assemblages phytoplanctoniques en rapport aux forçages environnementaux au niveau de trois classes de taille de protistes marins (0,2-3 μ m, 3-20 μ m, >20 μ m, ici définies par convention respectivement picophytoplancton, nanophytoplancton et microphytoplancton) (ii) vérifier l'hypothèse que certains groupes du phytoplancton pourraient être représentatifs et descripteurs de leur classe de taille correspondante. Ces recherches s'inscrivent dans une démarche visant l'identification d'indicateurs des communautés phytoplanctoniques en lien avec la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et la Directive Cadre Stratégie du Milieu Marin (DCSMM).

L'approche de *metabarcoding* consiste en une analyse de l'abondance relative d'OTUs (Operational Taxonomic Units), *i.e.* de groupes de séquences identifiés par leur ressemblance génétique. L'approche pigmentaire permet l'analyse de la diversité et de l'abondance des pigments produits par les cellules photosynthétiques. De plus amples détails sur la mise en œuvre des deux méthodes sont disponibles dans Siano et Delmas (2015). Dans le cadre de cette étude, le pico-, le nano- et le microphytoplancton ont été étudiés sur la même base de séparation des cellules pour les deux méthodes d'analyse de la diversité : 0,2- 3 μ m, 3 – 20 μ m et > 20 μ m. La séparation a été effectuée par filtration différentielle à l'aide de filtres de porosité égale à 0,2, 3 et 20 μ m. Pour des raisons de comparabilité entre données, les traitements statistiques des données n'ont été effectués que sur les OTUs assignés à des protistes autotrophes et en particulier sur les pigments produits par les espèces eucaryotes.

L'évaluation d'un indicateur de composition pertinent pour renseigner sur l'état des masses d'eau doit être basée sur les écarts observés entre différents niveaux de pressions anthropiques et des conditions dites de « référence ». Cependant, la gamme des variations environnementales rencontrées lors de ces campagnes fait partie de la variabilité naturelle des écosystèmes étudiés et en général des gammes de tolérance physiologique des espèces phytoplanctoniques. Les structurations des communautés observées sont plutôt associables à des caractéristiques du milieu telles que le mélange/stratification de la colonne d'eau, la disponibilité en lumière, la mortalité par prédation ou parasitisme, plutôt qu'à la variabilité des concentrations de sels nutritifs.

Sur la base de nos données, provenant de campagnes d'opportunité qui n'étaient pas prévues sur des gradients de pressions, il est difficile d'identifier un (des) indicateur(s) potentiel(s) de composition face aux pressions anthropiques. Notre travail a donc été centré sur la recherche de groupes descripteurs de la diversité des assemblages phytoplanctoniques de différentes classes de taille.

Les analyses statistiques effectuées sur les données génétiques montrent une nette séparation des trois classes de taille étudiées et suggèrent que le picophytoplancton est moins variable dans l'espace-temps que le nano- et le microphytoplancton. Il existe une similarité plus élevée entre deux échantillons du picophytoplancton, même séparés par des centaines de kilomètres (échelle spatiale) ou par plusieurs mois (échelle temporelle). Le nano- et le microphytoplancton montrent des patrons plus hétérogènes. Ces patrons n'excluent pas l'existence d'une variabilité spatio-temporelle des communautés au sein de chaque classe de taille, même celles du picophytoplancton.

Dans le contexte de la Directive Cadre sur l'Eau, un indicateur de composition doit avoir trois qualités : (i) une sensibilité face aux pressions anthropiques (*e.g.* enrichissement excessif en sels nutritifs), (ii) une comparabilité de l'indicateur sur l'ensemble des masses d'eau et (iii) une variabilité minimale (Brun et Soudant, 2015). Les données de diversité génétiques acquises montrent que le nano- et le microphytoplancton présentent une dissimilarité dans l'espace et dans le temps plus marquée que le picophytoplancton, même en l'absence d'un gradient de pression suffisamment prononcé. Le picophytoplancton serait donc relativement moins variable, un avantage en termes de

comparabilité sur un ensemble des masses d'eau, à condition qu'il réagisse de façon sensible à un gradient de pression prononcé.

Cette similarité plus importante observée au sein des assemblages du picophytoplancton peut être reliée à la présence récurrente de certains OTUs. Par exemple, à l'échelle spatiale quelques taxons dominent souvent cette fraction de taille, c'est le cas de certains OTUs appartenant à la classe des : Mamiellophyceae (notamment les genres *Micromonas* et *Ostreococcus*), Prymnesiophyceae (*Chrysochromulina rotalis*) ainsi que certains OTUs non-identifiés des classes Dinophyceae et Cryptophyceae. Quelques-uns de ces OTUs sont également présents de façon récurrente et abondante à l'échelle temporelle, principalement *Micromonas* et *Ostreococcus*.

Pour le picophytoplancton, il a été également possible d'établir une relation entre l'importance relative de certains OTUs, principalement des Mamiellophyceae, et la concentration en chlorophylle *b*. Cette dernière est un pigment caractéristique de toutes les algues vertes (Chlorophyta) mais les plus fortes corrélations ont été observées avec les OTUs *Micromonas* et *Bathycoccus prasinos*. Ce résultat démontre ainsi la compatibilité entre les données pigmentaires et génétiques.

La chlorophylle *b* pourrait donc être considérée comme un pigment caractéristique du picophytoplancton, étant donné que la plupart des organismes qui la possèdent font partie de cette fraction de taille. Ceci est corroboré par le fait qu'en médiane 81% de la concentration totale de la chlorophylle *b* mesurée dans nos échantillons est rencontrée dans cette fraction de taille. De plus, nous avons observé une bonne correspondance entre la concentration en chlorophylle *a* et chlorophylle *b* au sein du picophytoplancton. La chlorophylle *b* pourrait donc être un bon descripteur de la biomasse et de la variabilité du picophytoplancton, notamment de la classe des Mamiellophyceae.

Suite à cette étude, plusieurs résultats significatifs peuvent être soulignés :

- l'analyse des conditions hydrologiques rencontrées lors des différentes campagnes faisant l'objet de cette étude montrent l'absence d'un gradient de pressions suffisamment prononcé pour établir une relation avérée entre pressions et OTUs ou pigments. Dans ce contexte de variabilité environnementale, il est difficile de rechercher un (des) indicateur(s) potentiel(s) de composition face aux pressions. Le travail a donc été centré sur la recherche des groupes ou pigments descripteurs des assemblages phytoplanctoniques de différentes classes de taille du phytoplancton
- la variabilité spatio-temporelle des peuplements du phytoplancton dépend des classes de taille, le picophytoplancton étant relativement moins variable dans l'espace et dans le temps que le nano- et le microphytoplancton
- au sein du picophytoplancton, quelques OTUs sont rencontrés de façon récurrente dans l'espace et dans le temps et certains d'entre eux, notamment *Bathycoccus prasinos* et *Micromonas* peuvent être considérés comme descripteurs de cette classe de taille. Ces micro-algues sont caractérisées par la chlorophylle *b*, leur dynamique pourrait donc être suivie au moyen de ce pigment
- la chlorophylle *b* du picophytoplancton représente en médiane 81% de la chlorophylle *b* totale de l'échantillon. Au sein du picophytoplancton, il existe une bonne correspondance entre les chlorophylles *b* et *a*, cette dernière étant un bon indicateur de la biomasse totale du picophytoplancton. Ainsi, la chlorophylle *b* pourrait donc être un descripteur pertinent de la variabilité de la biomasse du picophytoplancton

En conclusion, la chlorophylle *b* semble donc être un bon descripteur de la dynamique et de la biomasse totale du picophytoplancton, et représente en particulier la variabilité d'espèces de la classe Mamiellophyceae, notamment *Micromonas* sp et *Bathycoccus prasinos*, elles mêmes considérées comme deux espèces clés de cette classe de taille.

Les données analysées proviennent de campagnes d'opportunité et n'ont pas pu saisir toute la diversité des conditions environnementales. De ce fait, la pertinence de ces OTUs et de la chlorophylle *b* comme descripteur de l'état des masses d'eau doit être testée sur un gradient plus contrasté en termes de pressions. Il faudrait donc réaliser un échantillonnage sur un gradient environnemental bien établi au préalable afin de tester l'hypothèse selon laquelle la chlorophylle *b* et les abondances relatives des OTUs *Micromonas* et *Bathycoccus prasinos* peuvent être utilisées pour la détection et la quantification des conditions environnementales qui relèvent des influences anthropiques.

Propositions basées sur les résultats de la méthode microscopie

Dans le cadre de la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), l'évaluation de l'état écologique des eaux littorales repose notamment sur le suivi de la composition du phytoplancton, indice non défini à ce jour en France. Dans le cadre du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie (REPHY), mis en place en 1984, ou d'autres réseaux régionaux, des dénombrements de l'ensemble des espèces phytoplanctoniques échantillonnées dans l'eau sont réalisés par microscopie optique et les principaux paramètres hydrologiques du milieu marin sont mesurés. L'ensemble de ces données constitue une source d'information importante pour l'étude de la composition du micro-phytoplancton et son lien avec les pressions anthropiques conduisant à des phénomènes d'eutrophisation (p.ex. les teneurs en sels nutritifs). La présente étude a pour objectif de proposer un ou plusieurs indice(s) de composition phytoplanctonique, basé(s) sur les dénombrements réalisés au microscope, pour évaluer la qualité des eaux littorales de la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE.

Dans leur revue bibliographique, Brun et Soudant (2015) proposent un processus pour le développement d'indicateurs, particulièrement lorsqu'il se déroule dans un cadre de gestion. La présente étude se positionne dans la deuxième étape du processus (c.-à-d. le développement des indices ou indicateurs), avec une réalisation des étapes suivantes : (i) le listing d'indices de composition potentiellement utilisables ; (ii) et la sélection du ou des meilleur(s) indice(s) selon des qualités attendues. Dans leur article, Spatharis et Tsirtsis (2010) proposent une méthode pour la sélection d'indices de composition, basée sur l'étude de la monotonie et de la linéarité de la relation entre l'indice et le logarithme de l'abondance totale. Dans la présente étude, la liste d'indices et la méthode de sélection proposées par Spatharis et Tsirtsis (2010) sont reprises et appliquées aux données issues de 16 lieux de surveillance, répartis sur l'ensemble de la façade Manche-Atlantique.

Cette étude a permis de sélectionner six indices : les indices « Odum », « Menhinick », « Camargo », « Sheldon », « E3 » et « Simpson E ». Cinq critères de sélection ont été utilisés : (i) la représentativité de l'indice ; (ii) sa facilité d'analyse ; (iii) sa comparabilité entre différents lieux géographiques répartis sur l'ensemble de la façade Manche-Atlantique ; (iv) son lien avec les pressions, au travers de l'étude de la monotonie de la relation indice vs log₁₀ de l'abondance et du coefficient de corrélation linéaire de cette relation ; (v) et une variabilité minimale autour de la relation indice vs log₁₀ de l'abondance. L'abondance totale a été utilisée comme proxy de l'ensemble des pressions liées à l'eutrophisation. Ces résultats sont en cohérence avec les résultats de Spatharis et Tsirtsis (2010), qui supposent que les indices les plus pertinents sont « Menhinick », « Sheldon », « E3 » et « Camargo ».

Une étude descriptive des valeurs des indices en fonction des concentrations en nitrates ou en phosphates, non présentée dans ce rapport, n'a pas montré de relation claire entre indice et nutriments. Toutefois, afin d'appréhender le lien entre indice et sels nutritifs, des calculs de coefficients de corrélation sur les rangs, c.-à-d. de Spearman et de M.G.Kendall, ont été réalisés sur les médianes mensuelles des indices et des concentrations en nutriments, avec différents écarts de temps entre nutriments et indice de composition. Ces calculs, bien que réalisés dans un but informatif seulement, ont amené à des conclusions cohérentes avec celles apportées par l'étude de la relation indice vs abondance, c.-à-d. les indices les plus pertinents sont « Menhinick », « Odum », « Camargo », « E3 » et « Sheldon ». Cependant, une étude plus approfondie de la relation indice vs pressions, autre que l'abondance totale (p.ex. sels nutritifs, température), au moyen d'autres outils statistiques serait nécessaire pour confirmer la pertinence de ces indices.

Les indices « Odum » et « Menhinick » donnent une mesure de la richesse taxinomique relativement à l'abondance totale. Les indices « Camargo », « Sheldon », « E3 » et « Simpson E » donnent une mesure de l'équilibre entre les différents taxons, c'est-à-dire si tous les taxons ont un nombre d'individus similaire ou si un ou quelques taxon(s) domine(nt). La création d'un indice multi-métrique pourrait permettre d'intégrer ces deux composantes.

Dans ce travail, l'étude a été réalisée à l'échelle des échantillons. Cependant, pour que l'indice soit opérationnel dans le cadre de la DCE, il doit être calculé à l'échelle du plan de gestion, c.-à-d. une valeur (p.ex. maximum, médiane, percentile) doit traduire l'état de la masse d'eau pour un plan de six ans. De plus, dans le cadre de la DCE, cinq classes de qualité et donc quatre frontières doivent être définies. Ainsi, des travaux complémentaires relatifs à l'agrégation temporelle des mesures, à la définition des valeurs de référence et par conséquent au calcul des EQR restent à faire, en lien avec les experts thématiques. L'ultime étape étant l'application de l'indice final et de ces règles (c.-à-d. agrégation et seuils) aux données DCE, sur six années, puis la confrontation de ces résultats aux dires d'experts.

Conclusion générale

Ces deux rapports font des propositions pour des descripteurs de la composition du phytoplancton :

(i) en se basant sur le picophytoplancton, dont il a été montré qu'il était relativement moins variable dans l'espace et dans le temps que le nano- et le microphytoplancton. Un bon descripteur de la dynamique et de la biomasse totale du picophytoplancton serait la chlorophylle *b*, représentant en particulier la variabilité d'espèces de la classe Mamiellophyceae, notamment *Micromonas* sp et *Bathycoccus prasinos*, elles-mêmes considérées comme deux espèces clés de cette classe de taille.

(ii) en utilisant un des indices suivants, appliqué aux dénombrements du phytoplancton réalisés au microscope : les indices « Odum » ou « Menhinick », qui donnent une mesure de la richesse taxinomique relativement à l'abondance totale, ou les indices « Camargo », « Sheldon », « E3 » et « Simpson E », qui donnent une mesure de l'équilibre entre les différents taxons, c'est-à-dire si tous les taxons ont un nombre d'individus similaire ou si un ou quelques taxon(s) domine(nt). La création d'un indice multi-métrique pourrait permettre d'intégrer ces deux composantes.

Dans les deux cas cependant, les études ne peuvent pas aller plus loin dans la définition des classes et des valeurs de référence, pour les raisons suivantes :

(i) pour le premier rapport : nécessité de disposer de données supplémentaires, dédiées à cet objectif. En effet, les données utilisées provenaient de campagnes d'opportunité et n'ont pas pu saisir toute la diversité des gradients environnementaux.

(ii) pour le deuxième rapport : nécessité d'une étude plus approfondie de la relation indice vs pressions, autre que l'abondance totale (p.ex. sels nutritifs, température), au moyen d'autres outils statistiques.

Enfin, dans les deux cas, des travaux complémentaires relatifs à l'agrégation temporelle des mesures, à la définition des valeurs de référence et des seuils, restent à faire en lien avec les experts thématiques.



GNRS UPMC
Station Biologique
Roscoff



Propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basé sur les résultats des méthodes de diversité pigmentaire et génétique

Rapport Final

Auteurs

Dr Tania Hernández Fariñas (UPMC – Station Biologique de Roscoff)

Dr Raffaele Siano (Ifremer – Dyneco/Pelagos, Brest)

Dr Daniel Delmas (Ifremer – Dyneco/Pelagos, Brest)

Collaborateurs

Dr Mélanie Brun (Ifremer – Vigies, Nantes)

Dr Nathalie Simon (UPMC – Station Biologique de Roscoff)

Février 2016

RESUME

Ce travail s'inscrit dans la continuité des études effectuées précédemment (Siano et Delmas, 2013, 2015) sur la recherche d'un indicateur de diversité du phytoplancton en utilisant deux méthodes complémentaires à la microscopie optique : la diversité génétique analysée par approche de *metabarcoding* (analyse exhaustive de la diversité et abondance relative des OTUs, *i.e.* groupes des séquences identifiés pour leur ressemblance génétique) et la diversité pigmentaire (analyse de la diversité et de l'abondance des pigments produits par les cellules photosynthétiques). Dans le cadre de cette étude nous avons cherché à : (i) approfondir nos connaissances sur la structure spatio-temporelle des assemblages phytoplanctoniques en rapport aux forçages environnementaux pour trois classes de taille (0,2-3 μm , 3-20 μm , >20 μm , ici définies par convention respectivement picophytoplancton, nanophytoplancton et microphytoplancton) et (ii) vérifier l'hypothèse que certains groupes du phytoplancton pourraient être représentatifs et descripteurs de leur classe de taille correspondante.

Cette étude s'est basée sur les données recueillies lors de quatre campagnes d'échantillonnage : trois d'entre elles à l'échelle spatiale (campagnes Pelgas 2012, 2013 et Phyttec) et une à l'échelle temporelle (Dynapse). Lors des campagnes Pelgas 2012 et 2013, l'échantillonnage a été réalisé dans le panache de la Gironde au mois de mai, sur trois radiales côte-large. La campagne Phyttec a été effectuée en juin dans la mer d'Iroise (rade de Brest) et la zone Bretagne sud, incluant le panache de la Loire, les Baies de Quiberon et de la Vilaine et la Baie de Concarneau. Enfin, la campagne Dynapse a été réalisée dans la Baie de Concarneau, entre mars et juillet 2012.

Les analyses statistiques effectuées sur les données de *metabarcoding* montrent une nette séparation des trois classes de taille étudiées et suggèrent que le picophytoplancton est moins variable dans l'espace-temps que le nano- et le microphytoplancton. Ceci est lié à la présence récurrente et proportionnellement plus abondante dans cette fraction de taille de certains OTUs tels que *Micromonas*, *Ostreococcus* (Mamiellophyceae) et *Chrysochromulina rotalis* (Haptophyceae). Au sein du picophytoplancton nous avons retrouvé une bonne correspondance entre certains OTUs du groupe des Mamiellophyceae et la chlorophylle *b*, le pigment caractéristique de cette classe de microalgues. Cette correspondance conforte la bonne inter-calibration des données de diversité pigmentaire et génétique. La chlorophylle *b* s'est avéré être un bon descripteur de la biomasse et de la variabilité du picophytoplancton. En effet, au sein du picophytoplancton, la chlorophylle *b* est positivement corrélée à la chlorophylle *a* totale, cette dernière étant elle-même indicatrice de la biomasse picophytoplanctonique totale.

La variabilité du phytoplancton, étudiée par l'analyse génétique et des pigments, n'est pas expliquée par les paramètres environnementaux mesurés, certainement à cause de gradients environnementaux insuffisamment prononcés retrouvés au moment de l'échantillonnage des campagnes. Au vue des résultats obtenus, nous recommandons de tester la pertinence des OTUs (notamment ceux identifiés au sein du picophytoplancton) et de la chlorophylle *b* en tant que descripteurs de l'état des masses d'eau sur un gradient plus contrasté en termes de pressions. Il faudrait donc réaliser un échantillonnage sur un gradient environnemental bien établi au préalable afin de tester l'hypothèse selon laquelle la chlorophylle *b* et les abondances relatives des OTUs *Micromonas* et *Bathycoccus prasinos* peuvent être utilisées pour la détection et la quantification des conditions environnementales qui relèvent des influences anthropiques.

MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

Metabarcoding, OTUs, pigments, picophytoplancton, indicateurs, niche écologique, Mamiellophyceae, chlorophylle *b*, Rade de Brest, Bretagne sur, Panache de la Gironde

ABSTRACT

The present work is a continuation of several studies carried out in the past (Siano and Delmas, 2013, 2015) on investigating an indicator of phytoplankton diversity using two methods complementary to optical microscopy: the genetic diversity analyzed with metabarcoding (exhaustive analysis of the diversity and relative abundance of OTUs, *i.e.* groups of sequences identified by their genetic resemblance) and the pigmentary diversity (analysis of the diversity and abundance of pigments produced by photosynthetic cells). As part of the present study we aim to (i) to deepen our knowledge on the spatio-temporal structure of phytoplankton assemblages in relation with environmental forcings for three size classes (0,2-3 μm , 3-20 μm , >20 μm , here respectively defined by convention as picophytoplankton, nanophytoplankton and microphytoplankton), and (ii) to verify the hypothesis that certain groups of the phytoplankton could be representative and descriptor of their corresponding size class.

This work relies on data collected during four sampling campaigns: three of them at spatial scale (Pelgas 2012, 2013, and Phytec campaigns) and one at temporal scale (Dynapse). During Pelgas 2012 and 2013 campaigns, the sampling was done in the Gironde plume during May, on three coast-to-offshore transects. The Phytec campaign was carried out in the Iroise sea (Bay of Brest) and the south area of Britain, including the Loire plume, bays of Quiberon, Vilaine, and Concarneau. Finally, the Dynapse campaign was carried out in the bay of Concarneau, between March and July 2012.

The statistical analyses performed on metabarcoding data show a clear separation of the three size classes studied and suggest that picophytoplankton is less variable in the time space than nano- and microphytoplankton. This is related to the recurrent presence in this size fraction of some OTUs such as *Micromonas* sp, *Ostreococcus* sp and *Chrysochromulina rotalis*. Within picophytoplankton, we found a good correlation between certain OTUs of the Mamiellophyceae group and chlorophyll *b*, the pigment characteristic of this class of microalgae. This correspondence confirms the good inter- calibration of pigment and genetic diversity data. Chlorophyll *b* appeared to be a good descriptor of biomass and variability of picophytoplankton. Indeed, within the picophytoplankton, chlorophyll *b* is positively correlated to the total chlorophyll *a*, the latter being an indicator of the total picophytoplankton biomass.

The phytoplankton variability, studied through the genetic and pigmentary analysis, is not explained by measured environmental parameters, certainly because of insufficiently pronounced environmental gradients during the sampling campaigns. Given the results obtained, we recommend testing the relevance of OTUs (especially those identified within picophytoplankton) and chlorophyll *b* as descriptors of the state of water masses on a more contrasted gradient of pressures. A sampling should be carried out on a well-established environmental gradient beforehand in order to test the hypothesis that chlorophyll *b* and relative abundances of OTUs *Micromonas* and *Bathycoccus prasinos* could be used for the detecting and quantifying environmental conditions that fall anthropogenic influences.

KEY WORDS (THEMATIC AND GEOGRAPHICAL AREA)

Metabarcoding, pigments, picophytoplankton, indicators, ecological niche, Mamiellophyceae, chlorophyll *b*, Brest Bay, Southern Britain, Gironde plume

Sommaire

1. Contexte et objectifs.....	4
2. Données et méthodes	5
2.1 Stratégie d'analyse de la diversité phytoplanctonique génétique et pigmentaire	5
2.2 Zones d'étude et données disponibles.....	5
2.3 Analyses statistiques des données	7
2.3.1 Traitement préliminaire des données génétiques.....	7
2.3.2 Analyses descriptives et d'ordination	8
3. Relation entre les paramètres environnementaux et la structure des assemblages phytoplanctoniques	8
3.1 Contexte hydrologique.....	8
3.2 Etudes de corrélation entre paramètres environnementaux et données biologiques	11
4. Diversité génétique et pigmentaire.....	12
4.1 Structure des assemblages dans l'espace et dans le temps par classe de taille.....	12
4.2 L'approche de niche écologique dans l'identification d'espèces indicatrices.....	16
5. Conclusions et perspectives.....	16
6. Références	17

1. Contexte et objectifs

Le long des zones côtières, la production primaire associée au phytoplancton est étroitement liée à la variabilité de la qualité de l'eau, d'où le fait que le phytoplancton soit souvent utilisé comme indicateur de la dégradation des masses d'eau résultant des activités humaines (*e.g.* enrichissement excessif des eaux par des éléments nutritifs provenant des eaux usées et des activités agricoles). En réponse aux variations environnementales, la structure et la composition du phytoplancton sont modifiées. A l'échelle spatiale, des gradients environnementaux dessinent des changements de la structure des assemblages autotrophes en fonction de la tolérance des espèces qui les composent, mais également à cause de phénomènes de compétition ou des habitats disponibles. A l'échelle temporelle, ces facteurs favorisent la succession, parfois très rapide, des communautés pélagiques. Enfin, le phytoplancton réagit de façon différentielle selon les organismes aux changements spatio-temporels de l'environnement, car la biologie et l'écologie des individus varient considérablement à travers les différentes classes taxinomiques et le spectre de tailles dans lesquels nous pouvons différencier ces organismes. Ainsi, le picophytoplancton (généralement regroupant les cellules $< 2\mu\text{m}$), le nanoplancton ($2\text{-}20\ \mu\text{m}$) et le microphytoplancton ($>20\ \mu\text{m}$) peuvent varier de manière indépendante, à la fois dans l'espace et dans le temps.

Ces différents points se traduisent par la nécessité d'intégrer la notion de niveaux d'organisation de la communauté phytoplanctonique par classes de taille à différentes échelles spatiales et temporelles afin de mieux appréhender la dynamique de ces assemblages pélagiques. Une fois la variabilité intrinsèque des différentes classes de taille évaluée, il est envisageable de rechercher des descripteurs de biodiversité phytoplanctonique capables de représenter indépendamment la variabilité de chaque classe de taille.

Depuis des décennies, les analyses des échantillons de phytoplancton en microscopie optique ont permis d'observer et d'identifier de nombreux organismes, contribuant ainsi à améliorer les connaissances sur ce compartiment biologique. Néanmoins, dans un contexte d'étude de la diversité biologique, la microscopie optique pose certaines contraintes, notamment pour l'identification d'espèces de la petite fraction de taille ($<20\ \mu\text{m}$) ou des espèces cryptiques (espèces identiques morphologiquement mais différenciables génétiquement) ou pseudocryptiques (espèces différenciables par des caractéristiques morphologiques ultrafines appréciables en microscopie électronique). Ainsi, l'identification du phytoplancton est un défi pour les planctonologues qui étudient sa biodiversité et son évolution.

Depuis quelques années, l'approche de *metabarcoding* d'analyse de la diversité génétique de tous les protistes marins (organismes unicellulaires eucaryotes autotrophes et hétérotrophes confondus) s'est développé afin d'évaluer exhaustivement (en terme de quantité de données acquises et de finesse de caractérisation spécifique) un échantillon de phytoplancton. Cette approche standardisable (qui permet de s'affranchir des problèmes liés à la subjectivité d'un opérateur en microscopie optique) apporte une information sur la taxinomie des organismes et a permis des avancements considérables dans la compréhension de l'écologie microbienne marine.

De manière complémentaire, l'analyse pigmentaire par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) permet d'obtenir une distribution des groupes photosynthétiques par l'étude de leurs pigments bio-marqueurs. Cette méthode présente l'avantage d'avoir une bonne résolution sur toutes les classes de taille du phytoplancton ainsi qu'une bonne reproductibilité. Bien qu'il soit impossible de déterminer les espèces, la diversité pigmentaire apporte une information sur les différentes classes d'organismes photosynthétiques et sur leur abondance en termes de biomasse.

Depuis 2012, quatre campagnes d'échantillonnage ont été réalisées dans le Golfe de Gascogne et des échantillons destinés à l'analyse de la diversité génétique des protistes autotrophes par *metabarcoding* et de diversité pigmentaire ont été prélevés. Ces campagnes ont été effectuées pour couvrir la variabilité spatiale et temporelle des assemblages phytoplactoniques. Ensuite, ces échantillons ont été utilisés pour répondre aux objectifs de la fiche Onema proposée.

Les premières analyses effectuées sur les données acquises de diversité génétique et pigmentaire (voir Siano et Delmas, 2013, 2015) ont mis en évidence la bonne résolution taxinomique de l'approche de *metabarcoding* pour l'étude de la diversité génétique phytoplanctonique, et la bonne corrélation entre ces données et celles de diversité pigmentaire (voir Siano et Delmas, 2013, 2015).

La validation des méthodes utilisées et la vérification de leur comparabilité et complémentarité a été une première étape à la définition d'indicateurs de composition des communautés (voir Siano et Delmas, 2013, 2015). A partir de travaux effectués auparavant, dans le cadre de ce travail nous avons cherché à (i) approfondir nos connaissances sur la structure spatio-temporelle des assemblages phytoplanctoniques en rapport aux forçages environnementaux pour trois classes de taille de protistes marins (0,2-3 μm , 3-20 μm , >20 μm , ici définies par convention respectivement picophytoplancton, nanophytoplancton et microphytoplancton) et (ii) vérifier l'hypothèse que certains groupes du phytoplancton pourraient être représentatifs et descripteurs de leur classe de taille correspondante. Ces recherches s'inscrivent dans une démarche visant l'identification d'indicateurs des communautés phytoplanctoniques en lien avec la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et la Directive Cadre Stratégie du Milieu Marin (DCSMM).

2. Données et méthodes

2.1 Stratégie d'analyse de la diversité phytoplanctonique génétique et pigmentaire

Afin d'étudier la diversité et dynamique des assemblages, deux méthodes complémentaires à la microscopie optique ont été utilisées : la diversité génétique analysée par approche de *metabarcoding* et la diversité pigmentaire analysée par HPLC. La première consiste en une analyse de l'abondance relative d'OTUs (Operational Taxonomic Units), *i.e.* de groupes de séquences identifiés par leur ressemblance génétique. La seconde permet l'analyse de la diversité et de l'abondance des pigments produits par les cellules photosynthétiques. De plus amples détails sur la mise en œuvre des deux méthodes sont disponibles dans Siano et Delmas (2015). Dans le cadre de cette étude, le pico-, le nano- et le microphytoplancton ont été étudiés sur la même base de séparation des cellules, *i.e.* 0,2- 3 μm , 3 – 20 μm et > 20 μm . La séparation a été effectuée par filtration différentielle à l'aide de filtres de porosité égale à 0,2, 3 et 20 μm . Pour des raisons de comparabilité entre données, les traitements statistiques des données ont été effectués que sur les OTUs assignés à des protistes autotrophes et en particulier sur les pigments produits par les espèces eucaryotes.

2.2 Zones d'étude et données disponibles

Les données disponibles pour cette étude, recueillies lors de quatre campagnes d'échantillonnage, sont présentées en Table 1 et Figure 1.

Lors des campagnes **Pelgas 2012** et **2013**, l'échantillonnage a été réalisé dans le panache de la Gironde au mois de mai, sur trois radiales côte-large. Les prélèvements ont été effectués sur deux niveaux de profondeur : en surface et au maximum de chlorophylle *a* identifié par CTD (profondeur entre 11 et 45

mètres en fonction des stations). L'étude de la diversité génétique a été limitée à la radiale nord (Figure 1B). Sur cette radiale, 15 et 16 échantillons ont été prélevés sur les campagnes de 2012 et 2013, respectivement. Les données génétiques du picophytoplancton (0,2 - 3 μm) ne sont pas disponibles en 2012.

La campagne **Phytec** est composée de 28 stations échantillonnées en début de période estivale et réparties sur la mer d'Iroise (rade de Brest) et la zone Bretagne sud, incluant le panache de la Loire, les Baies de Quiberon et de Vilaine et la Baie de Concarneau. Les données de diversité pigmentaire ne sont pas disponibles pour cette campagne.

La campagne **Dynapse** a été centrée sur la dynamique temporelle des assemblages du phytoplancton. Au total, 26 échantillons ont été réalisés entre mars et juillet 2012, pendant la période de production majeure du phytoplancton, à une fréquence bihebdomadaire, sauf contrainte météorologique. Les prélèvements ont été effectués dans la couche homogène de surface, *i.e.* 5 – 10 mètres.

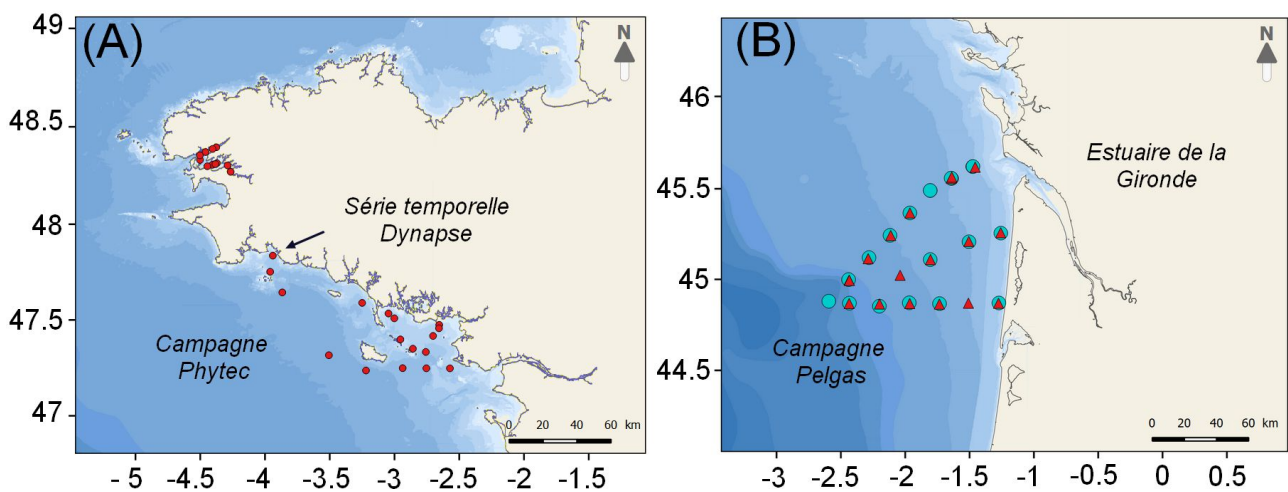


Figure 1 : Localisation des stations échantillonnées lors des campagnes analysées dans cette étude. (A) Campagne Phytec dans la Rade de Brest et au sud de la Bretagne ainsi que la série temporelle Dynapse dans la Baie de Concarneau. (B) Campagnes Pelgas 2012 (triangles) et 2013 (cercles). Seule la radiale nord a été analysée pour la diversité génétique.

En conclusion, les données issues de ces campagnes permettent de prendre en compte différentes échelles de variations : spatiale (Pelgas 2012, 2013 et Phytec), temporelle (Dynapse) et d'organisation de la communauté, *i.e.* fractionnement en trois classes de taille.

Table 1 : Caractéristiques des campagnes analysées. Le nombre d'échantillons réalisé par classe de taille et profondeur est indiqué dans le tableau, par exemple s8 indique huit échantillons disponibles en surface, p (pic) correspondant au maximum de chlorophylle a.

	PELGAS 2012		PELGAS 2013		PHYTEC		DYNAPSE	
Echelle	spatiale				temporelle			
Localisation	Embouchure de la Gironde				Mer d'Iroise et Bretagne sud		Baie de Concarneau	
Date	Mai-2012		Mai-2013		Juin-2013		Mars/Juillet (2012)	
Données <i>metabarcoding</i>	oui		oui		oui		oui	
Données <i>pigments</i>	oui		oui		non		oui	
Données <i>environnement</i>	oui		oui		oui		oui	
Fractionnement en classes de taille (μm) <i>metabarcoding</i>	>20	s8	>20	s8	>20	s28	>20	s26
		p7		p8				
	3-20	s8	3-20	s8	3-20	s28	3-20	s26
		p7		p8				
	0,2-3	non	0,2-3	s8	0,2-3	s28	0,2-3	s26
				p8				
Fractionnement en classes de taille (μm) <i>pigments</i>	>20	s19	>20	s18	>20	non	>20	s26
		p19		p18				
	3-20	s21	3-20	s18	3-20	non	3-20	s26
		p21		p18				
	0,2-3	s19	0,2-3	s18	0,2-3	non	0,2-3	s26
		p19		p18				

2.3 Analyses statistiques des données

2.3.1 Traitement préliminaire des données génétiques

Les données génétiques résultent en un nombre de copies de séquences d'un marqueur génétique (V4 de l'ADN ribosomique). Ces séquences sont regroupées en entités taxinomiques ou OTUs identifiées par leur ressemblance génétique. A la différence des données de comptages microscopiques correspondant à des abondances par espèce ou par groupe taxinomique, les données issues du *metabarcoding* sont semi-quantitatives. Il est donc plus prudent de travailler avec des proportions d'OTUs. Ainsi, par couple échantillon/classe de taille, les données correspondantes au nombre de copies par OTU ont été transformées en proportion par rapport au nombre total de séquences présentes. Les analyses effectuées ont été réalisées sur une matrice de 111 OTUs de protistes autotrophes.

2.3.2 Analyses descriptives et d'ordination

Des analyses exploratoires ont été effectuées afin de décrire la composition floristique des assemblages et la dominance de certains OTUs dans la communauté phytoplanctonique. Des analyses de corrélation ont permis d'étudier la relation existante entre la proportion des OTUs, la concentration des pigments et les paramètres environnementaux ainsi que la relation entre OTUs et données pigmentaires.

Une analyse multivariée d'ordination (NMDS, *non-metric multidimensional scaling*) a été réalisée au niveau spatial et temporel afin d'étudier la structure des assemblages. Cette analyse est basée sur une matrice de dissimilarité (basée sur la distance de Bray-Curtis) calculée entre paires d'échantillons. Cette méthode fournit une représentation graphique permettant de mettre en évidence les ressemblances entre échantillons : deux « objets » qui sont proches l'un de l'autre sont plus semblables, en ce qui concerne la structure de la communauté, que ceux qui sont plus éloignés.

Toutes les analyses ont été effectuées séparément pour les données spatiales et temporelles et pour certaines analyses séparées par classe de taille.

3. Relation entre les paramètres environnementaux et la structure des assemblages phytoplanctoniques

3.1 Contexte hydrologique

En parallèle des observations du phytoplancton et de leurs pigments associés, la température de l'eau, la salinité, les teneurs en silicates (Si), en phosphates (P) et en azote inorganique (N) dissous ont également été mesurées. Une description détaillée des structures hydrologiques associées à ces campagnes a déjà été effectuée auparavant (Siano et Delmas, 2013, 2015). Dans ce rapport, les principaux éléments concernant la variabilité des paramètres hydrologiques mesurés sont rappelés.

Les conditions hydrologiques des campagnes Pelgas 2012 et 2013 sont différentes. Ceci est imputable aux conditions météorologiques hivernales et printanières de 2013, qui ont engendré un débit moyen de la Gironde deux fois supérieur à celui de 2012 (voir Siano et Delmas, 2015). En 2012, la stratification thermique et haline est très marquée, à l'inverse de 2013 (Figure 2). Le gradient côte-large de concentrations des sels nutritifs (N, Si) est marqué en 2013 le long de la radiale, alors que pendant l'année 2012 des teneurs élevées en azote, silicate et phosphate ont été mesurées qu'à l'embouchure immédiate de la Gironde (St. 522). Une faible variabilité des teneurs en sel nutritifs a été rencontrée au-delà de l'embouchure (Figure 3). De façon générale, les données acquises durant ces campagnes font état de concentrations en phosphates souvent très basses ($< 0.04 \mu\text{M}$), ainsi, le phosphate apparaît comme étant le premier élément limitant la production primaire (voir ratio N/P, Figure 3).

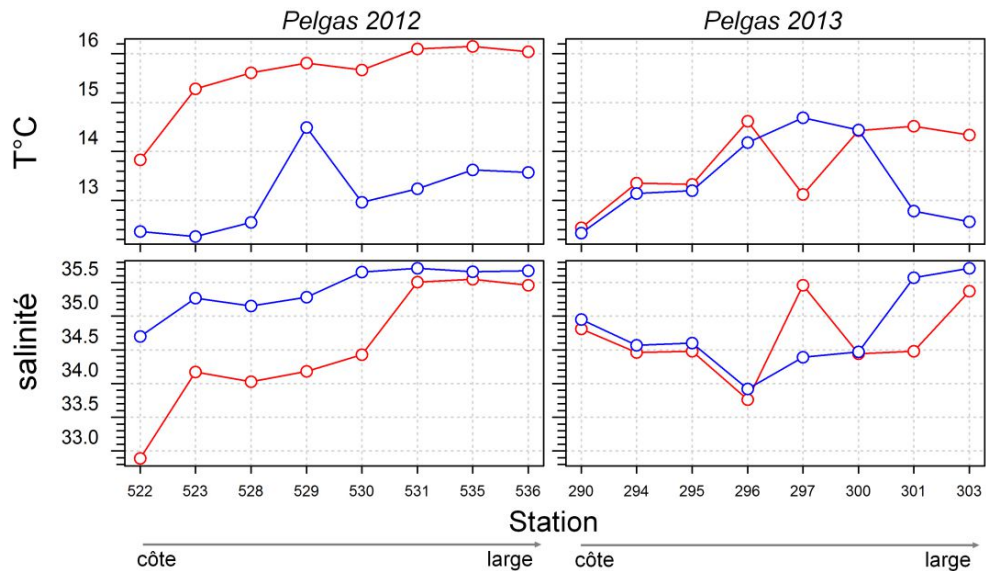


Figure 2 : Variations de la température ($^{\circ}\text{C}$) et de la salinité en surface (rouge) et au niveau du maximum de chlorophylle a (bleue) sur la radiale nord des campagnes Pelgas 2012 (à gauche) et 2013 (à droite).

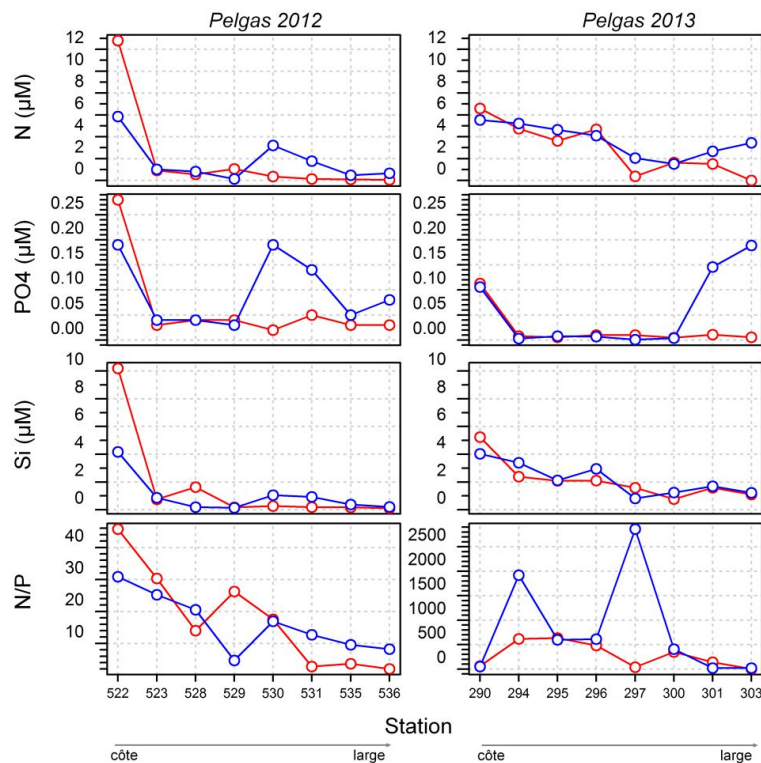


Figure 3 : Evolution des teneurs en azote, silicates et phosphates ainsi que du ratio N/P au cours des campagnes Pelgas 2012 (à gauche) et 2013 (à droite) dans la couche de surface (rouge) et au niveau du maximum de chlorophylle a (bleue).

Au cours de la campagne Phytex, les plus fortes concentrations en azote sont observées aux embouchures immédiates de la Loire et de la Vilaine ainsi que dans la rade de Brest (Figure 4). Les concentrations en phosphate restent basses ($\ll 0,2 \mu\text{M}$) au sud de la Bretagne et élevées aux embouchures de l'Aulne et de l'Elorn, dans la rade de Brest. En conséquence, le phosphate apparaît comme l'élément limitant de la production primaire principalement à l'embouchure de la Loire et dans les Baies de la Vilaine et de Quiberon (ratio N/P $\gg 50$). Les concentrations en silice sont plus élevées dans la rade de Brest et à l'embouchure de la Vilaine.

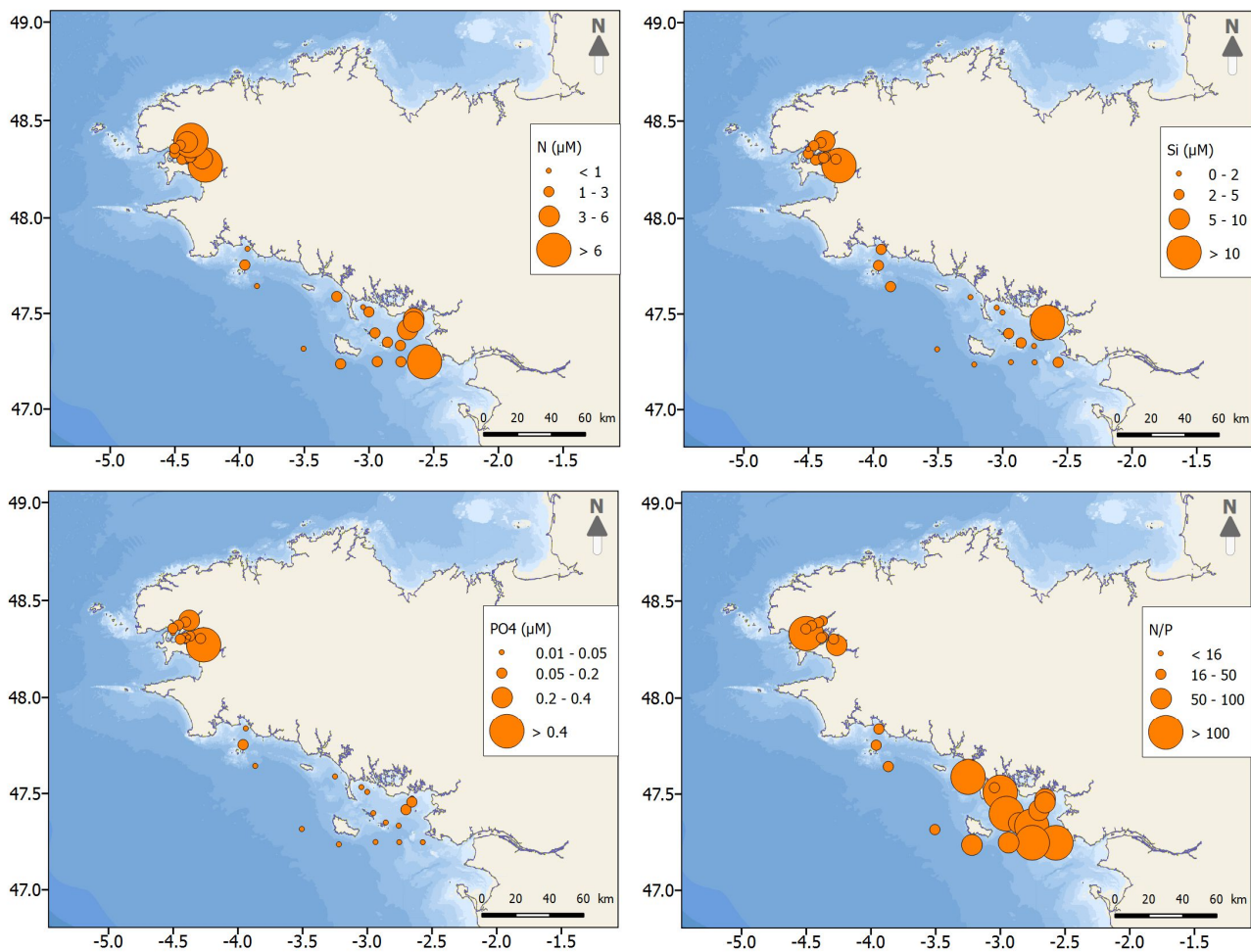


Figure 4 : Variation de la teneur en azote, phosphates et silicates ainsi que du ratio N/P au cours de la campagne Phytec (2013).

L'évolution temporelle des éléments nutritifs durant la campagne Dynapse est marquée par des teneurs faibles en début de campagne ($\sim 2\mu\text{M}$ pour l'azote, < 0.05 pour les phosphates et $\sim 3\mu\text{M}$ pour les silicates) et par une augmentation des concentrations vers mi-fin avril, qui vont être rapidement utilisées par le phytoplancton. En dehors de la période d'enrichissement, le phosphore est le principal élément limitant. Vers la fin du mois de mai, l'azote devient également fortement limitant ($< 0.05\mu\text{M}$). La fin de la période d'étude est marquée par une augmentation de la concentration des sels nutritifs, notamment en silicates (voir Figure 5).

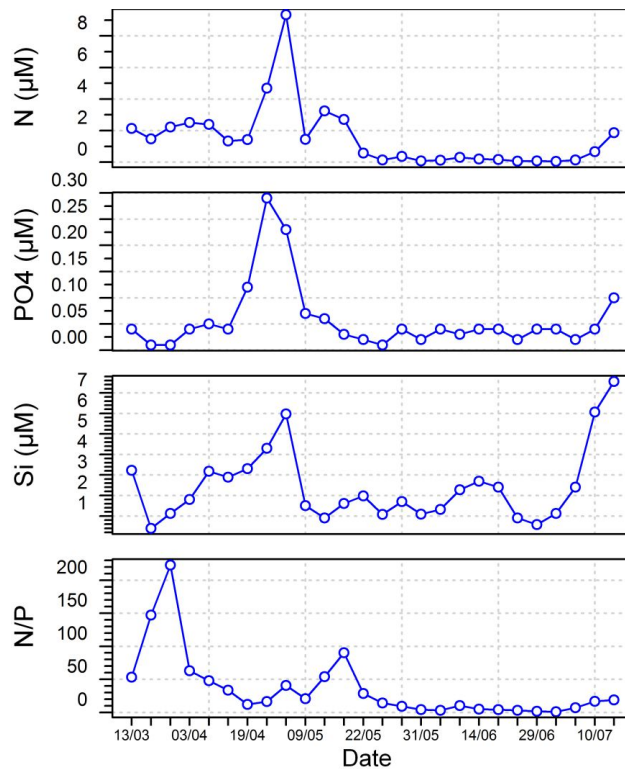


Figure 5 : Evolution temporelle de la concentration des éléments nutritifs durant la campagne Dynapse.

3.2 Etudes de corrélation entre paramètres environnementaux et données biologiques

Nous avons étudié la relation entre chaque pigment et OTUs avec les variables environnementales mesurées (température, salinité, concentration en azote, silice et phosphore). Sur l'ensemble des données disponibles, nous n'avons pas trouvé de lien entre pigments, OTUs et concentrations en sels nutritifs.

En analysant chaque campagne d'échantillonnage indépendamment, il a été mis en évidence une différence de corrélation entre les teneurs en sels nutritifs et les pigments. A titre d'exemple, la corrélation entre la chlorophylle *a* et la concentration en azote est montrée sur la Figure 6. Cette corrélation est de -0.01, toutes campagnes confondues, alors que sur la campagne de Pelgas 2013 le coefficient de corrélation est égal à 0.58.

A l'échelle temporelle (Dynapse), ce coefficient est de 0.16. Cependant, si nous calculons la relation entre ces deux séries temporelles (évolution de chlorophylle *a* et de la concentration en azote) en prenant en compte un décalage de temps entre les deux séries, le coefficient de corrélation est nettement supérieur (corrélation [Chl *a* - N]= 0.66). Ce décalage, estimé à une semaine, indique une réponse tardive de la production primaire par rapport à un enrichissement en éléments nutritifs. La relation statistique entre les données environnementales mesurées de façon ponctuelle et les données biologiques d'une campagne d'échantillonnage est donc complexe à identifier si on ne tient pas compte de la réponse physiologique des espèces phytoplanctoniques.

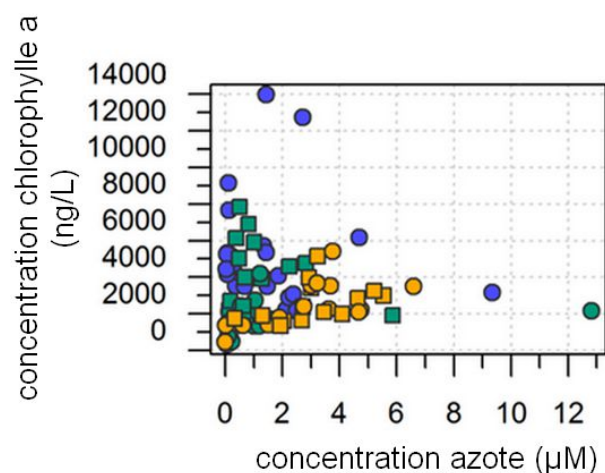


Figure 6 : Corrélation entre la chlorophylle a totale et la concentration en azote. La couleur correspond aux campagnes : bleue – Dynapse, orange – Pelgas 2013, vert – Pelgas 2012. Les symboles correspondent au niveau de profondeur : cercles – surface, carrés – maximum de chlorophylle a.

L'évaluation d'un indicateur de composition pertinent pour renseigner sur l'état des masses d'eau doit être basée sur les écarts observés entre différents niveaux de pressions anthropiques et des conditions dites de « référence ». Cependant, la gamme des variations environnementales rencontrées lors de ces campagnes fait partie de la variabilité naturelle des écosystèmes étudiés et en général des gammes de tolérance physiologique des espèces phytoplanctoniques.

Les structurations des communautés observées sont plutôt associables à des caractéristiques du milieu telles que le mélange/stratification de la colonne d'eau, la disponibilité en lumière, la mortalité par prédation ou parasitisme, plutôt qu'à la variabilité des concentrations de sels nutritifs.

Sur la base de nos données, provenant de campagnes d'opportunité qui n'étaient pas prévues sur de gradients de pressions, il est difficile d'identifier un (des) indicateur(s) potentiel(s) de composition face aux pressions anthropiques. Notre travail a donc été centré sur la recherche de groupes descripteurs de la diversité des assemblages phytoplanctoniques de différentes classes de taille.

4. Diversité génétique et pigmentaire

4.1 Structure des assemblages dans l'espace et dans le temps par classe de taille

L'analyse des similarités des communautés phytoplanctoniques obtenue à partir des données de diversité génétique, par classe de taille, est résumée sur la Figure 7. Qu'il s'agisse de l'échelle spatiale ou temporelle, les ellipses de confiance à 90% des différentes classes de taille sont bien distinguées, avec une continuité de la répartition du couple échantillon/classe de taille. Ce résultat révèle une filtration différentielle efficace des échantillons d'eau de mer.

La surface de l'ellipse de confiance à 90% donne une mesure de la dissimilarité des échantillons par classe de taille. Pour le picophytoplancton et pour les échelles spatiale et temporelle, la surface de l'ellipse est relativement plus petite que celle des ellipses du nano- et microphytoplancton. Ceci montre une similarité plus élevée entre deux échantillons du picophytoplancton, même séparés par des centaines de kilomètres (échelle spatiale) ou par plusieurs mois (échelle temporelle). Le nano- et le

microphytoplancton montrent des patrons plus hétérogènes. Ces patrons n'excluent pas l'existence d'une variabilité spatio-temporelle des communautés au sein de chaque classe de taille, même celles du picophytoplancton (Figure 7). En effet, les échantillons issus de Phyttec et Pelgas se distinguent bien, tout comme ceux issus des différents mois de la campagne Dynapse.

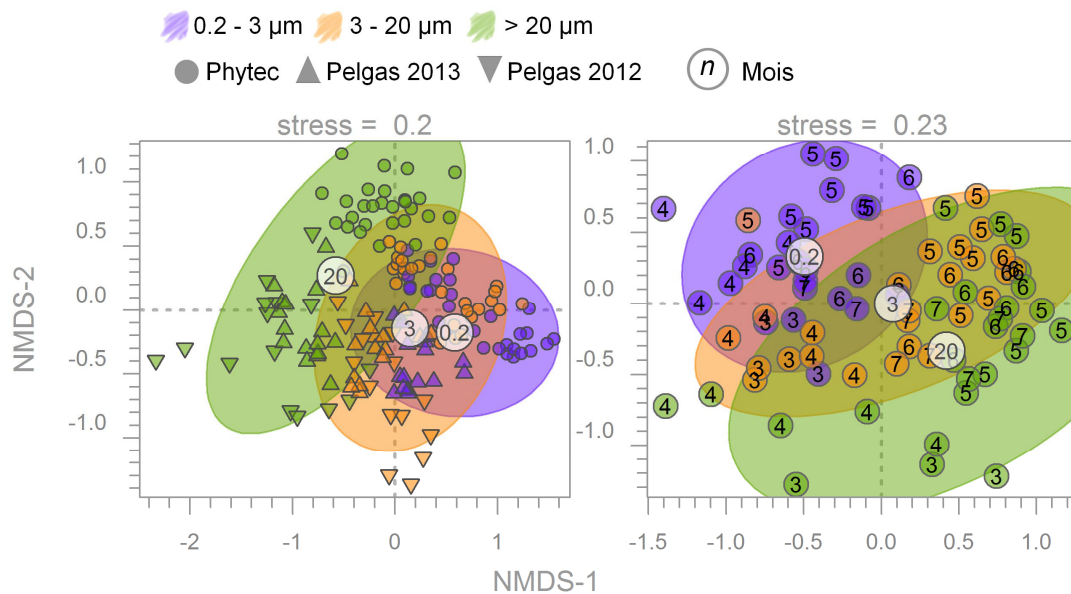


Figure 7 : Structures des communautés phytoplanctoniques obtenues à partir des données génétiques par classe de taille, à l'échelle spatiale (figure à gauche, correspondante aux campagnes Pelgas et Phyttec) et temporelle (figure à droite, correspondante à la campagne Dynapse). Chaque point représente un couple échantillon/classe de taille. Les ellipses correspondent aux limites de confiance à 90% pour chaque fraction de taille.

Dans le contexte de la Directive Cadre sur l'Eau, un indicateur de composition doit avoir trois qualités: (i) une sensibilité face aux pressions anthropiques (*e.g.* enrichissement excessif en sels nutritifs), (ii) une comparabilité de l'indicateur sur l'ensemble des masses d'eau et (iii) une variabilité minimale (Brun et Soudant, 2015). Les données de diversité génétiques acquises montrent que les nano- et le microphytoplancton présentent une dissimilarité dans l'espace et dans le temps plus marquée que le picophytoplancton, même en absence d'un gradient de pression suffisamment prononcé. Le picophytoplancton serait donc relativement moins variable, un avantage en termes de comparabilité sur un ensemble des masses d'eau, à condition qu'il réagisse de façon sensible à un gradient de pression prononcé.

Cette similarité plus importante observée au sein des assemblages du picophytoplancton peut être reliée à la présence récurrente de certains OTUs. Par exemple, à l'échelle spatiale quelques taxons dominent souvent cette fraction de taille (Figure 8). C'est le cas de certains OTUs appartenant à la classe des : Mamiellophyceae (notamment les genres *Micromonas* et *Ostreococcus*), Prymnesiophyceae (*Chrysochromulina rotalis*) ainsi que certains OTUs non-identifiés de la classe Dinophyceae et Cryptophyceae (Figure 8). Quelques-uns de ces OTUs sont également présents de façon récurrente et abondante à l'échelle temporelle, principalement *Micromonas* et *Ostreococcus* (Figure 9).

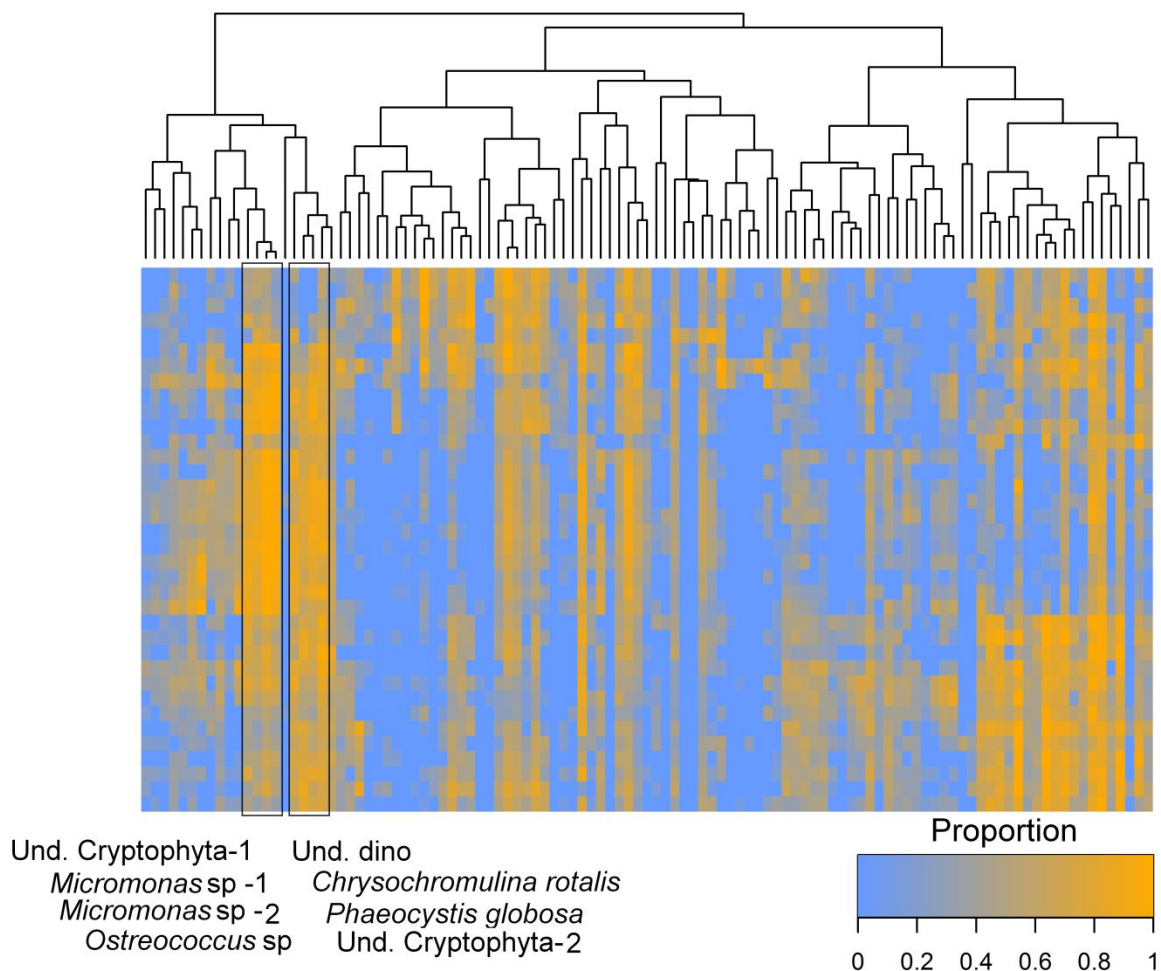


Figure 8 : Dendrogramme et heatmap basé sur la composition du picophytoplancton (0,2-3 μm) en surface à l'échelle spatiale (campagnes Pelgas 2012, 2013 et Phytec). Chaque colonne représente un OTU et chaque ligne un échantillon (station). Pour chaque station la valeur d'abondance de chaque OTU a été divisée par l'abondance de l'OTU le plus observé. En conséquence les valeurs varient entre 0 et 1, 1 étant l'OTU dominant la communauté. Les cadres noirs soulignent des OTUs régulièrement présents et relativement abondants dans la communauté.

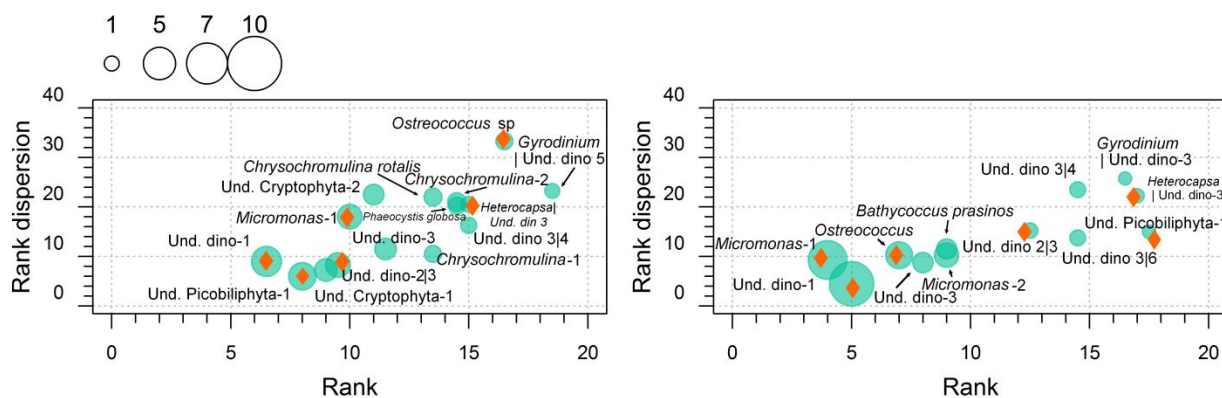


Figure 9 : Rang (médiane) et dispersion (espace interquartile) des OTUs dans le picophytoplancton (0,2-3 μm) à l'échelle spatiale (à gauche, campagnes Pelgas 2012, 2013, et Phytec) et temporelle (à droite, campagne Dynapse). Le diamètre du cercle représente la médiane des proportions de chaque OTU sur l'ensemble de données spatiales et temporelles. Les symboles en orange soulignent les OTUs en commun sur les deux échelles.

Pour le picophytoplancton, il a été également possible d'établir une relation entre l'importance relative de certains OTUs, principalement des Mamiellophyceae, et la concentration en chlorophylle *b*. Cette dernière est un pigment caractéristique de toutes les algues vertes (Chlorophyta) mais les plus fortes corrélations ont été observées avec les OTUs *Micromonas* et *Bathycoccus prasinos* (Figure 10). Ce résultat démontre ainsi la compatibilité entre les données pigmentaires et génétiques.

La chlorophylle *b* pourrait donc être considérée comme un pigment caractéristique du picophytoplancton, étant donné que la plupart des organismes qui la possèdent font partie de cette fraction de taille. Ceci est corroboré par le fait qu'en médiane 81% de la concentration totale de la chlorophylle *b* mesurée dans nos échantillons est rencontrée dans cette fraction de taille. De plus, nous avons observé une bonne correspondance entre la concentration en chlorophylle *a* et chlorophylle *b* au sein du picophytoplancton (corrélation [Chl *a*-Chl *b*] = 0.65, Figure 11).

La chlorophylle *b* pourrait donc être un bon descripteur de la biomasse et de la variabilité du picophytoplancton, notamment de la classe des Mamiellophyceae.

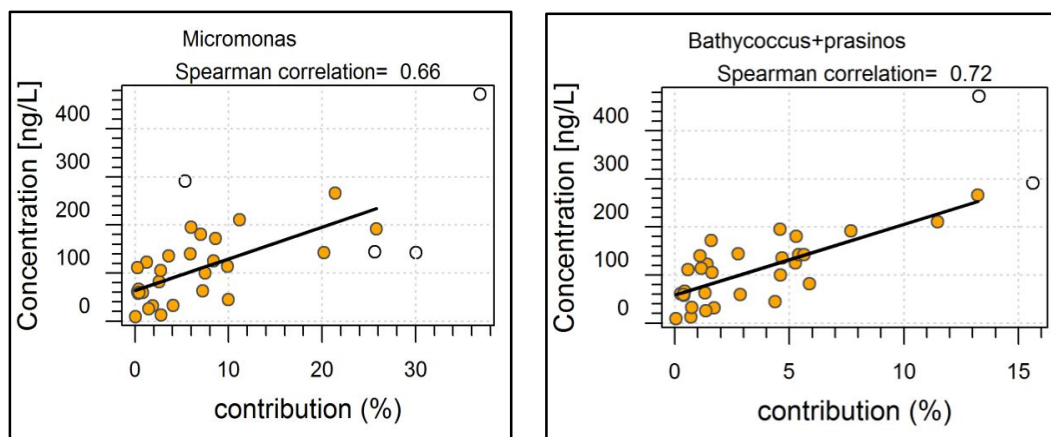


Figure 10 : Relation entre la concentration de chlorophylle *b* et l'importance relative des OTUs *Micromonas* et *Bathycoccus prasinos* appartenant à la classe des Mamiellophyceae. Les points blancs correspondent aux échantillons avec une distance de Cook¹ importante et ont été écartés de la régression linéaire.

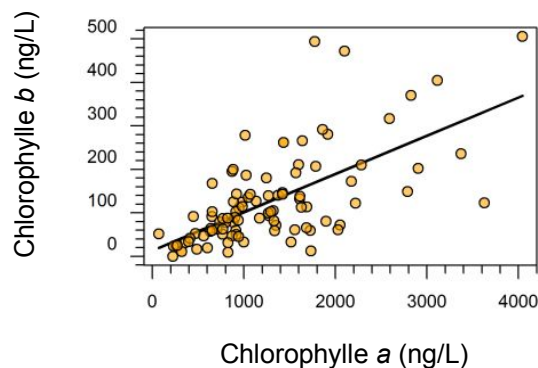


Figure 11 : Relation entre les chlorophylles *a* et *b* mesurées au sein du picophytoplancton.

¹ Il s'agit d'une mesure de l'influence de l'observation respective sur l'équation de régression.

4.2 L'approche de niche écologique dans l'identification d'espèces indicatrices

Au cours du temps, les populations d'espèces phytoplanctoniques ont développé des stratégies afin de maximiser leur croissance et reproduction dans une gamme spécifique de variations des facteurs environnementaux. En dehors de ces limites (gamme de tolérance), la performance des individus diminue, affectant la dynamique de la population et des communautés en général. Les espèces avec une tolérance faible ou modérée aux variations environnementales peuvent nous renseigner efficacement sur la qualité de l'environnement. Dans cette étude l'identification des conditions favorables à la présence des différents OTUs a été réalisée (voir Hernández-Fariñas *et al.* 2015 pour la méthodologie). Cependant, l'absence de gradients environnementaux suffisamment prononcés ne permet pas la différenciation des taxons par rapport à leur niche. En effet, la gamme de variation des paramètres environnementaux d'occurrence des espèces est similaire pour toutes les OTUs (exemple de deux OTUs en Figure 12). Néanmoins, l'étude de la niche écologique devrait être approfondie dans des contextes environnementaux plus contrastés pour tenter d'identifier des espèces indicatrices, et définir un indicateur qui tient compte de la composition et abondance du phytoplancton à l'échelle de la communauté.

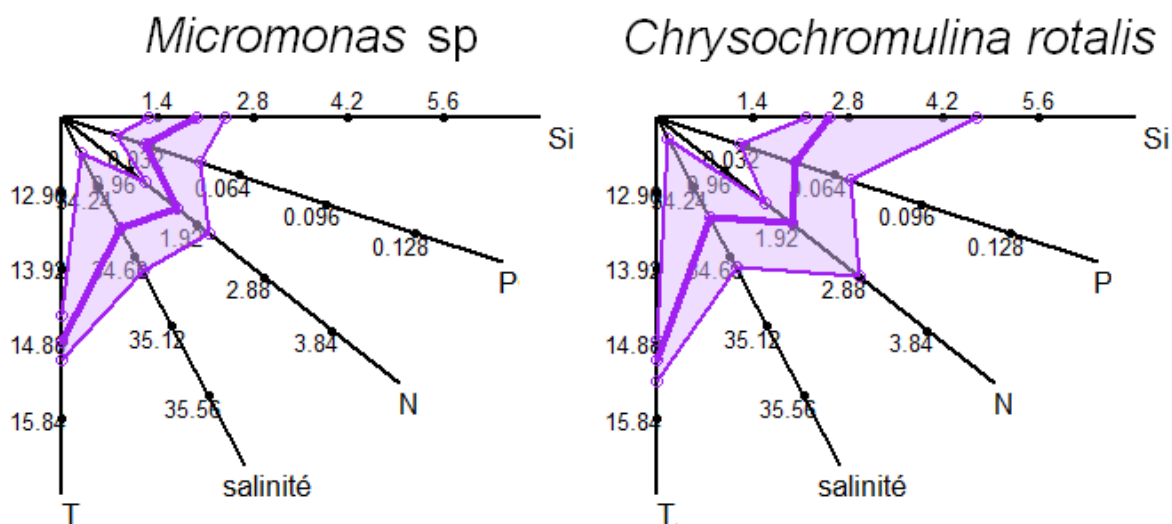


Figure 6 : Gamme des conditions environnementales où les OTUs *Micromonas sp* et *Chrysochromulina rotalis* sont présents. Sont représentés : l'espace interquartile (région violette) et la médiane (ligne en gras violette) de la gamme de valeurs pour chaque paramètre environnemental : T.C : température, N : concentration en azote, P : concentration en phosphates, Si : concentration en silicates.

5. Conclusions et perspectives

La présente étude résume les dernières analyses effectuées sur les données de diversité génétique et pigmentaires visant la recherche d'un indicateur des communautés phytoplanctoniques. Suite à cette étude, plusieurs résultats significatifs peuvent être soulignés :

- l'analyse des conditions hydrologiques rencontrées lors des différentes campagnes montrent l'absence d'un gradient de pressions suffisamment prononcé pour établir une relation avérée entre pressions et OTUs ou pigments. Dans ce contexte de variabilité environnementale, il est difficile de rechercher un (des) indicateur(s) potentiel(s) de composition face aux pressions. Le travail a donc été centré sur la recherche des groupes ou pigments descripteurs des assemblages phytoplanctoniques de différentes classes de taille du phytoplancton ;

- la variabilité spatio-temporelle des peuplements du phytoplancton dépend des classes de taille, le picophytoplancton étant relativement moins variable dans l'espace et dans le temps que le nano- et le microphytoplancton ;
- au sein du picophytoplancton, quelques OTUs sont rencontrés de façon récurrente dans l'espace et dans le temps et certains d'entre eux, notamment *Bathycoccus prasinos* et *Micromonas* peuvent être considérés comme descripteurs de cette classe de taille. Ces microalgues sont caractérisées par la chlorophylle *b*, leur dynamique pourrait donc être suivie au moyen de ce pigment ;
- la chlorophylle *b* du picophytoplancton représente en médiane 81% de la chlorophylle *b* totale de l'échantillon. Au sein du picophytoplancton, il existe une bonne correspondance entre les chlorophylles *b* et *a*, cette dernière étant un bon indicateur de la biomasse totale du picophytoplancton. Ainsi, la chlorophylle *b* pourrait donc être un descripteur pertinent de la variabilité de la biomasse du picophytoplancton.

En conclusion, la chlorophylle *b* semble donc être un bon descripteur de la dynamique et de la biomasse totale du picophytoplancton, et représente en particulier la variabilité d'espèces de la classe Mamiellophyceae, notamment *Micromonas* sp et *Bathycoccus prasinos*, elles mêmes considérées comme deux espèces clés de cette classe de taille.

Les données analysées proviennent de campagnes d'opportunité et non pas pu saisir toute la diversité des conditions environnementales. De ce fait, la pertinence de ces OTUs et de la chlorophylle *b* comme descripteur de l'état des masses d'eau doit être testée sur un gradient plus contrasté en termes de pressions. Il faudrait donc réaliser un échantillonnage sur un gradient environnemental bien établi au préalable afin de tester l'hypothèse selon laquelle la chlorophylle *b* et les abondances relatives des OTUs *Micromonas* et *Bathycoccus prasinos* peuvent être utilisées pour la détection et la quantification des conditions environnementales qui relèvent des influences anthropiques.

L'approche de niche écologique devrait également permettre de confirmer si ces taxons peuvent être utilisés comme indicateurs de l'état du milieu. Cette approche n'est pas seulement réservée aux données génétiques car il serait également intéressant de calculer la « niche » de groupes identifiés par des pigments afin d'établir si ceux-ci constituent un discriminant des différentes conditions de l'environnement.

6. Références

- Brun, M. et Soudant, D. (2015). *Synthèse bibliographique relative à la notion d'indicateur dans le contexte de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM)*. Rapport technique. IFREMER, 68 pp.
- Hernández Fariñas, T., Bacher, C., Soudant, D., Belin, C. and Barillé, L. (2015): *Assessing phytoplankton realized niches using a French National Phytoplankton Monitoring Network*. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 159 (20): 15 – 27.
- Siano, R. et Delmas, D. (2015). *Premières propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basé sur les résultats des méthodes pigments et diversité génétique*. Rapport technique. IFREMER, 17 pp.
- Siano, R. et Delmas, D. (2013). *Acquisition des données complémentaires aux dénombrements, avec les techniques d'analyses pigmentaires et de diversité génétique. Etat d'avancement et premiers résultats*. Rapport technique. IFREMER, 17 pp.

février 2016

Auteur : Mélanie Brun¹

¹Ifremer, Centre Atlantique, Service VIGIES, rue de l'île d'Yeu, BP 21105, F-44311 Nantes Cedex, France

Proposition pour un indice de composition du phytoplancton en Manche-Atlantique, basé sur les résultats de la méthode microscopie

Proposition pour un indice de composition
du phytoplancton en Manche-Atlantique,
basé sur les résultats de la méthode
microscopie

Mélanie BRUN
Ifremer Centre Atlantique
Service VIGIES
Rue de l'île d'Yeu
BP 21105
44311 NANTES Cedex
Tel. : 02.40.37.41.13
Courriel : Melanie.Brun@ifremer.fr

Résumé

Dans le cadre de la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), l'évaluation de l'état écologique des eaux littorales repose notamment sur le suivi de la composition du phytoplancton, indice non défini à ce jour en France. Dans le cadre du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY), mis en place en 1984, des dénombrements de l'ensemble des espèces phytoplanctoniques échantillonnées dans l'eau sont réalisés par microscopie optique. La présente étude a pour objectif de proposer un ou plusieurs indice(s) de composition phytoplanctonique, basé(s) sur les dénombrements réalisés au microscope, pour évaluer la qualité des eaux littorales de la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE.

Dans leur article, Spatharis et Tsirtsis (2010) proposent une méthode pour la sélection d'indices de composition, basée sur l'étude de la monotonie et de la linéarité de la relation entre l'indice et le logarithme de l'abondance totale. Dans la présente étude, la liste d'indices et la méthode de sélection proposées par Spatharis et Tsirtsis (2010) sont reprises et appliquées aux données issues de 16 lieux de surveillance, répartis sur l'ensemble de la façade Manche-Atlantique.

Cette étude a permis de sélectionner six indices : les indices « Odum », « Menhinick », « Camargo », « Sheldon », « E3 » et « Simpson E ». Une étude plus approfondie de la relation indice vs pressions, autre que l'abondance totale, au moyen d'autres outils statistiques serait nécessaire pour confirmer la pertinence de ces indices. De plus, pour que l'indice soit opérationnel dans le cadre de la DCE, des travaux complémentaires relatifs à l'agrégation temporelle des mesures, à la définition des valeurs de référence et par conséquent au calcul des EQR restent à faire, en lien avec les experts thématiques.

Sommaire

Résumé.....	5
1.Introduction.....	9
2.Matériel et méthodes.....	10
2.1.Liste des indices potentiels.....	10
2.2.Données.....	11
2.3.Relation avec le spectre d'eutrophisation.....	13
3.Résultats.....	14
3.1.Données et abondance totale de mars à octobre.....	14
3.2.Monotonie.....	18
3.3.Linéarité.....	19
4.Conclusion et discussion.....	20
5.Bibliographie.....	21
Annexe 1.....	22
Annexe 2.....	24
Annexe 3.....	31

1. Introduction

En Europe, la mise en place de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) a pour objectif d'atteindre ou de maintenir un bon état écologique et chimique des eaux intérieures de surface, des eaux de transition, des eaux côtières et des eaux souterraines (Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne, 2000). Dans ce cadre, l'évaluation de l'état écologique des eaux littorales repose sur le suivi d'éléments de qualité biologiques (EQB), notamment l'EQB phytoplancton dont l'évaluation repose sur trois indices : composition, abondance et biomasse. En France, les indices abondance et biomasse ont été définis (Belin et al., 2014) mais pas l'indice composition. Dans le cadre du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY), mis en place en 1984, des dénombrements de l'ensemble des espèces phytoplanctoniques échantillonnées dans l'eau sont réalisés par microscopie optique. De plus, les principaux paramètres hydrologiques du milieu marin sont également mesurés, dans le cadre du REPHY ou d'autres réseaux régionaux. L'ensemble de ces données constitue une source d'information importante pour l'étude de la composition du micro-phytoplancton et son lien avec les pressions anthropiques conduisant à des phénomènes d'eutrophisation (p.ex. les teneurs en sels nutritifs). La présente étude a pour objectif de proposer un ou plusieurs indice(s) de composition phytoplanctonique, basé(s) sur les dénombrements réalisés au microscope, pour évaluer la qualité des eaux littorales de la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE.

Dans leur revue bibliographique, Brun et Soudant (2015) proposent un processus pour le développement d'indicateurs, particulièrement lorsqu'il se déroule dans un cadre de gestion. La première étape de ce processus consiste en l'identification de la question et de ses composantes. Cette étape correspond au cadre de la DCE : la question, ou objectif général, étant l'objectif de la DCE et les composantes étant les éléments de qualité ainsi que les indices associés. La présente étude se positionne donc dans la deuxième étape du processus (c.-à-d. le développement des indices ou indicateurs), avec une réalisation des étapes suivantes : (i) le listing d'indices de composition potentiellement utilisables ; (ii) et la sélection du ou des meilleurs indices selon des qualités attendues.

Dans leur article, Spatharis et Tsirtsis (2010) utilisent des données issues de la Mer Égée pour établir une relation entre la richesse phytoplanctonique et le logarithme de l'abondance totale, qu'ils utilisent ensuite pour simuler des données de communautés phytoplanctoniques, pour différentes valeurs d'abondance totale. Ensuite, ils calculent pour chaque valeur d'abondance, 22 indices de composition puis ils sélectionnent ceux qui répondent le mieux à deux critères : la monotonie (c.-à-d. le comportement continuellement croissant ou décroissant de la relation) et la linéarité de la relation entre l'indice et le logarithme de l'abondance totale. Enfin, pour les deux indices sélectionnés et un indice composé des deux premiers, ils réalisent une évaluation de la qualité de l'eau, qu'ils comparent aux résultats obtenus avec les indices chlorophylle-a et abondance. Dans la présente étude, la liste d'indices et la méthode de sélection proposées par Spatharis et Tsirtsis (2010) sont reprises et appliquées aux données issues de 16 lieux de surveillance, répartis sur l'ensemble de la façade Manche-Atlantique.

2. Matériel et méthodes

2.1. Liste des indices potentiels

Le développement d'un indice passe par le listing d'indices potentiels déjà proposés par ailleurs, afin de vérifier si l'un d'entre eux répond aux attentes avant de chercher à en développer de nouveaux (Brun et Soudant, 2015). Parmi les qualités attendues d'un indice, il y a : la représentativité de l'indice ainsi que sa facilité d'analyse (Brun et Soudant, 2015). La liste des indices potentiels utilisée dans la présente étude est basée sur la liste utilisée par Spatharis et Tsirtsis (2010). Trois indices supplémentaires ont été ajoutés à cette liste : l'indice Heip, qui est proche des indices Sheldon et E_3 , ainsi que les indices Simpson et Simpson E, proches de l'indice Simpson D (Tableau 1). Ces indices globaux ont l'avantage d'avoir les qualités sus-cité.

Tableau 1. Liste des indices potentiels testés

Indices de diversité	
Richesse	S
Gleason	$G = \frac{S}{\ln(N)}$
Kothe	$K = \frac{S_{max} - S_i}{S_{max}}$
Shannon D'	$D' = S - \sum_{i \neq j}^K \left \frac{n_i}{N} - \frac{n_j}{N} \right $
Shannon H'	$H' = - \sum_{i=1}^S \left(\frac{n_i}{N} \times \ln \left(\frac{n_i}{N} \right) \right)$
Simpson	$Sim = \sum_{i=1}^S \left(\frac{n_i}{N} \right)^2$
Simpson D	$D_{Sim} = \frac{\sum_{i=1}^S n_i \times (n_i - 1)}{N \times (N - 1)}$
Hill N_1	$N_1 = \exp(H')$
Hill N_2	$N_2 = \frac{1}{D_{Sim}}$
Hurlbert	$D_{Hurl} = \left(\frac{N}{N-1} \right) (1 - Sim)$
Margalef	$D_{Mar} = \frac{(S-1)}{\ln(N)}$
McIntosh	$MCI = \frac{N - \sqrt{\sum_{i=1}^S (n_i)^2}}{N - \sqrt{N}}$

Menhinick	$D_{Men} = \frac{S}{\sqrt{N}}$
-----------	--------------------------------

Odum	$O = \frac{1000 \times S}{N}$
------	-------------------------------

Indices de dominance

Berger-Parker	$BP = \frac{\max(n_i)}{N}$
---------------	----------------------------

McNaughton	$McN = \frac{n_1 + n_2}{N}$
------------	-----------------------------

Indices d'homogénéité

Camargo	$C = 1 - \frac{\sum_{i \neq j}^K \left \frac{n_i - n_j}{N} \right }{S}$
---------	--

E_3	$E_3 = \frac{\exp(H') - 1}{S - 1}$
-------	------------------------------------

E_4	$E_4 = \frac{1}{D_{Sim} \times \exp(H')}$
-------	---

E_5	$E_5 = \frac{(1/D_{Sim}) - 1}{\exp(H') - 1}$
-------	--

Heip	$D_{Heip} = \frac{\exp(H')}{S - 1}$
------	-------------------------------------

Pielou	$P = \frac{H'}{\ln(S)}$
--------	-------------------------

Redundancy	$R = \frac{\ln(S) - H'}{\ln(S) - \left(\frac{1}{N} \ln \left(\frac{N!}{(N-S+1)!} \right) \right)}$
------------	--

Sheldon	$Sh = \frac{\exp(H')}{S}$
---------	---------------------------

Simpson E	$E_{Sim} = \frac{1}{D_{Sim} \times S}$
-----------	--

Note : N – nombre total d'individus ; n_i – nombre d'individus de l'espèce i ; n_1 et n_2 – nombre d'individus des deux espèces les plus abondantes ; S_{max} – nombre maximum d'espèce dans un échantillon.

2.2. Données

Lors de l'évaluation de la qualité de l'eau à large échelle, tel que dans le cadre de la DCE, une comparabilité entre les évaluations des différentes masses d'eau est attendue.

Ainsi, l'indice de composition pour l'EQB phytoplancton doit être comparable à l'échelle la plus large possible. Seize lieux de surveillance, couvrant l'ensemble de la façade Manche-Atlantique et représentant des environnements différents, ont été sélectionnés (Tableau 2 et Figure 1) afin de déterminer quels indices sont pertinents dans le plus grand nombre de lieux.

Les données utilisées sont issues du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY), opéré par Ifremer. Ces données concernent les comptages de l'ensemble des flores phytoplanctoniques présentes dans l'échantillon, rapportés en nombre de cellules par litre, de 1992 à 2014 et en surface, c.-à-d. entre 0 et 1m. La période productive du phytoplancton en France s'étend globalement de mars à octobre. Ainsi, seules les données échantillonnées durant ces mois ont été conservées, ceci afin de limiter les faibles abondances qui n'ont pas de lien avec une faible eutrophisation mais plutôt avec des conditions de luminosité et de température non propices au développement du phytoplancton.

Tableau 2. Liste des lieux de surveillance utilisés.

N°	Mnémonique	Libellé
1	001-P-015	Point 1 Dunkerque
2	001-P-017	Point 4 Dunkerque
3	002-P-007	Point 1 Boulogne
4	002-P-030	Point 3 Boulogne
5	006-P-001	At so
6	007-P-008	Bif
7	010-P-001	Antifer ponton pétrolier
8	010-P-109	Cabourg
9	014-P-023	Géfosse
10	018-P-054	Donville
11	047-P-016	Concarneau large
12	055-P-001	Men er Roue
13	063-P-002	Ouest Loscolo
14	082-P-001	Auger
15	087-P-008	Arcachon – Bouée 7
16	088-P-050 088-P-057	+ Teychan bis + Tès

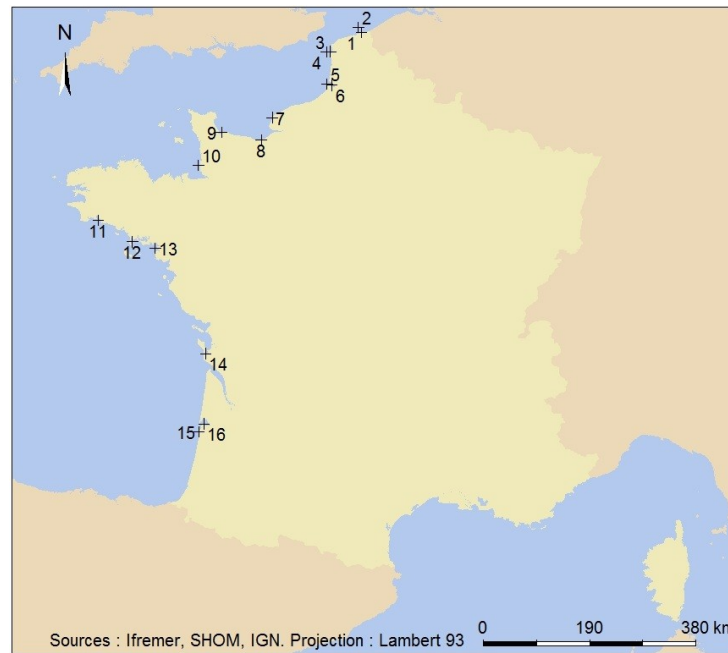


Figure 1. Localisation des lieux de surveillance utilisés dans la présente étude. Le lecteur peut se référer au Tableau 2 pour la correspondance entre les numéros et les libellés des lieux.

La précision de détermination des espèces phytoplanctoniques par microscopie optique dépend :

- de l'avancement des connaissances générales sur la taxinomie des espèces ;
- du niveau de connaissance de l'analyste ;
- des espèces, qui peuvent être morphologiquement similaires ;
- de l'état de conservation des individus lors des dénombrements.

Pour ces raisons, les niveaux taxinomiques obtenus à la suite des dénombrements peuvent varier. Dans cette étude, le niveau taxinomique utilisé correspond au genre, ou ensemble de genres. Ainsi, tous les individus identifiés à un niveau supérieur au genre sont retirés de l'analyse et ceux identifiés à un niveau inférieur sont groupés au niveau du genre.

2.3. Relation avec le spectre d'eutrophisation

Afin de sélectionner le ou les indice(s) le(s) plus sensible(s) aux pressions, les deux critères utilisés par Spatharis et Tsirtsis (2010) sont utilisés : (i) la monotonie, c.-à-d. le comportement continuellement croissant ou décroissant, de la relation entre l'indice et le logarithme de base 10 de l'abondance totale ; (ii) et la linéarité de la relation le long du spectre d'eutrophisation. L'abondance totale étant utilisée ici comme proxy de l'ensemble des pressions liées à l'eutrophisation.

Le critère de monotonie permet d'avoir des limites ordonnées pour les différentes classes de qualité et ainsi de s'affranchir de l'ambiguïté de la correspondance entre la valeur de l'indice et la qualité de l'eau, dans le cas de relations en forme de dôme par exemple. Pour chaque lieu de surveillance et pour chaque indice, la monotonie de la relation entre

l'indice et le logarithme de base 10 de l'abondance totale est vérifiée à l'aide de deux tests, l'un basé sur le calcul du coefficient de corrélation sur les rangs de Spearman (r_s) et l'autre basé sur le calcul du coefficient de corrélation sur les rangs de M.G.Kendall (τ) (Saporta, 2006 section 6.3). Seules les relations pour lesquelles les deux coefficients de corrélation sont significativement différents de 0, au seuil 0.01, sont conservées.

Dans cette étude, le spectre d'eutrophisation est défini comme étant l'étendue d'abondance de 0 à 250 000 cell./L. Cette limite de 250 000 cell./L correspond au seuil de bloom retenu pour les petites cellules, pour la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE (Belin et al., 2014). L'avantage d'obtenir une relation linéaire entre l'indice et le spectre d'eutrophisation est la maximisation des classes de qualité et par conséquent l'obtention de classes bien distinctes. Ainsi, si par exemple la relation présente une asymptote au-delà de 250 000 cell./L, la masse d'eau étant considérée comme en mauvais état, il n'y aura aucune ambiguïté de la valeur de l'indicateur. Pour chaque lieux de surveillance et chaque indice, une régression linéaire a donc été appliquée aux données, en ne prenant en compte que les échantillons dont l'abondance totale est inférieure à 250 000 cell./L. La sélection a ensuite été basée sur : (i) le pourcentage de résidus studentisés, c.-à-d. divisés par l'écart-type, sortant de l'intervalle [-2 ; 2] ; (ii) la valeur du coefficient de corrélation linéaire ; (iii) et la valeur de l'écart-type. Plus le pourcentage de résidus studentisés est faible, plus la condition de linéarité est respectée. De plus, l'indice doit être le moins variable possible. Ainsi, le meilleur indice sera celui avec le plus faible pourcentage de résidus studentisés, le plus fort coefficient de corrélation linéaire et le plus faible écart-type.

3. Résultats

3.1. Données et abondance totale de mars à octobre

Concernant les comptages de flores totales échantillonnées en surface de mars à octobre, sept lieux comportent des séries temporelles longues (Annexe 1, Tableau A.1.1.), c.-à-d. les six lieux les plus au nord de la façade et le lieu « Auger » situé au nord de la Gironde. Le lieu « Auger » correspond au lieu le plus échantillonné, avec 338 échantillons. Les autres lieux comportent des séries plus petites, p. ex. le lieu « Men er Roue » en Baie de Quiberon ou « Teychan bis + Tès » dans le bassin d'Arcachon. Pour les lieux localisés au nord de la façade, de Dunkerque jusqu'au lieu « Bif », entre 60 et 70 % des échantillonnages réalisés durant la saison productive ont lieu de mars à juin (Figure 2). Pour les autres lieux, le pourcentage d'échantillonnage est plus équilibré entre les mois de la saison. Il est à noter que ces séries temporelles concernent les données prélevées en surface seulement. Les différents lieux de surveillance peuvent donc être échantillonnés depuis plus longtemps mais à une autre profondeur. C'est le cas par exemple du lieu « Teychan bis + Tès », pour lequel des prélèvements à mi-profondeur ont lieu depuis 1987 et pour lequel les prélèvements en surface ont commencé pour les besoins de la DCE.

Entre mars et octobre, l'abondance totale de phytoplancton est très variable pour un lieu de surveillance donné et la médiane varie d'un site à l'autre (Figure 3). Les gradients côte-large des couples (« Point 1 Dunkerque », « Point 4 Dunkerque »), (« Point 1 Boulogne », « Point 3 Boulogne ») et (« Bif », « At so ») sont visibles. Globalement, les lieux situés en Manche Est présentent une abondance médiane plus importante, avec « Bif » et « At so » les deux lieux ayant la valeur médiane la plus élevée, c.-à-d. respectivement 1 546 575 et 710 750 cell./L. Les deux abondances médianes les plus faibles correspondent aux lieux « Arcachon – Bouée 7 » et « Donville », avec respectivement 107 980 et 79 900 cell./L. Sur l'ensemble de la façade, sept lieux présentent des abondances médianes supérieures à 250 000 cell./L. Les écarts de médianes entre la Manche et le Golfe de Gascogne sont à relativiser par le léger déséquilibre d'échantillonnage en faveur du printemps pour les lieux localisés en Manche. Cependant, pour ces lieux, un nombre important d'échantillons présente des concentrations supérieures à 10 000 000 cell./L (c.-à-d. une valeur de 7 en échelle log₁₀), sauf pour « Point 3 Boulogne », contrairement aux lieux localisés dans le Golfe de Gascogne.

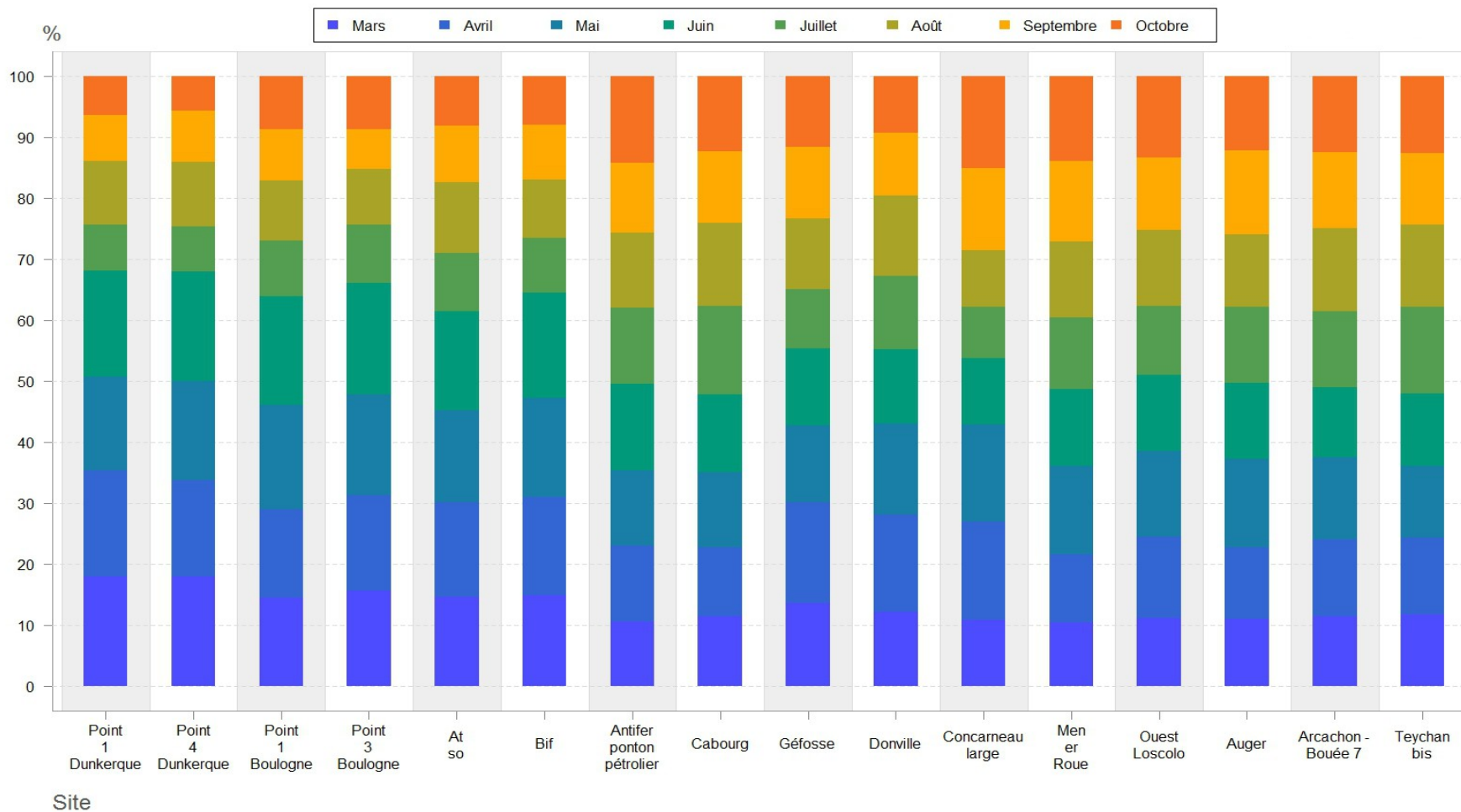


Figure 2. Pourcentage d'échantillons par mois sur l'ensemble de la saison productive, c.-à-d. de mars à octobre, pour chaque lieu de surveillance et sur la période 1992-2014.

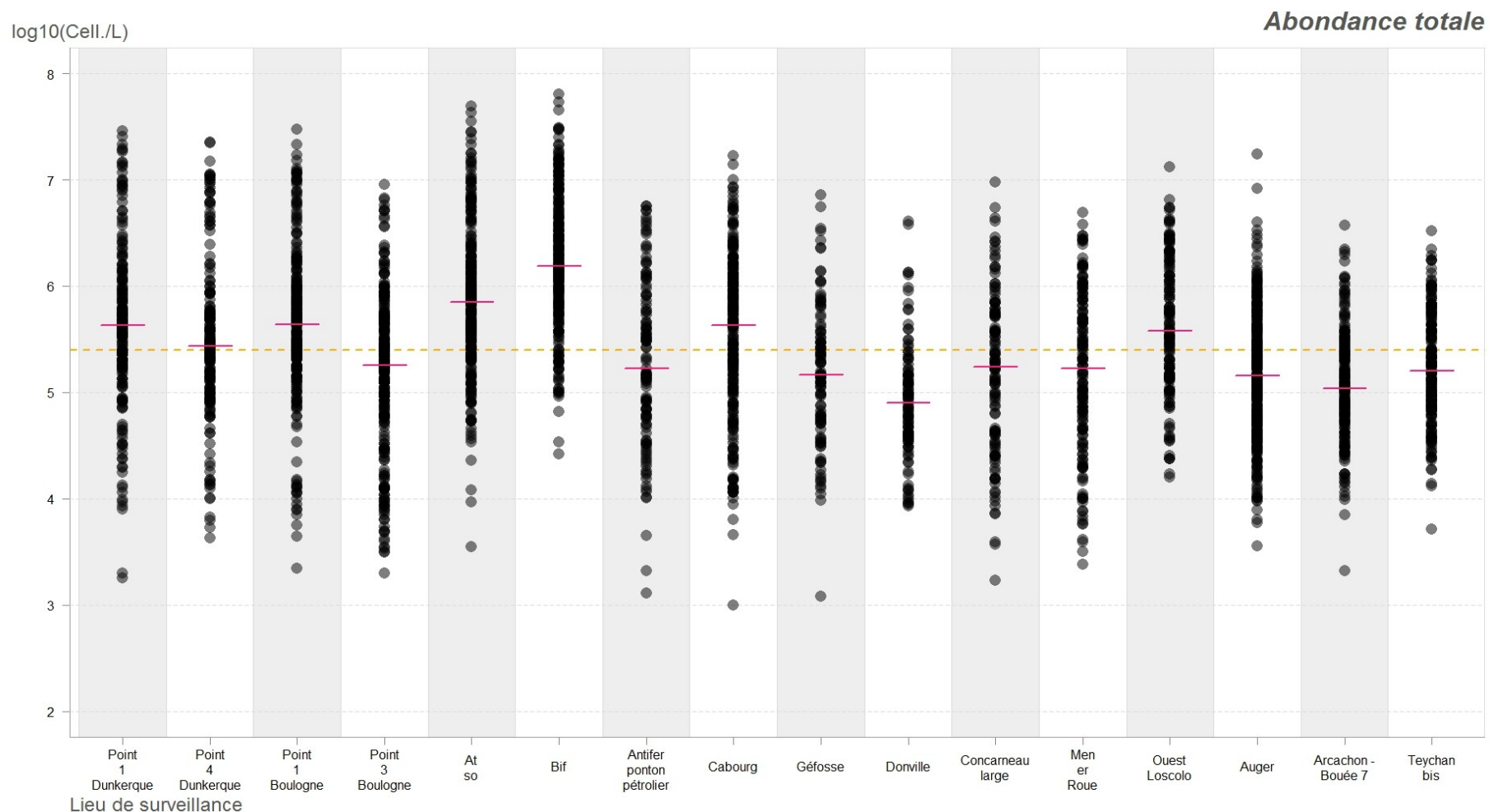


Figure 3. Logarithme de base 10 de l'abondance du phytoplancton en surface, durant la période de mars à octobre, entre 1992 et 2014. Les points représentent l'abondance totale pour chaque échantillon. Les traits roses représentent la médiane pour chaque lieu de surveillance. La ligne pointillée orange représente la limite du spectre d'eutrophisation telle que définie dans cette étude et qui correspond au seuil de bloom pour les cellules de petite taille pour la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE, c.-à-d. 250 000 cell./L (Belin et al., 2014). Note : tous les lieux ne sont pas échantillonnés en surface depuis 1992. La taille de la série temporelle est donc différente entre les différents lieux de surveillance.

3.2. Monotonicité

Pour 19 indices, la relation entre l'indice et l'abondance de phytoplancton est significativement monotone pour les 16 lieux de surveillance (Tableau 3). Parmi eux, les 10 indices ayant la corrélation entre les rangs la plus élevée sont : Odum, Menhinick, Camargo, Sheldon, E3, Pielou, Simpson E, Redundancy, Heip et McNaughton. Les rangs de l'indice E5 sont corrélés négativement avec ceux de l'abondance pour l'ensemble des lieux sauf pour « Antifer ponton pétrolier » ($p\text{-value}(r_s) = 0.13$ et $p\text{-value}(\tau) = 0.11$). Les indices S et Kothe ne présentent pas de corrélation significative sur les rangs avec l'abondance pour les lieux « Point 1 Boulogne », « At so », « Bif » et « Ouest Loscolo ». Concernant l'indice E4, les lieux pour lesquels aucune corrélation sur les rangs n'est significative ne sont pas les mêmes. Il s'agit des lieux : « Point 3 Boulogne », « Gefosse », « Donville », « Concarneau large », « Auger » et « Arcachon – Bouée 7 ». Enfin, la relation entre l'abondance et les indices Margalef et Gleason n'est significativement monotone que pour trois lieux, c.- -d. les lieux « At so », « Bif » et « Antifer ponton pétrolier » pour Margalef ou « Ouest Loscolo » pour Gleason. L'étude de la linéarité de la relation ne sera réalisée que pour les 19 indices présentant une relation significativement monotone avec l'ensemble des 16 lieux de surveillance.

Tableau 3. Corrélations sur les rangs avec l'abondance de phytoplancton pour les 25 indices testés, calculées pour 16 lieux de surveillance répartis sur la façade « Manche-Atlantique ». r_s : coefficient de Spearman. τ : coefficient de M.G.Kendall. La moyenne est calculée sur l'ensemble des relations significativement monotones.

Indice	r_s moyen	τ moyen	Sens de la relation	Nombre de relations significativement monotones
Redundancy	0,73	0,55	Croissante	16
McNaughton	0,62	0,45	Croissante	16
Simpson	0,59	0,42	Croissante	16
Simpson.D	0,59	0,42	Croissante	16
Berger.Parker	0,55	0,40	Croissante	16
S	0,41	0,29	Croissante	12
E4	0,38	0,27	Croissante	10
Margalef	-0,08	-0,06	/	3
Gleason	-0,27	-0,19	Décroissante	3
Kothe	-0,41	-0,29	Décroissante	12
E5	-0,41	-0,29	Décroissante	15
Hill.N2	-0,59	-0,42	Décroissante	16
Hurlbert	-0,59	-0,42	Décroissante	16
McIntosh	-0,59	-0,42	Décroissante	16
Hill.N1	-0,61	-0,44	Décroissante	16
Shannon.H	-0,61	-0,44	Décroissante	16
Shannon.D	-0,62	-0,45	Décroissante	16

Heip	-0,62	-0,44	Décroissante	16
Pielou	-0,73	-0,55	Décroissante	16
Simpson.E	-0,74	-0,54	Décroissante	16
E3	-0,77	-0,58	Décroissante	16
Sheldon	-0,79	-0,60	Décroissante	16
Camargo	-0,82	-0,63	Décroissante	16
Menhinick	-0,90	-0,74	Décroissante	16
Odum	-0,97	-0,88	Décroissante	16

3.3. Linéarité

Le pourcentage moyen de résidus studentisés en dehors de l'intervalle $[-2 ; 2]$ varie de 2.38 à 5.60 (Tableau 4), ce qui reste plutôt faible. Le coefficient de corrélation linéaire moyen varie de 0.07, pour l'indice de Berger-Parker, à 0.73, pour l'indice Odum (Tableau 4). Six indices présentent un coefficient de corrélation linéaire moyen supérieur à 0.5 : Odum, Menhinick, Camargo, Sheldon, E3 et Simpson E. L'écart-type moyen varie de 0.09, pour l'indice Odum, à 0.24, pour l'indice de Berger-Parker (Tableau 4). Les six indices précédents sont également ceux ayant les plus faibles écart-type. Leur évolution en fonction du logarithme de base 10 de l'abondance totale est présentée en Annexe 2.

Tableau 4. Résumé des résultats de l'analyse de la linéarité entre indice et logarithme de base 10 de l'abondance totale de phytoplancton, ordonnés par ordre croissant du pourcentage moyen de résidus studentisés en dehors de l'intervalle $[-2 ; 2]$.

Indice	% moyen de résidus studentisés hors $[-2 ; 2]$	R^2 moyen	Sigma moyen
McNaughton	2.38	0.09	0.24
Berger.Parker	3.66	0.07	0.24
Odum	3.73	0.73	0.09
Sheldon	3.81	0.41	0.16
Heip	3.92	0.07	0.22
Hill.N1	3.95	0.07	0.22
E3	3.98	0.37	0.18
Camargo	3.98	0.44	0.15
Shannon.D	4.09	0.07	0.21
Hill.N2	4.16	0.08	0.22
Shannon.H	4.17	0.07	0.22
McIntosh	4.35	0.08	0.23
Simpson.E	4.42	0.36	0.17
Menhinick	4.67	0.58	0.13
Pielou	5.01	0.23	0.19
Redundancy	5.18	0.23	0.19

Simpson	5.60	0.07	0.22
Simpson.D	5.60	0.07	0.22
Hurlbert	5.60	0.07	0.22

4. Conclusion et discussion

La présente étude a permis de sélectionner six indices : les indices « Odum », « Menhinick », « Camargo », « Sheldon », « E3 » et « Simpson E ». Cinq critères de sélection ont été utilisés :

- la représentativité de l'indice ;
- sa facilité d'analyse ;
- sa comparabilité entre différents lieux géographiques répartis sur l'ensemble de la façade Manche-Atlantique ;
- son lien avec les pressions, au travers de l'étude de la monotonie de la relation indice vs log10 de l'abondance et du coefficient de corrélation linéaire de cette relation ;
- et une variabilité minimale autour de la relation indice vs log10 de l'abondance.

L'abondance totale a été utilisée comme proxy de l'ensemble des pressions liées à l'eutrophisation. Ces résultats sont en cohérence avec les résultats de Spatharis et Tsirtsis (2010), qui supposent que les indices les plus pertinents sont « Menhinick », « Sheldon », « E3 » et « Camargo ».

Une étude descriptive des valeurs des indices en fonction des concentrations en nitrates ou en phosphates, non présentée dans ce rapport, n'a pas montré de relation claire entre indice et nutriments. Toutefois, afin d'appréhender le lien entre indice et sels nutritifs, des calculs de coefficients de corrélation sur les rangs, c.-à-d. de Spearman et de M.G.Kendall, ont été réalisés sur les médianes mensuelles des indices et des concentrations en nutriments, avec différents écarts de temps entre nutriments et indice de composition (Annexe 3). Ces calculs, bien que réalisés dans un but informatif seulement, ont amené à des conclusions cohérentes avec celles apportées par l'étude de la relation indice vs abondance, c.-à-d. les indices les plus pertinents sont « Menhinick », « Odum », « Camargo », « E3 » et « Sheldon ». Cependant, une étude plus approfondie de la relation indice vs pressions, autre que l'abondance totale (p.ex. sels nutritifs, température), au moyen d'autres outils statistiques serait nécessaire pour confirmer la pertinence de ces indices.

Les indices « Odum » et « Menhinick » donnent une mesure de la richesse taxinomique relativement à l'abondance totale. Les indices « Camargo », « Sheldon », « E3 » et « Simpson E » donnent une mesure de l'équilibre entre les différents taxons, c.-à-d. si tous les taxons ont un nombre d'individus similaire ou si un ou quelques taxon(s)

domine(nt). La création d'un indice multi-métriques pourrait permettre d'intégrer ces deux composantes.

Dans ce travail, l'étude a été réalisée à l'échelle des échantillons. Cependant, pour que l'indice soit opérationnel dans le cadre de la DCE, il doit être calculé à l'échelle du plan de gestion, c.-à-d. une valeur (p.ex. maximum, médiane, percentile) doit traduire l'état de la masse d'eau pour un plan de six ans. De plus, dans le cadre de la DCE, cinq classes de qualité et donc quatre frontières doivent être définies. Ainsi, pour que l'indice soit opérationnel dans le cadre de la DCE, des travaux complémentaires relatifs à l'agrégation temporelle des mesures, à la définition des valeurs de référence et par conséquent au calcul des EQR restent à faire, en lien avec les experts thématiques. L'ultime étape étant l'application de l'indice final et de ces règles (c.-à-d. agrégation et seuils) aux données DCE, sur six années, puis la confrontation de ces résultats aux dires d'experts.

5. Bibliographie

- Belin, C., Lamoureux, A., Soudant, D. 2014. Évaluation de la qualité des eaux littorales de la France métropolitaine pour l'élément de qualité Phytoplancton dans le cadre de la DCE. État des lieux des règles d'évaluation, et résultats pour la période 2007-2012. Tome 1 - État des lieux, méthodes et synthèse des résultats. 159 pp.
- Brun, M., Soudant, D. 2015. Synthèse bibliographique relative à la notion d'indicateur dans le contexte de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM). 68 pp. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00247/35858/>
- Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne. 2000. DIRECTIVE 2000/60/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.
- Saporta, G. 2006. Probabilités, analyse des données et statistique. Editions Technip. 656 pp.
- Spatharis, S., Tsirtsis, G. 2010. Ecological quality scales based on phytoplankton for the implementation of Water Framework Directive in the Eastern Mediterranean. Ecol. Indic. 10, 840–847.

*Annexe 1 : bilan de l'échantillonnage réalisé sur
les 16 lieux de surveillance, entre mars et
octobre, en surface, sur la période 1992-2014*

Tableau A.1.1. Années échantillonnées et nombre d'échantillons de flores totales prélevés de mars à octobre et en surface, par lieux de surveillance, identifiés par leur mnémonique. Le lecteur peut se référer au Tableau 2 pour la correspondance entre les mnémoniques et les libellés des lieux.

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Nombre total d'échantillons
001-P-015	7	10	9	7	9	10	7	7	5	3	6	9	8	10	9	11	9	18	9	9	9	9	11	201
001-P-017	7	10	8	6	9	10	6	7	5	3	6	7	8	10	7	9	7	9	9	7	9	9	10	178
002-P-007	11	13	7	10	8	9	11	13	9	12	10	12	12	12	13	17	10	19	12	13	10	11	9	263
002-P-030	10	12	6	10	7	9	11	12	9	8	9	10	12	12	12	15	9	8	11	12	9	8	9	230
006-P-001	14	12	12	11	8	13	12	14	10	12	8	14	8	10	11	13	10	13	12	10	10	11	11	259
007-P-008	12	12	12	11	8	12	11	10	10	10	7	12	9	10	11	14	11	12	12	10	10	11	11	248
010-P-001	1										7	9	9	8	9	8	10	10	9	8	8	8	9	113
010-P-109											16	17	18	13	18	17	18	21	17	15	29	13	16	228
014-P-023											1		9	8	8	9	8	14	12	9	9	8	8	103
018-P-054											7	9	8	8	9	8	8	10	10	8	8	8	6	107
047-P-016													4	5	14	12	13	4	10	16	12	15	14	119
055-P-001	1														13	17	16	15	16	16	16	17	17	144
063-P-002		1				1		1							12	17	16	15	16	17	15	16	16	143
082-P-001				15	20	19	16	16	16	16	16	18	17	14	16	17	17	19	15	16	17	20	18	338
087-P-008												15	16	20	16	17	16	17	17	16	16	17	17	200
088-P-050														2	1		16	17	17	16	16	17	17	119

Annexe 2 : évolution des six indices pré-sélectionnés en fonction du logarithme de base 10 de l'abondance phytoplanctonique.

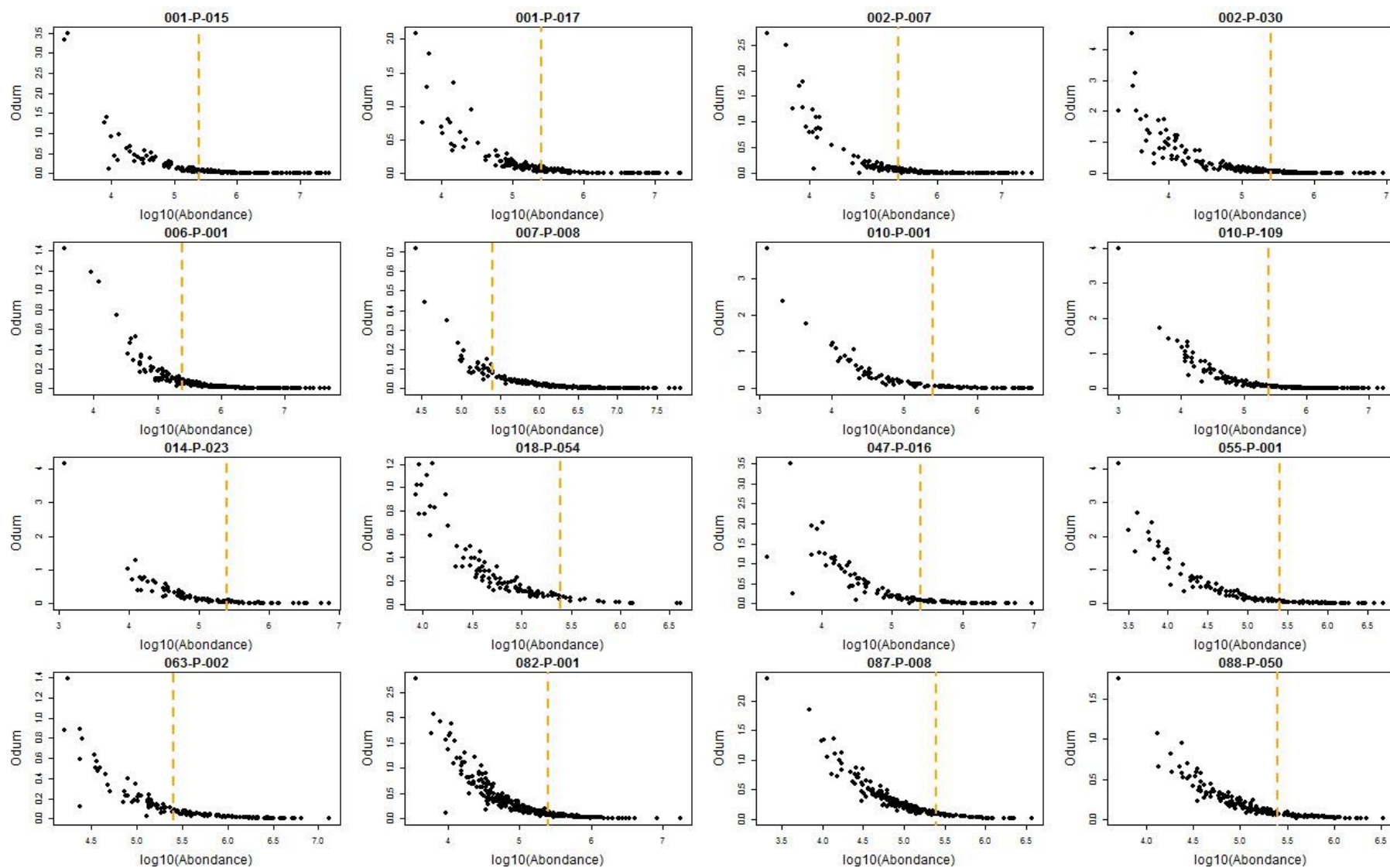


Figure A.2.1. Indice Odum en fonction du logarithme de base 10 de l'abondance en phytoplancton, pour chaque lieu de surveillance. La ligne pointillée orange représente la limite du spectre d'eutrophisation telle que définie dans cette étude et qui correspond au seuil de bloom pour les cellules de petite taille pour la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE, c.-à-d. 250 000 cell./L (Belin et al., 2014).

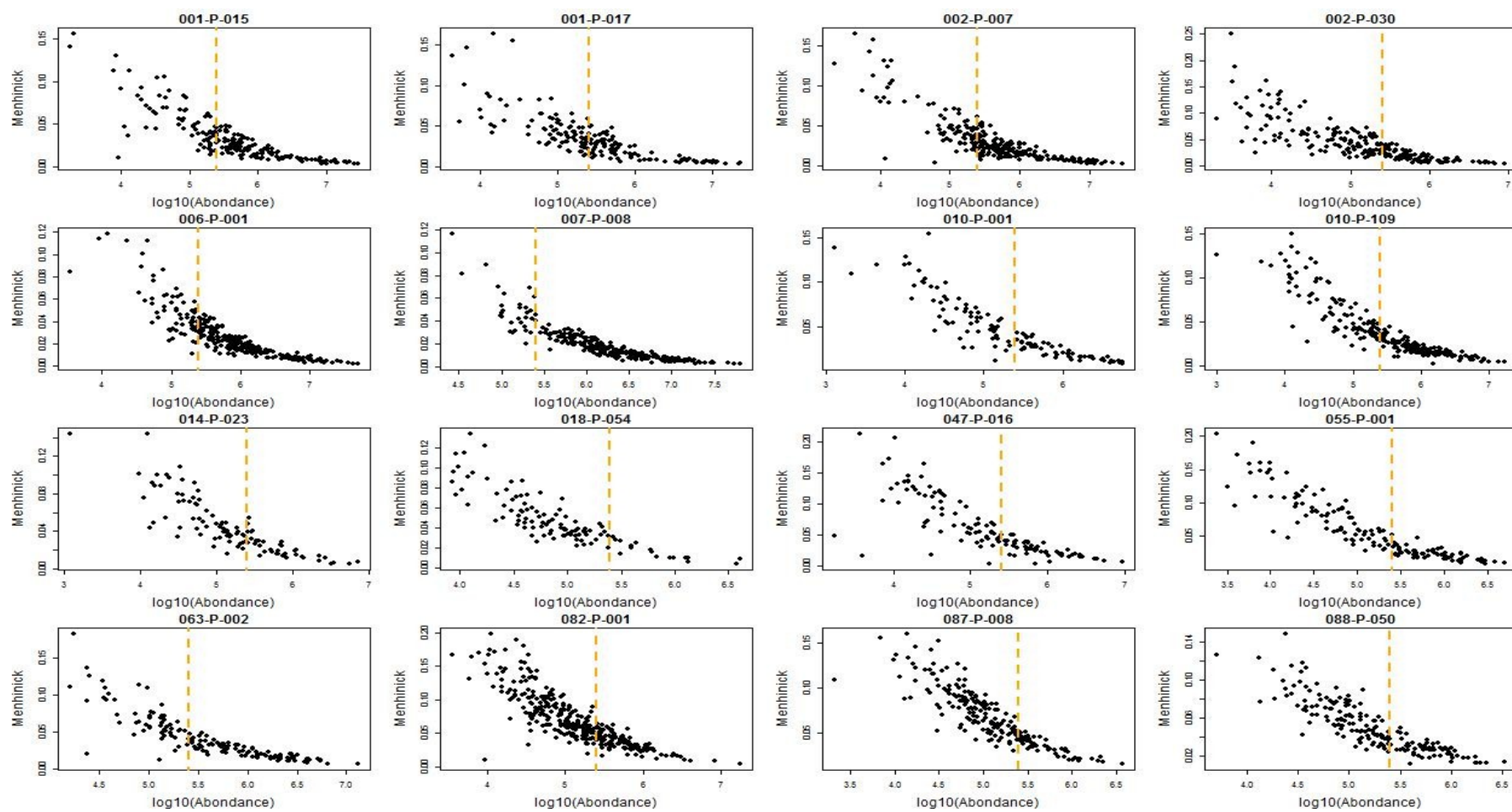


Figure A.2.2. Indice Menhinick en fonction du logarithme de base 10 de l'abondance en phytoplancton, pour chaque lieu de surveillance. La ligne pointillée orange représente la limite du spectre d'eutrophisation telle que définie dans cette étude et qui correspond au seuil de bloom pour les cellules de petite taille pour la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE, c.-à-d. 250 000 cell./L (Belin et al., 2014).

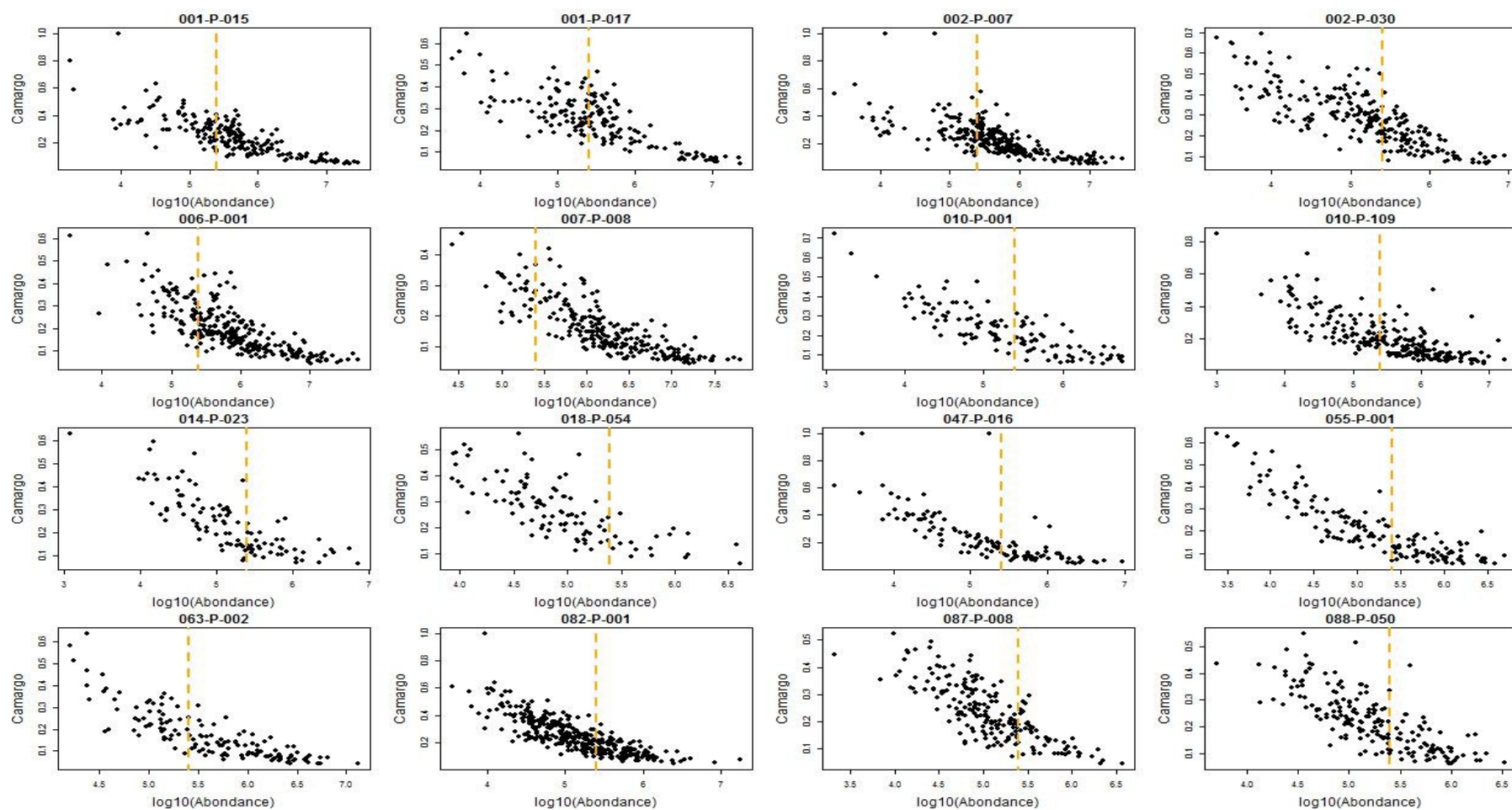


Figure A.2.3. Indice Camargo en fonction du logarithme de base 10 de l'abondance en phytoplancton, pour chaque lieu de surveillance. La ligne pointillée orange représente la limite du spectre d'eutrophisation telle que définie dans cette étude et qui correspond au seuil de bloom pour les cellules de petite taille pour la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE, c.-à-d. 250 000 cell./L (Belin et al., 2014).

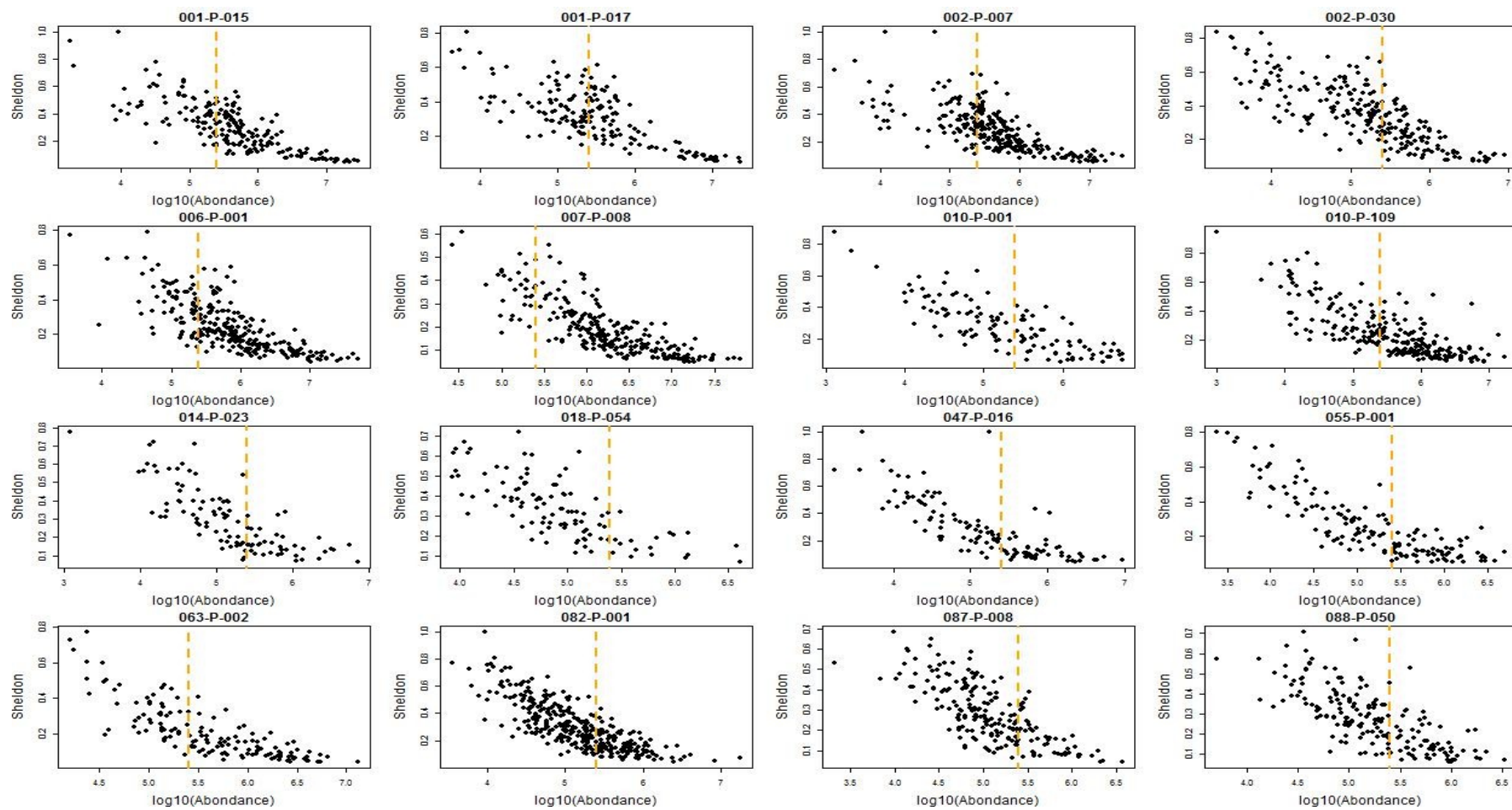


Figure A.2.4. Indice Sheldon en fonction du logarithme de base 10 de l'abondance en phytoplancton, pour chaque lieu de surveillance. La ligne pointillée orange représente la limite du spectre d'eutrophisation telle que définie dans cette étude et qui correspond au seuil de bloom pour les cellules de petite taille pour la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE, c.-à-d. 250 000 cell./L (Belin et al., 2014).

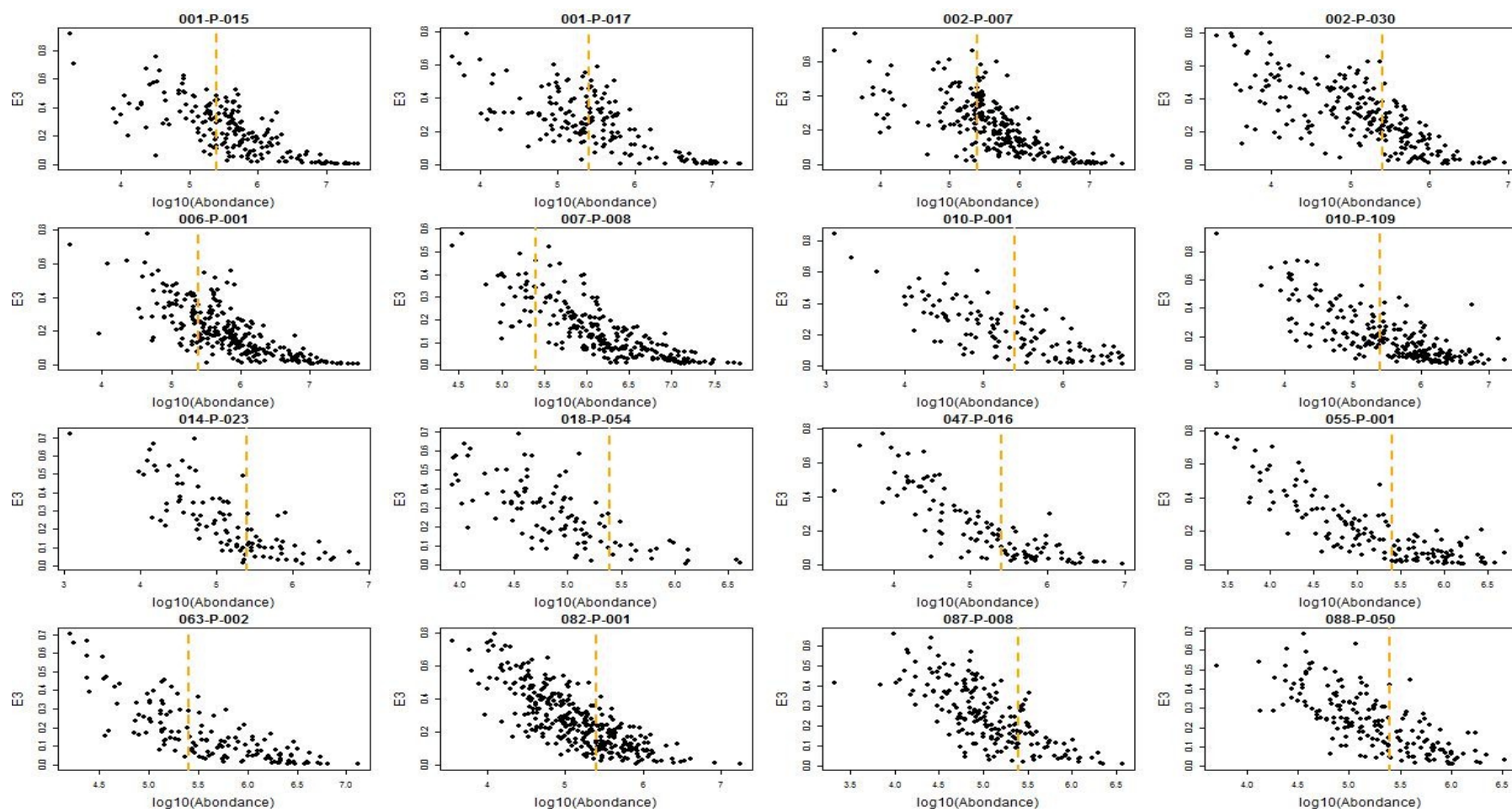


Figure A.2.5. Indice E3 en fonction du logarithme de base 10 de l'abondance en phytoplancton, pour chaque lieu de surveillance. La ligne pointillée orange représente la limite du spectre d'eutrophisation telle que définie dans cette étude et qui correspond au seuil de bloom pour les cellules de petite taille pour la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE, c.-à-d. 250 000 cell./L (Belin et al., 2014).

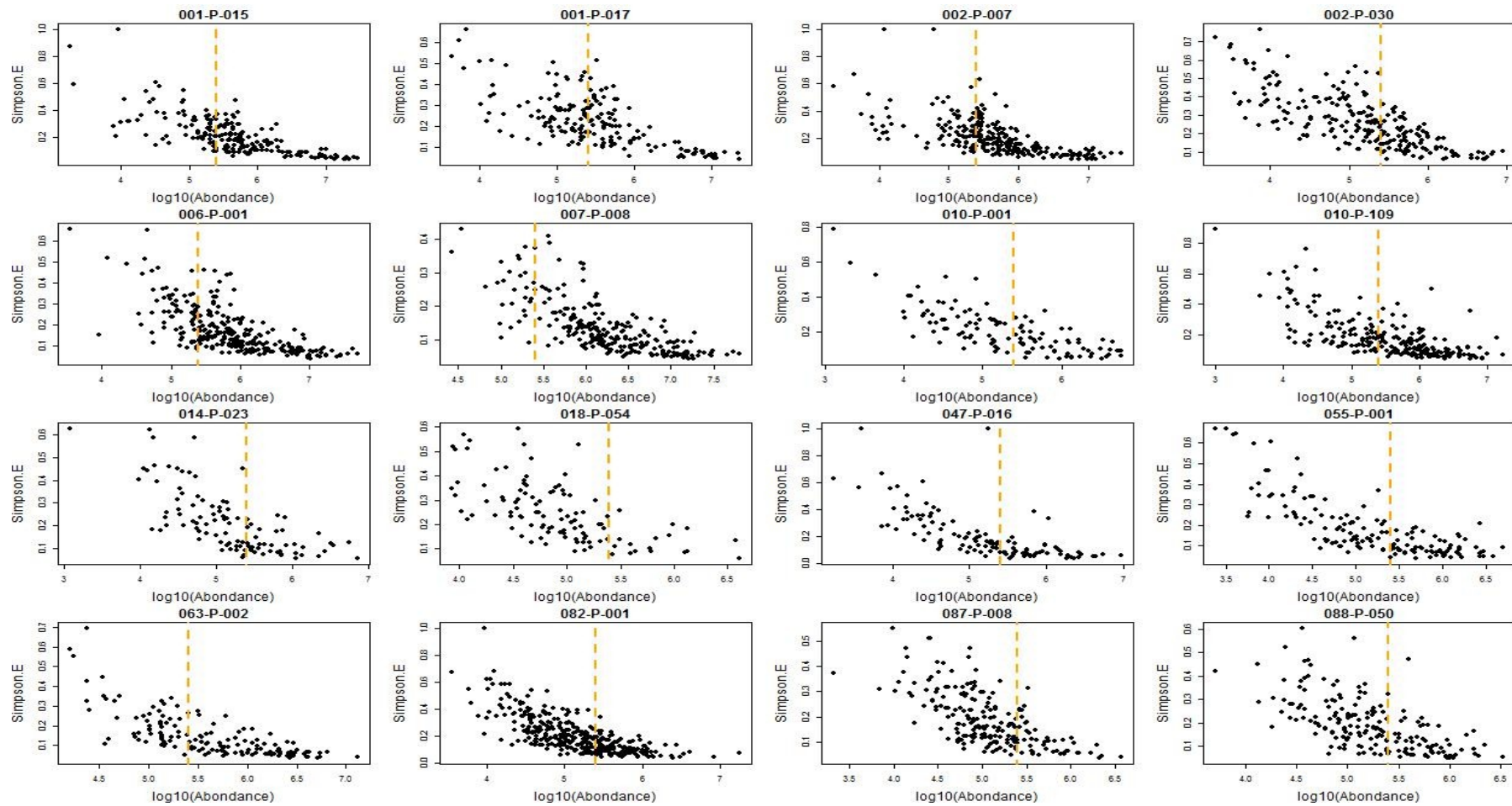


Figure A.2.6. Indice Simpson E en fonction du logarithme de base 10 de l'abondance en phytoplancton, pour chaque lieu de surveillance. La ligne pointillée orange représente la limite du spectre d'eutrophisation telle que définie dans cette étude et qui correspond au seuil de bloom pour les cellules de petite taille pour la façade Manche-Atlantique, dans le cadre de la DCE, c.-à-d. 250 000 cell./L (Belin et al., 2014).

Annexe 3 : relation avec les nutriments

Méthode

Dans le but d'appréhender le lien entre les indices et les pressions anthropiques agissant sur le phénomène d'eutrophisation (c.-à-d. les flux de nutriments), la monotonie de la relation entre les indices et la concentration en nitrates inorganiques (c.-à-d. la somme de NO₂, NO₃ et NH₄), la concentration en phosphates (c.-à-d. PO₄) ou le ratio N/P a également été testée.

Les données utilisées sont issues des réseaux d'observation et de surveillance, opérés par Ifremer, suivants :

- le réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) ;
- le suivi régional des nutriments (SRN) en Artois-Picardie ;
- le réseau hydrologique du littoral Normand (RHLN) ;
- le réseau hydrologique du bassin d'Arcachon (ARCHYD).

Ces données concernent les concentrations en nutriments NO₂, NO₃, NH₄ et PO₄ dans la colonne d'eau, de 1992 à 2014 et en surface, c.-à-d. entre 0 et 1m.

Le phénomène d'eutrophisation n'étant pas seulement influencé par les teneurs en sels nutritifs mais également par d'autres facteurs (p.ex. les conditions hydrodynamiques), l'effet des nutriments sur la production primaire reste complexe. Par conséquent, différents « temps de réponse du phytoplancton » ont été considérés. La monotonie de la relation a été testée entre (*i*) les médianes mensuelles des indices ; (*ii*) et les médianes mensuelles des concentrations en nutriments, mesurées à un laps de temps antérieur plus ou moins important : le même mois, le mois précédent, deux mois avant ou trois mois avant.

Concentrations hivernales en nitrates et phosphates

Dans le but d'avoir une appréciation des teneurs et de la variabilité en nutriments dans les différents lieux de surveillance, les valeurs hivernales, c.-à-d. de décembre à février (période utilisée dans le cadre de la DCE), ainsi que la médiane de ces valeurs par lieu de surveillance sont présentées sur les Figures A.3.1, A.3.2 et A.3.3. Globalement à l'échelle de la façade Manche-Atlantique, un déséquilibre en faveur des nitrates (ratio N/P > 16) apparaît (Figure A.3.3) et les différences de teneurs entre les lieux sont plus marquées pour les nitrates.

En ce qui concerne les nitrates (Figure A.3.1), les lieux présentant les concentrations hivernales les plus importantes correspondent aux lieux localisés autour de la Baie de Somme, de la Baie de Seine et le lieu « Ouest Loscolo » en Baie de Vilaine. Le lieu ayant les concentrations les plus faibles est « Arcachon – Bouée 7 ». Le gradient côte-large se retrouve pour chaque couple de lieux (« Point 1 Dunkerque », « Point 4 Dunkerque »), (« Point 1 Boulogne », « Point 3 Boulogne ») et (« Bif », « At so »). Un gradient est-ouest est visible pour les lieux localisés de part et d'autre de la Baie de Seine et de part et d'autre du département de la Manche, avec les concentrations les plus fortes pour le lieu « Antifer » et les concentrations les plus faibles pour le lieu « Donville ». Ce même

gradient est visible pour les lieux localisés en Bretagne sud, avec une concentration plus importante pour « Ouest Loscolo » et moins importante pour « Concarneau large ». Globalement, la variabilité des concentrations hivernales semble plus importante pour les lieux localisés dans le Golfe de Gascogne.

En ce qui concerne les phosphates (Figure A.3.2), les concentrations hivernales sont similaires pour les lieux localisés le plus au Nord de la façade, c.-à-d. de Dunkerque à la Baie de Somme. Les mêmes gradients est-ouest que pour les nitrates sont visibles pour les phosphates. Les concentrations sont globalement plus élevées dans la Manche. Les deux lieux présentant les concentrations en phosphates les plus faibles sont « Arcachon – Bouée 7 » et « Teychan bis + Tès ».

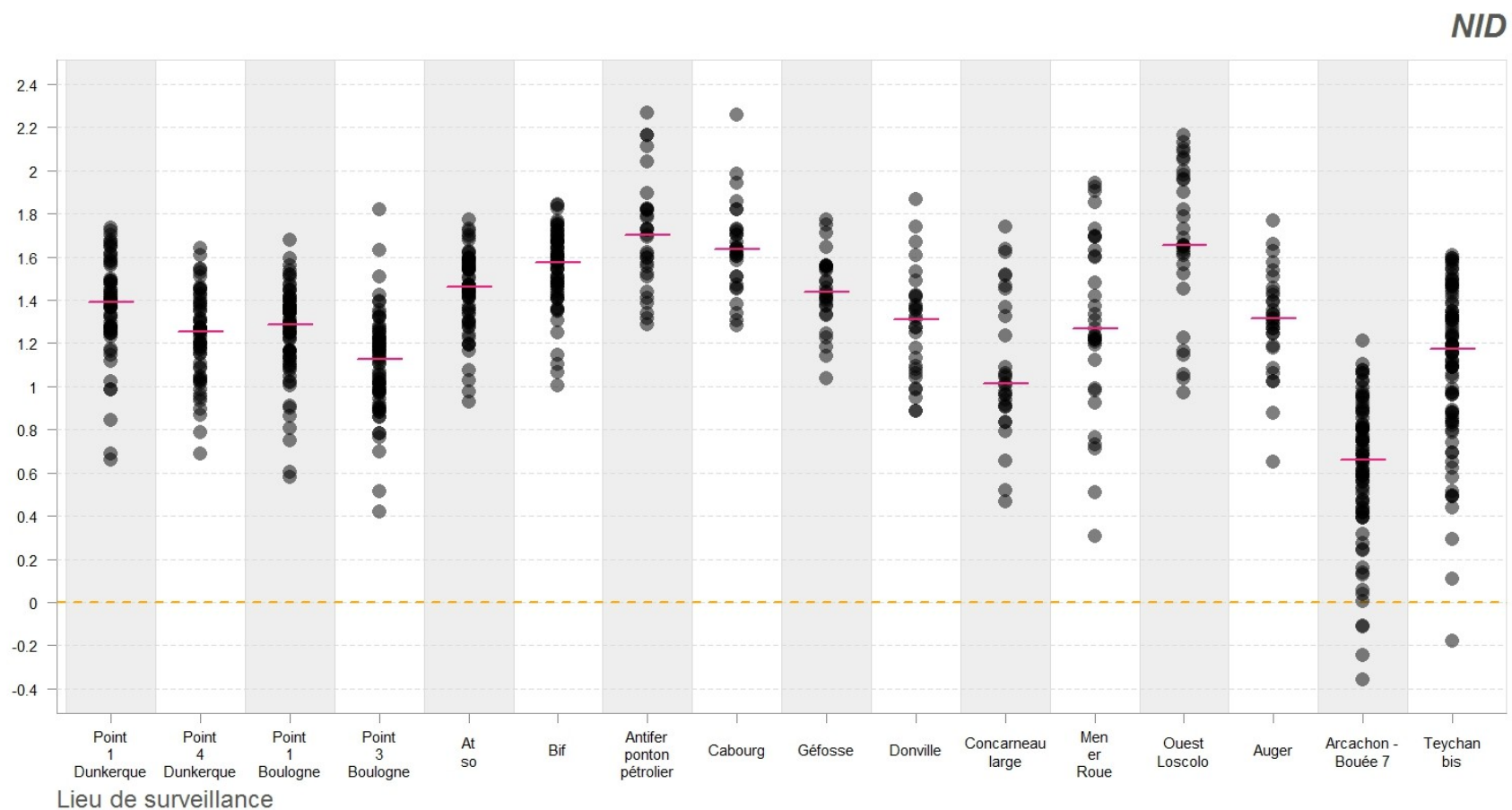


Figure A.3.1. Logarithme de base 10 de la concentration en nitrates en $\mu\text{mol/L}$ (c.-à-d. $\text{NO}_2 + \text{NO}_3 + \text{NH}_4$) en surface, durant la période de novembre à février, mesurée entre 1992 et 2014. Les points représentent la concentration pour chaque échantillon. Les traits roses représentent la médiane pour chaque lieu de surveillance. La ligne pointillée orange représente la valeur pour laquelle le milieu est considéré comme limité en nitrates. Note : tous les lieux ne sont pas échantillonnés en surface depuis 1992. La taille de la série temporelle est donc différente entre les différents lieux de surveillance.

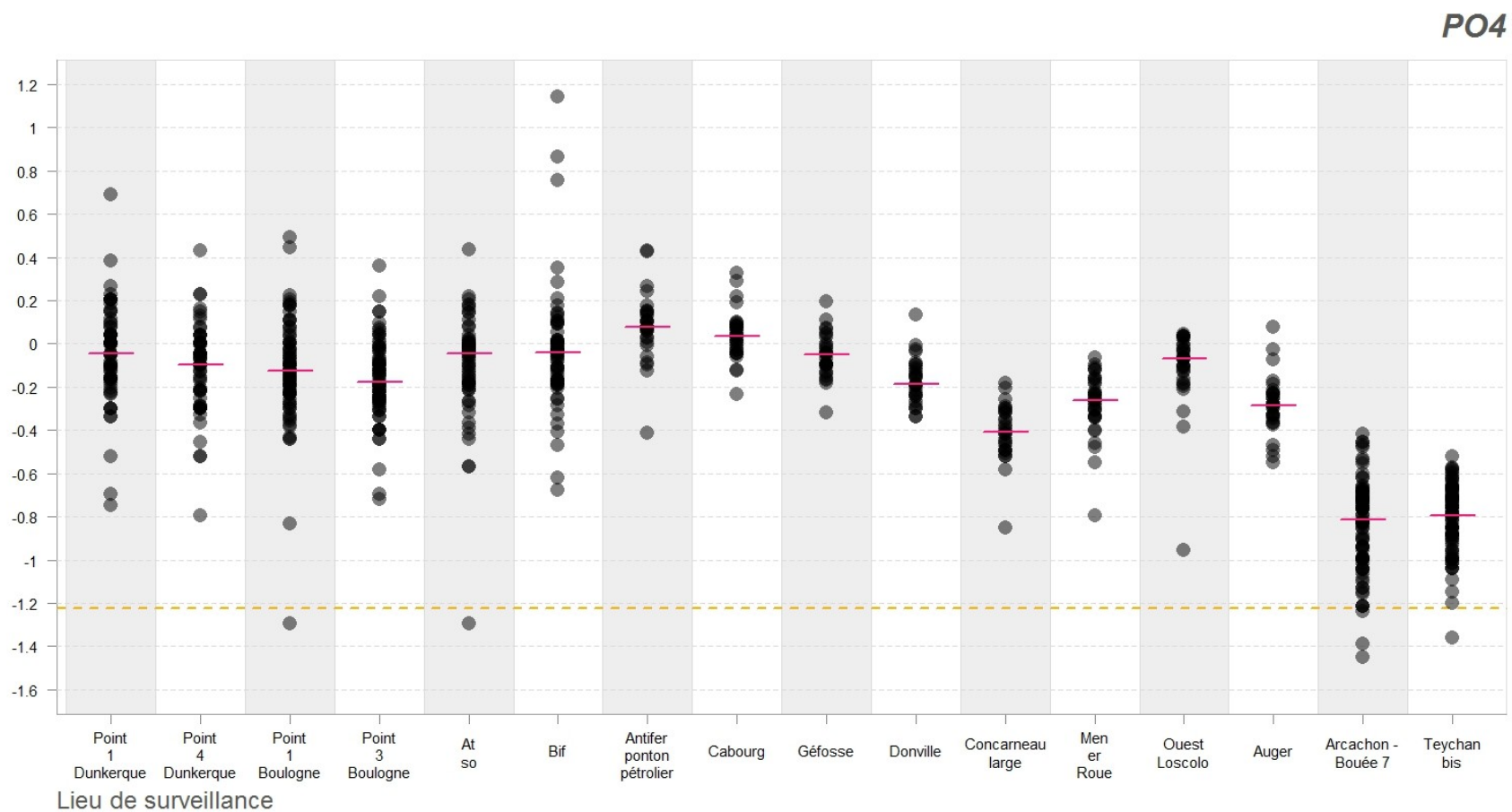


Figure A.3.2. Logarithme de base 10 de la concentration en phosphates en $\mu\text{mol/L}$ (c.-à-d. PO4) en surface, durant la période de novembre à février, mesurée entre 1992 et 2014. Les points représentent la concentration pour chaque échantillon. Les traits roses représentent la médiane pour chaque lieu de surveillance. La ligne pointillée orange représente la valeur pour laquelle le milieu est considéré comme limité en phosphates. Note : tous les lieux ne sont pas échantillonnés en surface depuis 1992. La taille de la série temporelle est donc différente entre les différents lieux de surveillance.

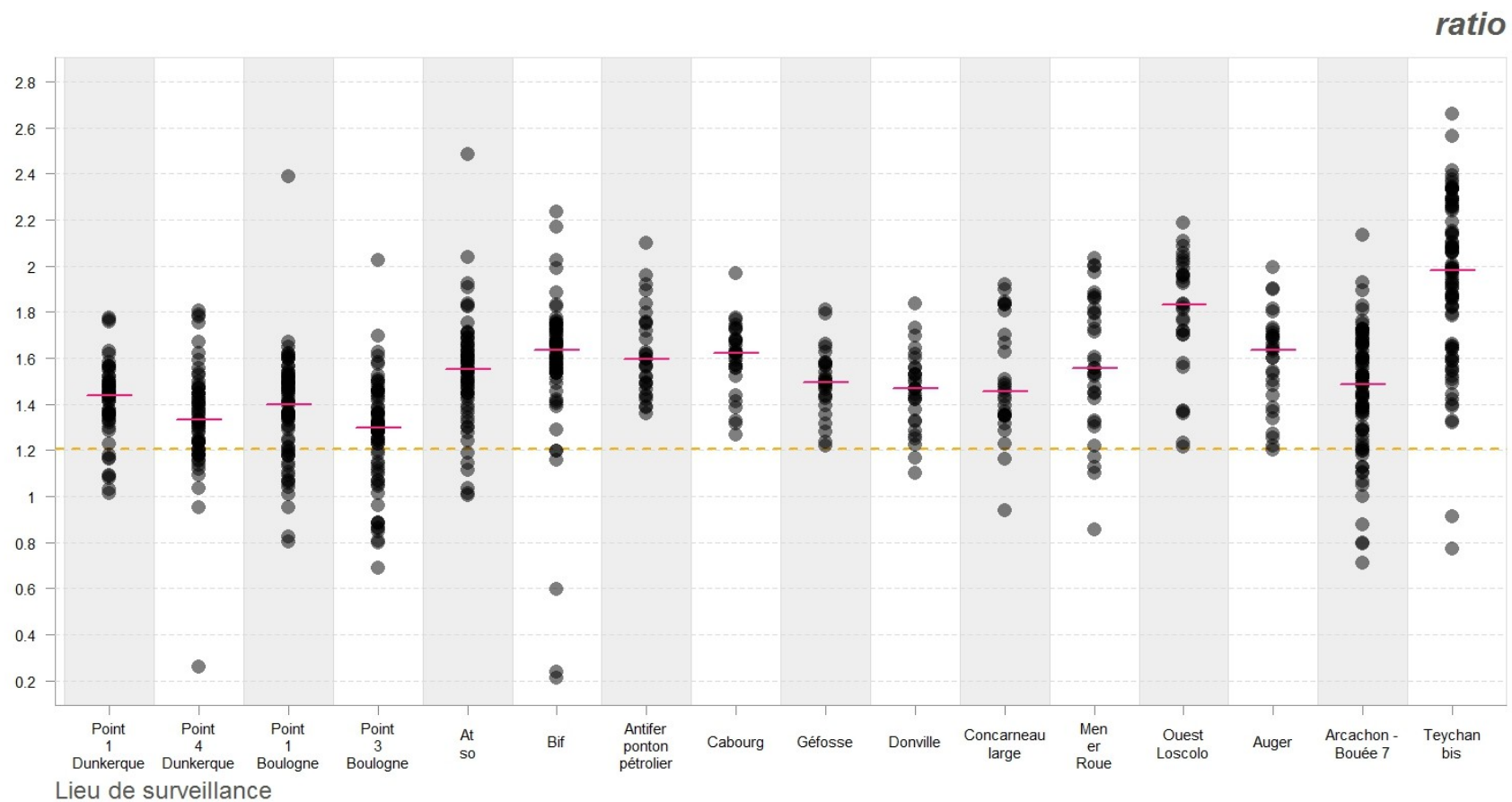


Figure A.3.3. Logarithme de base 10 du ratio nitrates/phosphates en surface, durant la période de novembre à février, mesurée entre 1992 et 2014. Les points représentent la valeur pour chaque échantillon. Les traits roses représentent la médiane pour chaque lieu de surveillance. La ligne pointillée orange représente la valeur pour laquelle un déséquilibre apparaît entre nitrates et phosphates. Note : tous les lieux ne sont pas échantillonnés en surface depuis 1992. La taille de la série temporelle est donc différente entre les différents lieux de surveillance.

Monotonie

L'étude descriptive des valeurs des indices en fonction des concentrations en nutriments ne montre pas de relation claire. Cependant, le calcul des coefficients de corrélation sur les rangs, c.-à-d. de Spearman et de M.G.Kendall, amène à des conclusions cohérentes avec les conclusions précédentes sur les indices les plus pertinents. C'est pourquoi, seules les conclusions générales de ces calculs sont présentées ici et elles doivent être considérées comme descriptives.

Les relations entre les indices et les nutriments sont significativement monotones dans un plus grand nombre de cas pour les lieux de surveillance localisés dans la Manche, c.-à-d. de Dunkerque jusqu'au lieu « Donville ». En ce qui concerne plus particulièrement les nitrates, les meilleurs coefficients de corrélation sur les rangs sont obtenus, dans la majorité des cas, lorsqu'un laps de temps de trois mois est considéré entre la concentration en nutriments et la composition phytoplanctonique. Les indices « Menhinick » et « Odum » sont ceux qui présentent une relation significativement monotone avec les nitrates dans la majorité des lieux, c.-à-d. respectivement 12 et 13 lieux. L'indice « Menhinick » est par ailleurs l'indice qui présente le plus grand coefficient de corrélation dans un maximum de lieux de surveillance, c.-à-d. les lieux « Point 1 Boulogne », « At so », « Donville » et « Men er Roue ». Les indices « E4 » et « E5 » sont les indices présentant des relations significativement monotones avec les nitrates pour le minimum de lieux, c.-à-d. huit lieux.

En ce qui concerne les concentrations en phosphates, le laps de temps pour lequel les meilleurs coefficients de corrélation sont obtenus avec la composition phytoplanctonique est variable. D'une manière générale, les coefficients de corrélation sont plus faibles que pour les nitrates. Les indices pour lesquels la relation est significativement monotone pour un maximum de lieux sont « Odum » (12 lieux) ainsi que « Camargo », « E3 », « Menhinick » et « Sheldon » (11 lieux). Les indices « S », « Hurlbert », « McIntosh », « Simpson », « Simpson D » et « Kothe » (8 lieux) ainsi que l'indice « E5 » (5 lieux) sont les indices présentant des relations significativement monotones avec les phosphates pour un minimum de lieux.

Dans le cas du ratio N/P, c'est l'indice « Menhinick » qui présente une relation significativement monotone pour la majorité des lieux, c.-à-d. 13 lieux, alors que pour les indices « E4 » et « E5 » la relation est significativement monotone pour 6 lieux seulement. Comme pour les phosphates, le laps de temps pour lequel les meilleurs coefficients de corrélation sont obtenus avec la composition phytoplanctonique est variable et la valeur des coefficients de corrélation est plus faible.

Au final, les indices présentant une relation significativement monotone avec les phosphates, les nitrates ou le ratio N/P pour un maximum de lieux de surveillance sont les indices « Odum » (14 lieux) et « Menhinick » (13 lieux).