



Observation et Surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie en France métropolitaine, dans le cadre du REPHY et des réseaux régionaux SRN, RHLN, ARCHYD et RSLHYD.

Etat des lieux octobre 2016. **Tome 1**

Décembre 2016

Observation et Surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie en France métropolitaine, dans le cadre du REPHY et des réseaux régionaux SRN, RHLN, ARCHYD et RSLHYD.

Etat des lieux octobre 2016. Tome 1

Auteur : Catherine BELIN (catherine.belin@ifremer.fr)

Contributeurs et/ou relecteurs (Tomes 1 ou 2) :

Les responsables et correspondants du REPHY et des réseaux régionaux des LERs

Nadine Neaud-Masson, assistante coordination REPHY (Ifremer)

Les experts sollicités chacun pour leur domaine, en particulier Anne Daniel, Luis Lampert, Mathilde Schapira (Ifremer)

Ce document est constitué de deux tomes :

Le tome 1 (le présent document) présente la nouvelle configuration du REPHY, l'historique et les principes de l'optimisation de la surveillance, une revue des paramètres mesurés, ainsi que les perspectives d'évolution.

Le tome 2 détaille les lieux de prélèvement du REPHY et des réseaux régionaux, avec des fiches par lieu et une cartographie simplifiée.

Sommaire

Préambule	5
Objet.....	5
Introduction.....	6
REPHY	6
REPHY Observation.....	6
REPHY Surveillance	7
REPHY strictement Sanitaire	8
Réseaux régionaux	8
Etat des lieux début octobre 2016	9
Addendum 26 octobre 2016	13
Principes et historique de l'optimisation de la surveillance phytoplancton-hydrologie	13
Cas particulier des séries de données flore totale	14
Requalification et fermetures de lieux.....	16
Conclusion et problèmes restant à régler	18
Couverture insuffisante pour la DCE en eaux côtières méditerranéennes.....	18
Points communs REPHY – SOMLIT.....	20
Paramètres historiquement mesurés en accompagnement du phytoplancton.....	21
Nutriments	21
Historique et contexte.....	21
Modifications mises en œuvre en 2016.....	22
Modifications et améliorations éventuelles à prévoir	22
Conclusion	23
Chlorophylle	23
Historique et contexte.....	23
Modifications mises en œuvre en 2016.....	24
Modifications et améliorations éventuelles à prévoir	24
Conclusion	24
Paramètres physico-chimiques	25
Historique et contexte.....	25
Modifications mises en œuvre en 2016.....	25
Modifications et améliorations éventuelles à prévoir	26
Cas particulier du pH	26
Nouvelles méthodes d'observation et d'analyse du phytoplancton	26
Analyses pigmentaires.....	27
Introduction : informations fournies par Luis Lampert.....	27

Mise en œuvre en 2016.....	27
Bancarisation des résultats.....	28
Conclusion	28
Cytométrie en flux.....	29
Introduction : informations fournies par Mathilde Schapira	29
Mise en œuvre en 2016.....	29
Perspectives.....	30
Bancarisation des résultats.....	30
Conclusion	31
FlowCAM /ZooPhytoImage	31
Informations extraites des trois livrables fournis en février 2016, dans le cadre de l'action n° 9 de la convention ONEMA 2015	32
Conclusion	33
Biodiversité génétique	34
Informations extraites du livrable 1 fourni en février 2016, dans le cadre de l'action n° 3 de la convention ONEMA 2015	34
Conclusion	35
Biomasses phytoplanctoniques en carbone.....	35
Conclusion sur les nouvelles méthodes	35
Conclusion générale	35
Bibliographie	37
Annexe 1 : Sigles et acronymes	41
Annexe 2 : Récapitulatif de l'optimisation de la surveillance Phytoplancton et Hydrologie en 2014 et 2015.....	44
Elaboration de la liste des lieux retenus	44
Critères de choix.....	44
Annexe 2 bis. Rang des séries chlorophylle-a – Travaux Dominique Soudant.....	46
Annexe 2 ter. Rang des séries Flores Totales et Flores Indicatrices – Travaux Tania Hernández-Fariñas	47
Annexe 3 : Bancarisation	48
Paramètres historiquement mesurés.....	48
Nutriments	49
Chlorophylle	50
Paramètres physico-chimiques.....	51
Annexe 4 : Référentiel Quadrigé existant pour les analyses pigmentaires.....	52
Annexe 5. Référentiel Quadrigé existant pour les analyses de cytométrie en flux	54

Liste des figures

Figure 1. Appartenance des lieux aux composantes du REPHY et/ou à un réseau régional, avec : Lieux REPHY Observation, Lieux REPHY Surveillance, Lieux REPHY sanitaire, Lieux Réseaux régionaux.

Figure 2. Carte des lieux REPHY pour lesquels les séries de données en phytoplancton total ont été pérennisées (séries actives) ou bien fermées. Carte présentée au colloque LITEAU, Brest, janvier 2016.

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différentes typologies de lieux du REPHY et des réseaux régionaux, avec leurs associations aux stratégies et au paramètre phytoplancton.

Tableau 2. Détails en nombre de points, des associations entre les différentes catégories de lieux utilisés pour la surveillance phytoplancton – hydrologie.

Tableau 3. Etat des séries de données phytoplancton total du REPHY, du SRN et du RHLN.

Tableau 4. Distribution des lieux REPHY par catégorie, et comparaison entre fin 2013 et mi 2016.

Tableau 5. Masses d'eau officiellement désignées pour le contrôle de surveillance DCE dans les eaux côtières de Méditerranée, ne possédant pas de point de suivi dans la masse d'eau.

Préambule

L'observation et la surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie dans les eaux littorales françaises sont assurées à Ifremer par le REPHY sur l'ensemble du littoral, celui-ci étant complété dans certaines régions par des réseaux régionaux.

Jusqu'en 2015, le REPHY recouvrait également la surveillance des phycotoxines dans les coquillages. En 2016, cette composante est séparée du REPHY et forme un nouveau réseau : le REPHYTOX. Les nouveaux libellés des deux réseaux nationaux sont désormais :

- REPHY : Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie dans les eaux littorales
- REPHYTOX : Réseau de Surveillance des Phycotoxines dans les organismes marins

Les réseaux régionaux complémentaires du REPHY sont les suivants :

- SRN Suivi Régional des Nutriments, en Artois Picardie
- RHLN Réseau Hydrologique du Littoral Normand
- ARCHYD Arcachon Hydrologie
- RSLHYD/OBSLAG Observatoire Lagunes en Méditerranée

Le présent document ne traite pas du REPHYTOX, décrit dans d'autres documents (cf. Cahier de Procédures REPHYTOX : Neaud-Masson & Belin, 2016). Les liens entre REPHY et REPHYTOX sont cependant importants, du fait que la surveillance du phytoplancton toxique est toujours assurée par le REPHY.

Les sigles et acronymes sont explicités dans l'**annexe 1**.

Objet

Le présent document décrit le format pour 2016 de l'observation et de la surveillance du phytoplancton et des paramètres hydrologiques associés, dans le cadre des réseaux REPHY, SRN, RHLN, ARCHYD et RSLHYD. Il retrace l'historique de la restructuration du REPHY, qui a abouti à la définition des trois composantes (observation, surveillance, sanitaire), qui sont ici détaillées. Il traite également de la complémentarité du REPHY et des réseaux régionaux. Il fait un examen des paramètres mesurés et des modifications ou améliorations souhaitables. Enfin il décrit les nouveaux paramètres et les nouvelles méthodes envisageables.

Un inventaire des lieux d'échantillonnage, ainsi qu'une cartographie simplifiée sont disponibles dans le tome 2 du document.

Les procédures et la mise en œuvre opérationnelle du REPHY sont décrites dans le Cahier des Procédures REPHY (Belin & Neaud-Masson, en cours)

Introduction

Le REPHY est désormais constitué de trois composantes :

- Le Réseau d'Observation, qui a pour objectif de répondre à des questions de recherche, et dont une partie fait l'objet d'une demande de labellisation. Ses principales caractéristiques sont : une fréquence d'échantillonnage élevée, et de nombreux paramètres mesurés dont le phytoplancton total c'est-à-dire tous les taxons identifiables au microscope optique
- Le Réseau de Surveillance, qui complète le réseau d'Observation pour répondre aux directives européennes (DCE et DCSMM) pour le phytoplancton et l'hydrologie, le nombre de lieux du REPHY Observation n'étant pas suffisant pour couvrir toutes les masses d'eau requises par la DCE. Ses contraintes sont moindres : fréquence d'échantillonnage plus basse, et observation du phytoplancton allégée
- La composante sanitaire, avec l'observation du phytoplancton toxique strictement, accompagnée de quelques paramètres physico-chimiques de base

REPHY

Chacune des composantes du REPHY est associée à une stratégie précise pour ce qui concerne les observations du phytoplancton : Phytoplancton Total, Phytoplancton Indicateur, Phytoplancton Toxique. Elles sont détaillées ci-dessous. Deux autres stratégies sont applicables dans le cadre du REPHY Surveillance et détaillées dans le paragraphe concerné : une spécifique aux lagunes, une autre spécifique aux eaux de transition de Manche-Atlantique.

Les stratégies d'échantillonnage étant déterminantes pour les saisies de données dans la base de données Quadrigé, les termes utilisés ci-dessous correspondent au vocabulaire Quadrigé.

REPHY Observation

La stratégie **Phytoplancton Total (PhyTot)** est obligatoirement appliquée aux lieux du REPHY Observation. Elle a pour objectif principal de donner la possibilité de répondre à des questions scientifiques cruciales telles que celles relatives à (i) l'évolution de la biodiversité à l'échelle de la communauté en fonction des variations environnementales, (ii) la phénologie des espèces et leur cycle de vie, (iii) l'estimation de leur niche écologique. Cette stratégie exige l'acquisition et le maintien de séries temporelles de données à une fréquence régulière et soutenue (une fois par quinzaine), toute l'année.

Les observations phytoplanctoniques effectuées sur les lieux à stratégie PhyTot doivent être des **flores totales**, c'est à dire l'identification et le dénombrement de l'ensemble des taxons reconnaissables dans les conditions d'observation. Les flores totales sont obligatoirement accompagnées des mesures suivantes : chlorophylle-a, mesures physico-chimiques (température, salinité, turbidité, oxygène dissous), nutriments. Sur certains points, des mesures de pigments sont également réalisées depuis 2016 (voir chapitre nouvelles méthodes)

Une partie des séries temporelles de données phytoplancton appartenant à des lieux du REPHY Observation a fait l'objet d'une demande de labellisation nationale à la CSOA-INSU en 2015. La recommandation donnée à cette occasion pour un rapprochement avec la composante phytoplancton du SOMLIT-RESOMAR a conduit à faire en 2016 une demande commune REPHY - SOMLIT de labellisation d'un Observatoire du phytoplancton dans les eaux littorales : cette demande est en cours dans le cadre de l'IR ILICO (Infrastructure de Recherche Littorale et Côtière). A noter que dans plusieurs cas, les séries de données acquises sur des lieux actuellement actifs peuvent être associées aux séries acquises sur des lieux proches mais désormais inactifs, quand les séries ainsi associées ont été jugées compatibles et similaires (Hernández-Fariñas, 2015) : cf. le tome 2, dans lequel ces associations sont décrites.

Les résultats des flores totales contenant obligatoirement les espèces toxiques, sont utilisés aussi pour le suivi sanitaire. Selon les lieux et dans quelques cas (détaillés dans le catalogue des lieux du tome 2), les lieux du REPHY Observation peuvent faire l'objet d'un échantillonnage supplémentaire dont l'objectif est purement sanitaire, par exemple une fois par semaine pendant les épisodes toxiques : dans ce cas les observations supplémentaires (en plus de celles faites toutes les quinze jours) sont des flores simplifiées (flores toxiques : voir plus bas).

REPHY Surveillance

La stratégie **Phytoplancton Indicateur (PhyInd)** est appliquée aux lieux du REPHY Surveillance n'appartenant pas au REPHY Observation, et désignés pour répondre à la DCE d'un point de vue **Phytoplancton et Hydrologie**. Elle a deux objectifs principaux : (i) donner la possibilité de calculer des indicateurs, par exemple l'indice d'abondance pour l'élément de qualité phytoplancton au sens de la DCE, (ii) participer à la veille sur les espèces toxiques (pour l'homme et la faune marine). Cette stratégie exige l'acquisition de données à une fréquence régulière, toutefois moins soutenue que celle exigée pour la stratégie PhyTot : par exemple, une fois par mois suffit pour les exigences DCE.

Les observations phytoplanctoniques effectuées sur les lieux à stratégie PhyInd sont des **flores indicatrices**, c'est-à-dire l'identification et le dénombrement d'une liste ciblée de taxons, dont ceux en concentration importante (au-delà de 100 000 cellules par litre), et ceux qui sont avérés toxiques. Les flores indicatrices sont obligatoirement accompagnées des mesures suivantes : chlorophylle-a, mesures physico-chimiques (température, salinité, turbidité, oxygène dissous), nutriments. Pour certains de ces paramètres les mesures sont faites sur des périodes qui ne couvrent pas obligatoirement toute l'année.

Les résultats des flores indicatrices contenant obligatoirement les espèces toxiques, sont utilisés aussi pour le suivi sanitaire. Selon les lieux et dans quelques cas (détaillés dans le catalogue des lieux du tome 2), les lieux du REPHY Surveillance peuvent faire l'objet d'un échantillonnage supplémentaire dont l'objectif est purement sanitaire, par exemple une fois par semaine pendant les épisodes toxiques : dans ce cas les observations supplémentaires (en plus de celles faites tous les mois) sont des flores simplifiées (flores toxiques : voir plus bas).

Dans le cadre du REPHY Surveillance, deux stratégies supplémentaires sont adaptées à des cas spécifiques :

- **stratégie Lagunes** : dans les lagunes méditerranéennes, le phytoplancton n'est pas évalué pour la DCE par des observations microscopiques, mais par des mesures de cytométrie en flux, qui ciblent le nano et le pico-phytoplancton, dominants dans ces écosystèmes. Ces mesures sont systématiquement accompagnées des mesures suivantes : chlorophylle-a, mesures physico-chimiques (température, salinité, turbidité, oxygène dissous). Les mesures sont faites seulement une fois par mois, de juin à août.
- **stratégie Hydrologie** : dans certaines eaux de transition en Manche Atlantique, le phytoplancton et la chlorophylle ne sont pas mesurés car l'évaluation du phytoplancton n'est pas jugée pertinente pour différentes raisons (voir plus loin). Ces lieux sont cependant échantillonnés pour les mesures suivantes : physico-chimie (température, salinité, turbidité, oxygène dissous), nutriments.

REPHY strictement Sanitaire

La stratégie **Phytoplancton Toxique (PhyTox)** est appliquée aux lieux du REPHY Sanitaire. Elle a pour objectif unique l'acquisition ponctuelle de données sur les espèces toxiques, dans un contexte de risque de contamination des coquillages par des phycotoxines. Les lieux concernés par cette stratégie sont échantillonnés, soit de façon épisodique, soit de façon régulière (toute l'année ou sur une période limitée selon les cas). Quand ces lieux sont échantillonnés, ils le sont obligatoirement une fois par semaine.

Les observations phytoplanctoniques effectuées sur les lieux à stratégie PhyTox sont des **flores toxiques**, c'est-à-dire l'identification et le dénombrement des seuls taxons toxiques. Les flores toxiques sont accompagnées seulement de mesures physico-chimiques de base (température et salinité généralement).

Réseaux régionaux

Le REPHY est complété dans certaines régions par des réseaux régionaux qui répondent à des objectifs purement régionaux :

- SRN Suivi Régional des Nutriments-Nord Pas de Calais
- RHLN Réseau Hydrologique du Littoral Normand
- ARCHYD Arcachon Hydrologie
- RSLHYD/OBSLAG Observatoire Lagunes en Méditerranée

La définition des frontières entre le REPHY, réseau national, et les réseaux régionaux, ainsi que le rôle de chacun ont été décrits dans le document suivant :

Belin C., Lefebvre A., Menet-Nédélec F., Auby I. & Trut G. & Derolez V., 2015. Surveillance phytoplancton et hydrologie 2015. REPHY et réseaux régionaux. Note diffusée le 26 février 2015.

Un recouvrement plus ou moins important existe entre le REPHY et chacun des réseaux régionaux : les lieux REPHY situés dans une région possédant un réseau régional, sont souvent rattachés aussi au réseau régional. Ce double rattachement REPHY / réseau régional s'explique toujours par la contribution financière de l'Agence de l'Eau concernée qui préfère voir l'appellation du réseau régional sur les lieux qu'elle finance pour des objectifs qui vont au-delà de la DCE (DCE qu'elle financerait quel que soit le programme d'appartenance). Cette double appartenance n'est pas gênante, car elle satisfait à la fois la visibilité du REPHY au niveau national, et les exigences régionales. A l'inverse, les lieux non retenus pour le REPHY Observation et n'appartenant pas à la liste des lieux DCE retenus au niveau national, doivent rester rattachés strictement au réseau régional.

Chacun des réseaux régionaux a défini des stratégies d'échantillonnage qui lui sont propres : néanmoins, une homogénéisation entre le REPHY et chaque réseau régional dans les années 2014-2015 a conduit à des règles en grande partie communes. Par exemple la plupart des points des réseaux régionaux suivent une stratégie de type Phytoplancton Indicateur, comme les points REPHY Surveillance Phyto-Hydro, avec des paramètres accompagnateurs similaires. Les fréquences d'échantillonnage peuvent être par contre différentes dans les réseaux régionaux.

Etat des lieux début octobre 2016

Le **tableau 1** ci-dessous récapitule les différentes typologies de lieux :

Type de lieux	Stratégie appliquée dans Quadrigé	Paramètre phytoplancton obligatoire	Paramètre phytoplancton supplémentaire, éventuellement
REPHY Observation	PhyTot - Phytoplancton Total	Flore totale : une fois par quinzaine, toute l'année	Flore toxique : une fois par semaine sur les semaines non échantillonnées pour les flores totales ou indicatrices, pendant les épisodes toxiques, et sur les points désignés pour cela
REPHY Surveillance Phyto - Hydro	PhyInd - Phytoplancton Indicateur	Flore indicatrice : une fois par mois, toute l'année	
REPHY Surveillance Hydro	Hyd - Hydrologie	aucun	aucun
REPHY Sanitaire	PhyTox - Phytoplancton Toxique	Flore toxique : une fois par semaine, pendant épisodes toxiques	Flore toxique : une fois par semaine, toute l'année
REPHY Surveillance Lagunes	Lagunes	Nano et Pico-phytoplancton : une fois par mois, de juin à août	Aucun
Réseau régional	Adaptée au réseau	PhyInd (voire PhyTot) pour les lieux échantillonnés pour le phytoplancton : fréquence adaptée aux objectifs du réseau Aucun paramètre phyto pour les lieux seulement Hydro	Aucun

Tableau 1. Les différentes typologies de lieux du REPHY et des réseaux régionaux, avec leurs associations aux stratégies et au paramètre phytoplancton

Début octobre 2016, le nombre de lieux de chacune des composantes de la surveillance phytoplancton - hydrologie correspond bien aux prévisions faites en 2014 pour le REPHY¹ :

- 36 lieux Observation pour un prévisionnel entre 30 et 40
- 55 lieux Surveillance DCE phyto-hydro (hormis ceux déjà comptés dans les lieux Observation), pour un prévisionnel entre 45 et 55
- 71 lieux sanitaires stricts (dont 3 en commun avec un réseau régional), pour un prévisionnel entre 60 et 70.

N.B. une quarantaine de lieux Observation ou Surveillance participent également à la surveillance sanitaire, avec des prélèvements supplémentaires en période de toxicité, ce qui porte à plus de 100 le nombre de lieux réellement utilisés pour le sanitaire : les prévisions sont donc en réalité dépassées pour cet aspect sanitaire.

Il faut ajouter à cela :

- 35 lieux Surveillance en lagunes, anciennement lieux RSLHYD stricts, et qui sont devenus des lieux communs à REPHY et RSLHYD, suite à une décision conjointe des coordinations REPHY et RSLHYD, afin d'homogénéiser la « visibilité DCE » phyto-hydro
- 26 lieux Surveillance strictement Hydrologie, qui concernent des échantillonnages dans des Masses d'Eau de Transition de Manche Atlantique, avec deux cas possibles : (i) soit ces masses d'eau sont turbides, et l'évaluation de l'indicateur phytoplancton n'y est pas pertinente, mais l'évaluation physico-chimique doit être faite, (ii) soit ces lieux sont situés en amont dans une masse d'eau pour laquelle il existe déjà un lieu phyto-hydro en aval, le lieu en amont étant alors utilisé seulement pour l'évaluation physico-chimique.
- 18 lieux appartenant strictement à un réseau régional

Ce qui fait un total de 241 lieux distincts.

¹ Prévisions reprises dans la note interne « Information sur l'organisation et les principes de fonctionnement du réseau territorial Ifremer en appui aux politiques publiques »

En réalité, ces 241 lieux d'échantillonnage phytoplancton - hydrologie appartiennent souvent à une ou plusieurs des composantes REPHY, et peuvent également appartenir à un réseau régional. Globalement, les intersections existantes sont complexes et peuvent être schématisées comme suit dans la **figure 1** :

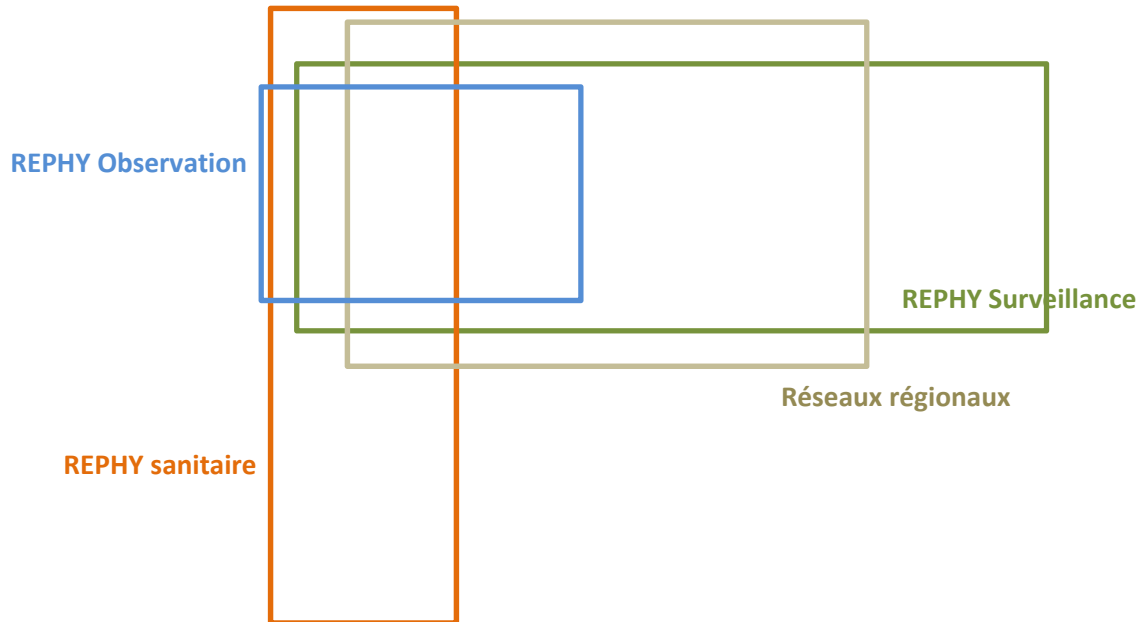


Figure 1. Appartenance des lieux aux composantes du REPHY et/ou à un réseau régional, avec : Lieux REPHY Observation, Lieux REPHY Surveillance, Lieux REPHY sanitaire, Lieux Réseaux régionaux. Les surfaces des aires ne sont pas strictement proportionnelles au nombre de lieux.

Les différentes associations sont détaillées dans le **tableau 2** ci-dessous, avec le nombre de points concernés.

Catégorie	Détails		En commun avec		Détails supplémentaires
36 lieux utilisés pour l'Observation	Strictement Obs.	0	DCE	31	
	Obs. + DCE	13	Sanitaire	21	
	Obs. + DCE + San.	10	Réseau régional	8	
	Obs. + DCE + Rés. rég.	2			
	Obs. + DCE + San. + Rés. rég.	6			
	Obs. + San.	5			
147 lieux utilisés pour la Surveillance DCE	Strictement REPHY DCE	55	Observation	31	Parmi les 147 lieux utilisés pour la DCE : - 85 sont REPHY Surveillance Phyto-Hydro, dont 65 en MEC, 20 en MET - 36 sont REPHY Surveillance en lagunes - 26 sont REPHY Surveillance Hydro en MET Manche-Atlantique
	DCE + Obs.	13	Sanitaire	36	
	DCE + Obs. + Rés. rég.	2	Réseau régional	55	
	DCE + Obs. + San.	10			
	DCE + Obs. + Rés. rég. + San.	6			
	DCE + Rés. rég.	41			
	DCE + San.	14			
	DCE + Rés. rég. + San.	6			
112 lieux utilisés pour le Sanitaire	Strictement sanitaire	68	Observation	21	
	San. + Obs.	5	DCE	36	
	San. + Obs. + DCE	10	Réseau régional	15	
	San. + Obs. + DCE + Rés. rég.	6			
	San. + DCE	14			
	San. + DCE + Rés. rég.	6			
	San. + Rés. rég.	3			
76 lieux utilisés dans un Réseau régional	Strictement Réseau régional	18	Observation	8	
	Rés. rég. + Obs. + DCE	2	DCE	55	
	Rés. rég. + Obs. + DCE + San.	6	Sanitaire	15	
	Rés. rég. + DCE	41			
	Rés. rég. + DCE + San.	6			
	Rés. rég. + San.	3			

Tableau 2. Détails en nombre de points, des associations entre les différentes catégories de lieux utilisés pour la surveillance phytoplancton – hydrologie

A noter que tous les lieux utilisés pour les évaluations DCE pour l'élément de qualité phytoplancton et pour les indicateurs physico-chimiques sont désormais rattachés au REPHY et participent aux évaluations faites au niveau national. Les points des réseaux régionaux hors REPHY peuvent être utilisés dans des évaluations dites régionales, à la demande des LERs. Ces deux types d'évaluations sont désormais prévus dans les outils développés par le service ODE-VIGIES. Il est important de noter que les résultats des évaluations régionales n'apparaissent jamais dans les évaluations faites au niveau national, afin de ne pas introduire de biais dans celle-ci (biais produit par le sur-échantillonnage dans les régions concernées).

Addendum 26 octobre 2016

Quatre nouveaux points ont été activés postérieurement au 20 octobre 2016 et ne sont donc pas pris en compte dans le présent état des lieux. Tous sont des points RSLHYD. Trois d'entre eux ont été créés le 20 octobre 2016, le point SAR-Sarrazine a été créé le 10 décembre 2015, mais activé seulement récemment.

Lieu : mnémo et libellé	Zone marine	Masse d'eau
105-P-204 - SAR-Sarrazine	105 - Etangs Palavasiens	Hors masse d'eau
095-P-126 - MTL - Mateille	095 - Littoral de l'embouchure du Tech au Grau d'Agde	FRDT06b - Complexe du Narbonnais Grazel/Mateille
101-P-016 - GRZ - Grazel	101 - Etangs gruissanais	FRDT06b - Complexe du Narbonnais Grazel/Mateille
095-P-127 - PSV - Pissevaches	095 - Littoral de l'embouchure du Tech au Grau d'Agde	FRDT07 - Pissevache

Principes et historique de l'optimisation de la surveillance phytoplancton-hydrologie

L'optimisation de la surveillance phytoplancton-hydrologie a débuté en 2013, suite aux demandes exprimées par la Direction Générale de l'Ifremer. Des lignes directrices ont été définies en mars 2013 (Belin, 2013) sur les deux aspects du REPHY (environnemental et sanitaire), puis deux documents ont été produits en juillet 2014 pour l'aspect environnemental :

- un état détaillé des lieux existants (Belin *et al.*, 2014c), avec des propositions concrètes sur le devenir de chaque lieu, destiné à être le support du dialogue avec les LERs : les réponses des LERs sur ces propositions ont été fournies à la coordination REPHY entre août et octobre 2014
- un document sur des éléments de réflexion sur un REPHY futur mieux adapté aux enjeux de la recherche (Belin *et al.*, 2014b), soulignant en particulier l'intérêt d'acquérir des paramètres supplémentaires, et de mieux organiser la collecte des données hydrologiques complémentaires

Fin 2014 et durant le premier semestre 2015, le processus d'optimisation s'est poursuivi LER par LER avec en particulier : (i) la liste des lieux à garder d'une part dans le REPHY Observation, d'autre part dans le REPHY Surveillance, (ii) l'adaptation des fréquences d'échantillonnage si besoin, (iii) la définition des frontières (en termes d'objectifs et de lieux rattachés) entre le REPHY national et le réseau régional quand il en existe un, (iii) la possibilité d'acquérir, sur certains « lieux clés », des données supplémentaires sur le phytoplancton à l'aide de nouveaux paramètres, et les échéances envisagées.

Parallèlement, la réflexion s'est poursuivie sur : (i) les paramètres existants et la façon d'optimiser leur acquisition (nutriments par exemple), (ii) les modalités de mise en place de nouveaux paramètres (comme la cytométrie en flux et les pigments), (iii) les nouvelles méthodes d'observation du phytoplancton (projet FlowCAM / ZooPhytoImage).

Les critères de choix utilisés pour l'élaboration de la liste des lieux retenus, ainsi que les principales étapes du travail réalisé entre mi 2014 et fin 2015, sont détaillés dans les **annexes 2, 2 bis et 2 ter**.

Cas particulier des séries de données flore totale

Cette optimisation a été faite en cohérence avec le processus de labellisation pour certaines séries temporelles phytoplancton du REPHY, qui a démarré en 2014 et est toujours en cours d'instruction.

Dans ce cadre, une réflexion particulière s'est portée sur les séries historiques de données sur le phytoplancton total, qui ont toutes été examinées afin de déterminer la pertinence de poursuivre ou non ces séries. La **figure 2** visualise les lieux sur lesquels (i) une série de données a été jugée suffisamment intéressante pour être pérennisée, (ii) les lieux pour lesquels la série a été fermée. Seules les séries de données REPHY, supérieures à six ans sans interruption d'une année entière, sont visualisées sur cette carte.

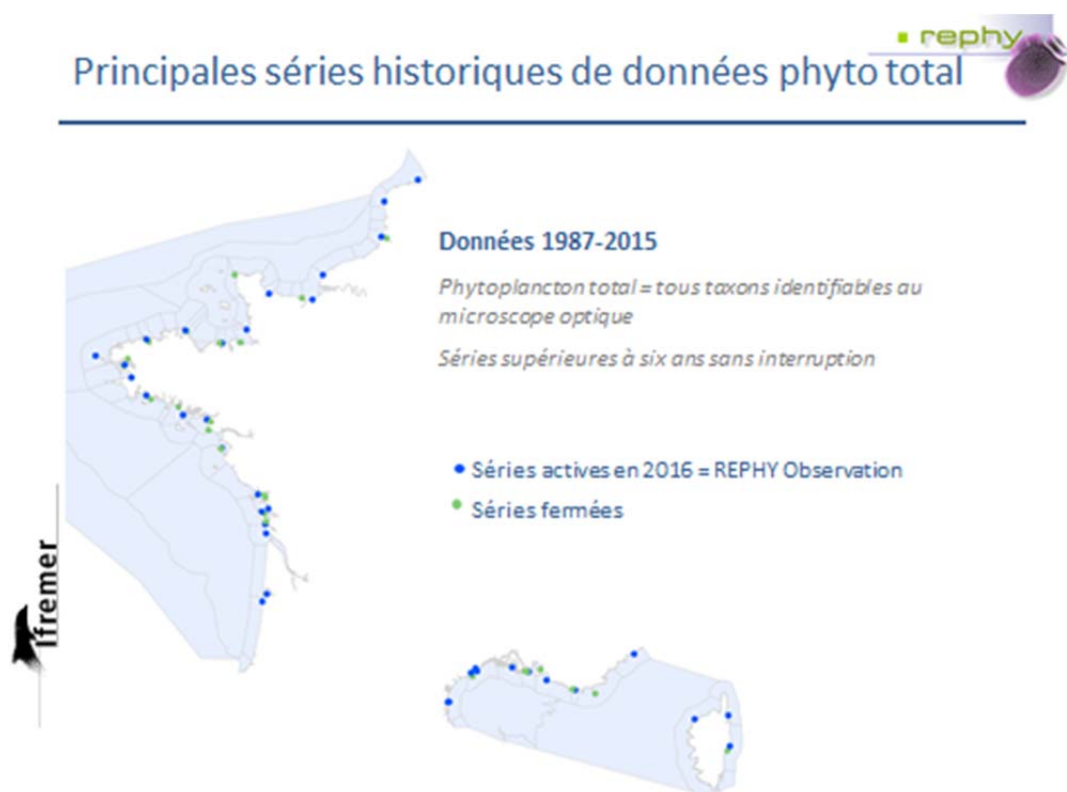


Figure 2. Carte des lieux REPHY pour lesquels les séries de données en phytoplancton total ont été pérennisées (séries actives) ou bien fermées. Carte présentée au colloque LITEAU, Brest, janvier 2016.

Le **tableau 3** détaille les séries actives et fermées. Dans un certain nombre de cas, les séries pérennisées en 2016 peuvent être associées dans les traitements de données, à des séries sur des lieux proches désormais fermés. Ces associations ont été validées dans le cadre de la thèse de Hernández-Fariñas (2015), et pour les séries du LER PC par les travaux de Guesdon (comm. pers).

Requalification et fermetures de lieux

Le **tableau 4** ci-dessous explicite les mouvements qui sont intervenus dans les lieux REPHY entre fin 2013, début de l'optimisation, et juin 2016.

LERS	Lieux REPHY mi novembre 2013					Lieux REPHY juin 2016					Réseaux régionaux 2016			
	FTot	FInd	FTox	Hydro	Total	Obs FTot	Surv FInd	Sanit. FTox	Hydro	Total	SRN	RHLN	ARCHYD	RSL
BL	4	2	0	0	6	3	1	0	0	4	6			
N	5	22	29	0	56	3	17	4	2	26		5		
BN	2	6	10	2	20	2	7	9	2	20				
BO	4	9	25	19	57	5	7	15	9	36				
TM	2	7	13	9	31	2	10	8	5	25				
NT	3	7	2	5	17	2	3	7	5	17				
PC	4	10	0	1	15	5	2	6	1	14				
AR	2	7	0	2	11	2	7	0	2	11			4	
LR	5	16	3	0	24	5	0	19	31	55				3
TL	11	2	2	2	17	4	1	2	0	7				
CO	3	1	1	0	5	3	0	1	4	8				
Total	45	89	85	40	259	36	55	71	61	223				
Total lieux REPHY + réseaux régionaux - juin 2016 = 241														

Tableau 4. Distribution des lieux REPHY par catégorie, et comparaison entre fin 2013 et mi 2016. Les catégories sont exclusives : un lieu n'est compté qu'une fois, dans l'ordre des catégories de gauche à droite (par exemple un lieu n'est compté dans un réseau régional que s'il n'a pas déjà été compté comme lieu dans REPHY)

N.B. pour 2016 : le lieu BL compté en REPHY-Surv-FInd fait en réalité l'objet de Flores Totales dans le cadre du SRN, comme les six lieux strictement SRN ; les cinq lieux strictement RHLN font l'objet de Flores Indicatrices ; sur les quatre lieux strictement ARCHYD ne sont mesurés que les paramètres hydrologiques : sur les trois lieux strictement RSL, le phyto est mesuré en cytométrie en flux

Le nombre total de lieux REPHY est passé de 259 à 223 entre fin 2013 et mi 2016, soit une diminution de 14%. En réalité, cette diminution aurait été plus importante (27%), sans la reprise de nombreux points hydrologie du RSLHYD dans le REPHY (31 relevant du LER LR, et 4 relevant du LER PAC CO), afin d'homogénéiser la « visibilité DCE » phyto-hydro.

Si on considère la totalité des lieux phytoplancton-hydrologie, incluant REPHY et réseaux régionaux, le total de 241 lieux en octobre 2016 (223 lieux REPHY + 18 lieux appartenant strictement à des réseaux régionaux) est à comparer avec le nombre fin 2013 : 331 lieux au total, dont 259 REPHY et 72 strictement réseaux régionaux (8 SRN, 0 RHLN, 4 ARCHYD, 60 RSL). Les différences entre 2013 et 2016 pour les réseaux régionaux s'expliquent comme suit :

- deux lieux ont été fermés pour le SRN
- tous les lieux RHLN étaient communs avec le REPHY en 2013, les cinq qui ont des objectifs strictement régionaux ont été sortis du REPHY
- ARCHYD n'a pas été modifié
- le RSL a connu une importante réduction de ses points fin 2014, et la quasi-totalité de ceux qui restaient sont désormais communs avec le REPHY,

En conclusion, le nombre de lieux utilisés pour la surveillance globale phytoplancton-hydrologie dans le cadre du REPHY et des quatre réseaux régionaux a été réduit de 27% entre fin 2013 et mi 2016.

Les mouvements constatés pour les lieux s'expliquent principalement par :

- des fermetures de lieux, c'est-à-dire une désactivation de leur stratégie : ces lieux n'étant plus actifs, il n'est plus possible de bancariser de nouvelles données sur ces lieux : bien entendu, les données sur ces lieux sont toujours disponibles, et il est possible de réactiver un de ces lieux si la nécessité s'en fait sentir ; les raisons d'une fermeture de lieu sont diverses : lieu redondant avec un autre, ou bien n'ayant pas fait la preuve de son utilité au cours du temps, etc
- des requalifications de lieux, avec application d'une nouvelle stratégie ; dans la plupart des cas, ces réaffectations ont consisté à « dégrader » la stratégie, c'est-à-dire à appliquer une nouvelle stratégie moins exigeante que celle appliquée auparavant (par exemple flore indicatrice transformée en flore toxique)
- des réaffectations de lieux entre REPHY et un réseau régional, dans un sens ou dans un autre

Le détail par LER est analysé ci-dessous.

Le nombre total de lieux REPHY par LER a systématiquement diminué entre fin 2013 et mi 2016, parfois de façon importante (N, BO, TL), à l'exception de LR et CO pour les raisons évoquées ci-dessus.

Le nombre de points Flore Totale (REPHY Observation) a diminué principalement du fait de la requalification de sept lieux en Flore Indicatrice au LER PAC TL, car ils sont des lieux strictement DCE.

Pour ce qui concerne les lieux Flore Indicatrice :

- la diminution au LER N s'explique surtout par la réaffectation de lieux REPHY+RHLN en RHLN strict, car ils ont des objectifs purement régionaux
- la diminution aux LERs MPL NT, PC et LR, s'explique surtout par la requalification de plusieurs lieux en Flore Toxique, car ils ne sont plus utilisés pour d'autres objectifs que le sanitaire
- l'augmentation au LER MPL TM s'explique par le fait que des lieux strictement hydro ont été requalifiés en phyto indicateur, car les masses d'eau concernées ont été réhabilitées du statut de masse d'eau turbide en masse d'eau non turbide, conduisant à une prise en compte du phytoplancton dans l'évaluation DCE

Pour ce qui concerne les lieux Flore Toxique :

- la très forte diminution au LER N s'explique par la fermeture de tous les lieux situés sur les gisements de pêche de la baie de Seine et au large, et pour lesquels les échantillons d'eau étaient fournis par les pêcheurs : outre le fait que les prélèvements n'étaient pas faits selon les procédures en vigueur, ces résultats d'échantillons pris au seau en surface n'avaient aucun intérêt, pour prédire une contamination de ces gisements dont les coquillages sont à plusieurs dizaines de mètres de profondeur

- la diminution au LER BO et au LER MPL TM s'explique par des fermetures de lieux qui n'étaient plus actifs depuis des années
- l'augmentation au LER MPL NT, au LER PC et au LER LR s'explique en partie par la requalification de plusieurs lieux Flore Indicatrice en Flore Toxique

Pour ce qui concerne les lieux Hydrologie :

- la diminution au LER BO et au LER MPL TM, s'explique par une fermeture de lieux dans des masses d'eau de transition comportant plus de deux points
- l'apparition de points hydro au LER LR et au LER PAC CO s'explique par la réaffectation de lieux RSLHYD qui sont devenus des lieux REPHY-RSLHYD

Conclusion et problèmes restant à régler

Le présent document est le résultat de ces trois années de réflexion. Si la surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie est désormais mieux structurée pour répondre à ses différents objectifs, tout en étant optimisée, quelques problèmes restent à régler. Ils concernent en particulier :

- la couverture insuffisante pour la DCE en eaux côtières en Méditerranée
- la gestion des points communs REPHY – SOMLIT, en Méditerranée

Couverture insuffisante pour la DCE en eaux côtières méditerranéennes

Les masses d'eau officiellement désignées pour le contrôle de surveillance dans le cadre de la DCE doivent être suivies pour l'élément de qualité phytoplancton (incluant la chlorophylle et le phytoplancton) et pour les paramètres hydrologiques (physico-chimie et nutriments).

En Manche et Atlantique, pour les masses d'eau ne comprenant pas de point de suivi à l'intérieur de la masse d'eau pour ces paramètres, il y a toujours une explication :

- FRAC01 Frontière belge à jetée de Malo : suivie par un point situé dans la FRAC02 voisine
- FRAT03 Port de Calais : s'agissant d'un port, les paramètres biologiques et hydrologiques sont non pertinents
- FRAC03 Cap Griz nez à Slack : suivie par un point situé dans la FRAC04 voisine
- FRHT0 Baie du Mont-Saint-Michel-fond de baie estuarien : masse d'eau turbide, les paramètres phyto sont non pertinents
- FRFT32 Estuaire Fluvial Dordogne : masse d'eau turbide, les paramètres phyto sont non pertinents
- FRFT33 Estuaire Fluvial Garonne Amont : masse d'eau turbide, les paramètres phyto sont non pertinents
- FRFT06 Estuaire Adour Amont : masse d'eau turbide, les paramètres phyto sont non pertinents

En revanche, en Méditerranée, de nombreuses masses d'eau désignées pour le contrôle de surveillance DCE ne sont plus suivies pour le phytoplancton et l'hydrologie. La situation s'est fortement dégradée entre 2012 et 2015 en particulier, aussi bien en eaux côtières qu'en lagunes. En

2016, un certain nombre de masses d'eau en eaux côtières devraient être réactivées, en particulier toutes celles qui comportent un point REPHY Observation. Il reste cependant un nombre non négligeable de masses d'eau qui ne sont plus suivies alors qu'elles devraient théoriquement l'être dans le cadre de la DCE : cf. le **tableau 5** des masses d'eau de contrôle de surveillance non suivies en 2016 pour les eaux côtières méditerranéennes. Les conséquences sont : (i) les évaluations nationales pour les indicateurs phytoplancton et physico-chimiques sont incomplètes, car les masses d'eau qui ne sont plus suivies ne sont plus évaluées, (ii) un déficit attendu de données pour la DCSMM, puisque celle-ci n'ayant pas identifié de budget ciblé pour le phytoplancton, compte sur les données accumulées pour la DCE.

FRDC01	Frontière espagnole - Racou Plage	Point Banyuls supprimé
FRDC02c	Cap d'Agde	suivie par un point situé dans la ME FRDC02e
FRDT20	Grand Rhône	masse d'eau turbide, les paramètres phyto sont non pertinents
FRDC05	Côte Bleue	Point 18A – Carry supprimé
FRDC06b	Pointe d'Endoume - Cap Croisette et îles du Frioul	Point Endoume supprimé
FRDC07a	îles de Marseille hors Frioul	Point Cortiou supprimé
FRDC07b	Cap croisette - Bec de l'Aigle	Point Cap Canaille supprimé
FRDC07e	Ilot Pierreplane - Pointe du Gaou	Point 21E – Ile Embiez supprimé
FRDC08d	Ouest Fréjus - Pointe de la Galère	Point 27B – Frejus est supprimé
FRDC09a	Cap d'Antibes - Sud port Antibes	Point 29E– Antibes sud supprimé
FRDC09b	Port Antibes - Port de commerce de Nice	suivie par un point situé dans la ME FRDC09c
FRDC09d	Cap d'Antibes - Cap Ferrat	suivie par un point situé dans la ME FRDC09c
FRDC10c	Monte Carlo- Frontière italienne	suivie par un point situé dans la ME FRDC09c
FREC02ab	Cap Est de la Corse	Point Cap Corse supprimé
FREC02c	Littoral Bastiais	suivie par un point hors ME mais très proche de ME FREC02c
FREC03ad	Littoral Sud Est de la Corse	Point Pointe Sant'Amanza supprimé
FREC03eg	Littoral Sud Ouest de la Corse	Point Pianottoli – Bruzzi supprimé
FREC04ac	Pointe Senetosa - Pointe Palazzu	Point Cargèse supprimé

Tableau 5. Masses d'eau officiellement désignées pour le contrôle de surveillance DCE dans les eaux côtières de Méditerranée, ne possédant pas de point de suivi dans la masse d'eau. Deux cas sont considérés :

explication valable

pas d'explication, l'absence de suivi pourrait être dommageable

Points communs REPHY – SOMLIT

Dans le cadre de la labellisation des réseaux REPHY et SOMLIT (voir supra), la pré demande faite en mars 2016 qui va conduire à présenter un dossier dans le cadre de l'IR ILICO, résulte d'une entente entre les deux réseaux : celle-ci est formalisée dans le compte-rendu d'un atelier de travail à Luc sur mer en novembre 2015 (Claquin *et al.*, 2016)

En Manche Atlantique, les points REPHY et SOMLIT proches et potentiellement labellisables sont systématiquement complémentaires et différents, et sont donc proposés tous les deux à la labellisation, un par le REPHY, un par le SOMLIT, par exemple en Artois Picardie : Point 1 Boulogne (REPHY) et Wimereux-point C (SOMLIT).

En Méditerranée, les cas sont plus variés, car historiquement quelques points ont fait l'objet d'une collaboration entre REPHY et SOMLIT pour les prélèvements et les analyses, mais il s'est avéré que celle-ci n'était pas toujours satisfaisante pour différentes raisons, dont la principale est la non-formalisation de l'échange des données acquises par l'un ou l'autre organisme. En particulier, s'agissant de points labellisables mais aussi de points DCE, il s'est avéré que l'évaluation des masses d'eau concernées ne pouvait pas se faire, car les données nécessaires au calcul des indicateurs phytoplancton et hydrologie n'étaient pas disponibles dans Quadrige (les procédures d'évaluation DCE ne traitant que les données au format Quadrige). Quatre cas sont exposés ci-dessous.

Point Banyuls-Sola

Le point REPHY Banyuls a été fermé début 2016, le point SOMLIT Banyuls est donc présenté seul à la labellisation.

Points Sète mer et SOMLIT Sète

Deux points coexistent actuellement : (i) le point REPHY Sète-mer, assez proche de la côte, retenu comme un point d'Observation, (ii) le point SOMLIT Sète, plus au large. Sur ce dernier, de nombreux paramètres sont mesurés, mais l'observation du phytoplancton n'y est pas faite. L'ensemble de ces deux points a été présenté dans la pré-demande de labellisation comme un point commun REPHY-SOMLIT, étant sous-entendu que les deux points fusionneraient en un seul. Une décision doit être prise, et une convention de partenariat élaborée : celle-ci doit tenir compte des moyens de prélèvement respectifs, et être explicite sur les modalités d'échanges de données.

Points Marseille – Endoume

Le point REPHY Endoume a été fermé début 2016, le point SOMLIT Marseille est donc présenté seul à la labellisation.

Point Villefranche

Les points nommés « Villefranche » pour REPHY et « Villefranche (point B) » pour SOMLIT, sont un seul et unique point, présenté comme point commun REPHY-SOMLIT dans la pré-demande de labellisation 2016. Une convention de partenariat doit être finalisée, en tenant compte des moyens de prélèvement respectifs, et en étant explicite sur les modalités d'échanges de données

Paramètres historiquement mesurés en accompagnement du phytoplancton

Parallèlement à l'optimisation effectuée sur les lieux de prélèvement, une réflexion sur les mesures effectuées en accompagnement du phytoplancton dénombré a fait l'objet de nombreux échanges. En effet, il s'est avéré que celles-ci ne l'étaient pas toujours de façon satisfaisante, que ce soit d'un point de vue stratégie d'échantillonnage ou bien d'un point de vue méthode. Sont détaillés ci-dessous par paramètre : un bilan résumé de l'existant, les suggestions d'amélioration et les recommandations faites par les différents experts, les modifications déjà mises en œuvre ou bien à prévoir à court ou moyen terme.

Nutriments

Historique et contexte

La majorité des mesures de nutriments du REPHY ont été acquises depuis 2007, c'est-à-dire depuis la mise en place du programme de surveillance de la DCE (les nutriments étaient auparavant mesurés dans le cadre du RNO hydro et par certains réseaux régionaux). La fréquence et la période de prélèvement recommandées par la DCE (par ex une fois par mois de novembre à février tous les ans en Manche Atlantique), qui ont été la base de la stratégie REPHY pendant plusieurs années, ne permettaient pas d'observer un lien entre nutriments et phytoplancton (*cf.* Hernández-Fariñas, 2015). Seules les séries continues de nutriments acquises dans le cadre de réseaux régionaux, ou décidées à l'initiative de certains LERs dans le cadre du REPHY, se sont avérées utiles pour traiter des problématiques plus complexes que le simple calcul de l'indicateur DCE. Par ailleurs, les nutriments n'étaient pas mesurés dans les eaux côtières de Méditerranée.

Méthodes

Les méthodes recommandées pour l'analyse des nutriments sont :

- **NH₄** (Ammonium) : Fluorimétrie flux (Aminot A. & Kérouel R., 2007)
- **NO₃+NO₂** (Nitrate + nitrite), **PO₄** (Phosphate), **SiOH** (Silicate) : Spectrophotométrie flux (Aminot A. & Kérouel R., 2007)

Laboratoires analystes

Quatre LERs sont accrédités pour l'analyse des nutriments : LER N, LER MPL NT, LER AR, LER LR. Toutes les analyses de nutriments pour le REPHY Observation et ARCHYD, et une majorité de celles du REPHY Surveillance et du RHLN, se font dans l'un de ces quatre laboratoires.

Les analyses de nutriments faites dans le cadre du SRN strictement (hors DCE) sont faites par le LER BL, hors accréditation. Celles du RHLN ou du REPHY Surveillance sont parfois faites par un partenaire (SMEL, STARESO).

Bancarisation

L'**annexe 3** détaille les différentes combinaisons du référentiel Quadrigé PSFMs actuellement décrites dans les stratégies des différents programmes (REPHY et réseaux régionaux) pour les nutriments.

Modifications mises en œuvre en 2016

Les modifications concernent exclusivement la stratégie d'échantillonnage.

Lieux du REPHY Observation

La note technique Belin *et al.* (2016) détaille la nouvelle stratégie d'échantillonnage pour les 36 points du REPHY Observation. En résumé : des analyses de nutriments sont effectuées sur tous ces points, toute l'année, généralement une fois par quinzaine (c'est-à-dire à la même fréquence que le phytoplancton), sauf en Artois Picardie où une fréquence adaptée a été choisie, et en Méditerranée où la fréquence est dans un premier temps d'une fois par mois. Les analyses sont faites obligatoirement dans l'un des laboratoires accrédités pour les nutriments.

Autres lieux

Les lieux du REPHY Surveillance restent soumis à la fréquence d'échantillonnage minimale imposée par la DCE, c'est-à-dire : (i) une fois par mois de novembre à février, tous les ans, en Manche Atlantique, (ii) une fois par mois toute l'année, mais seulement tous les trois ans, en Méditerranée.

Pour les lieux appartenant strictement à un réseau régional, les modalités d'échantillonnage des nutriments sont décrites dans les conventions concernées.

Pour les lieux du REPHY Etudes², les modalités d'échantillonnage des nutriments sont définies dans les documents descriptifs de ces études.

Modifications et améliorations éventuelles à prévoir

Au-delà des réflexions de différents experts sur la stratégie d'échantillonnage des nutriments, qui sont enregistrées en annexe de la note technique Belin *et al.* (2016), des suggestions et recommandations d'experts n'ont pas encore été traitées. Ainsi, dans le compte-rendu de la réunion REPHY au LER MPL du 6 mai 2015 (CR diffusé le 15 juillet 2015), il est noté que :

- la question de l'intérêt des nutriments dans les estuaires est soulevée : ne faut-il pas revoir les stratégies d'échantillonnage pour ce paramètre ? Par ailleurs dans les estuaires se pose la question de la cohérence des suivis avec ceux pratiqués traditionnellement par les services de l'état (police de l'eau) avec des dosages réalisés à basse mer de manière à appréhender les apports amont alors que les experts Ifremer ont préconisé un suivi à pleine mer pour la DCE. La question sera (re)posée aux experts dans le cadre du SDAGE et de la recherche d'une optimisation des échantillonnages

² REPHY-Etudes : programme Quadrigé créé en 2016 rassemblant des études comportant des paramètres similaires à ceux du REPHY, mais sur une durée limitée

- pour les PSFMs nutriments dans Q², la nuance entre préfiltration et filtration n'est pas indiquée. Il serait souhaité que soit pratiquée la « vraie » méthode Aminot & Kerouel, avec filtration et non pré-filtration, et qu'elle soit utilisée au moins pour les mesures de nutriments sur les points clés. Cette nuance est en effet parfois importante, en particulier pour les PO₄ en cas de turbidité forte. Les formes totales sur les points clés seraient également intéressantes.

Conclusion

Il est recommandé qu'un groupe de travail soit réuni au premier trimestre 2017, pour :

- faire un premier bilan des modifications mises en œuvre en 2016 pour la stratégie d'échantillonnage des nutriments pour le REPHY Observation
- voir si la stratégie d'échantillonnage pour le REPHY Surveillance (DCE) nécessite d'être améliorée, en Manche Atlantique et en Méditerranée
- réfléchir aux suggestions ci-dessus

Chlorophylle

Historique et contexte

Les mesures de chlorophylle accompagnent depuis toujours les observations du phytoplancton dans le cadre du REPHY et des réseaux régionaux.

Les périodes et les fréquences d'échantillonnage sont en principe les mêmes entre les deux paramètres, avec une exception cependant : sur les points DCE stricts de Manche - Atlantique, la période d'analyse de la chlorophylle peut être réduite à mars-octobre, alors que la période pour le phytoplancton reste toute l'année. Cette différence s'explique par les critères de calcul des indices DCE, qui sont respectivement basés sur ces périodes, décidées d'un commun accord entre pays européens de la façade Manche – Atlantique dans le cadre de l'intercalibration au niveau européen.

Méthodes

Les méthodes recommandées pour l'analyse de la chlorophylle-a (**CHLOROA**) et des phéopigments (**PHEO**) sont :

- Spectrophotométrie monochromatique (Aminot A. & Kérouel R., 2004)
- Fluorimétrie (Aminot A. & Kérouel R., 2004)

Laboratoires analystes

Tous les LERs effectuent des analyses de chlorophylle-a. Aucun LER n'est accrédité pour ces analyses qui sont faites dans le cadre des procédures qualité du laboratoire.

Les analyses de chlorophylle sont faites par les LERs pour le REPHY Observation, une grande partie du REPHY Surveillance, le SRN, le RHLN et ARCHYD. Celles du REPHY Surveillance, et du RSLHYD sont parfois faites par un partenaire (LABOCEA-GIP, ECOSYM).

Bancarisation

L'**annexe 3** détaille les différentes combinaisons du référentiel Quadrige PSFMs actuellement décrites dans les stratégies des différents programmes (REPHY et réseaux régionaux), pour la chlorophylle-a.

Modifications mises en œuvre en 2016

La seule modification concerne l'augmentation de la fréquence des analyses de chlorophylle sur les points du REPHY Observation anciennement échantillonnés une fois par mois, qui sont passés à une fois par quinzaine.

Modifications et améliorations éventuelles à prévoir

Dans les conclusions de la réunion REPHY / PELAGOS de février 2015 (Belin, 2015), les options suivantes étaient proposées pour les mesures de chlorophylle :

- sur les points du REPHY Observation sélectionnés pour la mise en œuvre d'analyses pigmentaires (voir Belin & Lampert, 2016) : la méthode classique n'est plus appliquée
- sur tous les autres points du REPHY Observation (ou certains dans un premier temps, à voir) : la méthode classique pour la chlorophylle est appliquée sur deux fractions (totale, et $> 3 \mu\text{m}$, pour discriminer nano et micro) ; le pico est déduit par différence des deux ; le seuil de $3 \mu\text{m}$ est à discuter, car dans certains cas, il est trop faible pour une analyse en spectrophotométrie, or il n'y a pas des fluorimètres partout
- sur les points strictement DCE, la chlorophylle est poursuivie avec la méthode classique, sur la fraction totale seulement

A noter que pour le premier item, les points du REPHY Observation sélectionnés pour les pigments font toujours l'objet d'une double analyse : classique (spectro ou fluo selon les cas) + HPLC. Ceci en attendant d'avoir les éléments sur un recalage éventuel à prévoir entre les deux types de résultats.

Conclusion

Le groupe de travail prévu pour les nutriments au premier trimestre 2017 pourrait également entériner ces modifications sur la chlorophylle, et statuer sur la suppression ou non des mesures classiques de chlorophylle sur les points choisis pour les pigments, et dans quelles conditions.

Paramètres physico-chimiques

Historique et contexte

Les paramètres physico-chimiques qui accompagnent depuis toujours les observations du phytoplancton dans le cadre du REPHY et des réseaux régionaux sont les suivants : température, salinité, turbidité, oxygène dissous.

Les périodes et les fréquences d'échantillonnage sont les mêmes que celles du phytoplancton pour température, salinité, turbidité. Elles sont réduites pour les mesures d'oxygène dissous : (i) de juin à septembre seulement, surface et fond pour toutes les eaux côtières et de transition hors lagunes, (ii) de juin à août seulement, une fois par mois, surface et fond, pour les lagunes.

Méthodes

Les méthodes recommandées pour l'analyse des paramètres physico-chimiques sont :

- **TEMP** (Température de l'eau) : Capteur de température in situ
- **SALI** (Salinité) : Capteur de conductivité in situ
- **TURB-FNU** (Turbidité FNU) : Capteur turbidimètre norme ISO 7027 in situ **OU** Turbidimètre optique (ISO 7027 - TURB FNU) dans échantillon
- **OXYGENE** (Oxygène dissous) : Capteur oxygène à luminescence mg/l **OU** Capteur oxygène à membrane électrochimique mg/l³

Laboratoires analystes

Tous les LERs effectuent ces mesures. Aucun LER n'est accrédité pour celles-ci qui sont faites dans le cadre des procédures qualité du laboratoire.

Les mesures physico-chimiques sont faites par les LERs, ou par les partenaires qui assurent les prélèvements et font donc les mesures *in situ* en même temps. Sur l'ensemble REPHY + réseaux régionaux, la liste actuelle des partenaires effectuant ces mesures est la suivante (dans l'ordre géographique d'intervention) : CSLN, SMEL, SYMEL, SPEL22, ASSO, SPEL29, MINYVEL44, SPEL44, CRC-PDL, SNSM17-TREMB, SPEL33, SPEL64, P2A34, RN_CAMARGUE, GIPRE, SPEL83, VILLEFRANCHE, STARESO (voir sigles et acronymes en **annexe 1**).

Bancarisation

L'**annexe 3** détaille les différentes combinaisons du référentiel Quadrigé PSFMs actuellement décrites dans les stratégies des différents programmes (REPHY et réseaux régionaux) pour les paramètres physico-chimiques.

Modifications mises en œuvre en 2016

Aucune modification.

³ Vérifier si cette dernière méthode est recommandée

Modifications et améliorations éventuelles à prévoir

Pour la turbidité, les mesures devraient être toutes faites en unité FNU et non pas NTU. Il reste des exceptions à cette règle qu'il faudrait pouvoir solder.

Pour l'oxygène dissous, les mesures de fond ne sont pas faites systématiquement, or ces mesures sont la base de l'indicateur DCE pour l'oxygène. Il est impératif que les règles d'échantillonnage soient respectées.

Cas particulier du pH

Il a parfois été suggéré d'effectuer une mesure *in situ* de pH parallèlement aux autres paramètres physico-chimiques déjà suivis par le REPHY. Selon Anne Daniel, cette mesure n'est pas adaptée à un observatoire tel que le REPHY car :

- la seule mesure de pH ne permet pas l'étude de l'acidification du milieu marin. Il faudrait en effet mesurer en parallèle une autre forme du système des carbonates (le carbone inorganique dissous total C_T , l'alcalinité totale AT ou encore la pression partielle de CO_2 pCO_2)
- seules les mesures de pH et de pCO_2 peuvent être effectuées *in situ* à l'aide de capteurs
- l'utilisation de ces capteurs de mesure est délicate et nécessite un suivi métrologique relativement lourd en termes de vérification et de calibration ; de plus, ces mesures *in situ* ne permettent pas d'obtenir une précision comparable à celle obtenue avec les méthodes d'analyse classiques de laboratoire

Ces mesures sont prévues dans les stratégies SRN, mais pas dans les autres réseaux.

En conclusion, les mesures de pH ne sont pas introduites dans les paramètres du REPHY.

Nouvelles méthodes d'observation et d'analyse du phytoplancton

Dans les propositions faites en 2014 pour le REPHY futur (Belin *et al.*, 2014b), et conformément aux conclusions des travaux relatifs à la construction d'un Indice de Composition du phytoplancton dans le cadre de la fiche n° 3 de la convention Ifremer / ONEMA 2013-2015 (voir en particulier : Lampert, 2015 ; Hernández-Fariñas *et al.*, 2016 ; Artigas *et al.*, 2016), il est indiqué que sur quelques points du REPHY Observation, il serait mis en place de nouveaux paramètres pour évaluer le nano et le pico-phytoplancton, dont une grande partie échappe aux observations microscopiques.

Ces nouveaux paramètres ont été étudiés entre 2013 et 2015 sur quelques sites (REPHY, SRN ou autres) dans le cadre de l'étude financée par l'ONEMA : analyses pigmentaires par HPLC, biodiversité génétique par *metabarcoding*, analyses du nano et du pico-phytoplancton par cytométrie en flux. Les résultats de cette étude montrent à l'évidence que les observations REPHY par microscopie ne sont pas suffisantes pour appréhender la totalité du phytoplancton, et qu'il est désormais indispensable de s'intéresser au nano et pico-phytoplancton, qui apportent des informations totalement nouvelles.

Par ailleurs, une nouvelle méthode d'identification et de dénombrement du phytoplancton est étudiée depuis quelques années, et a fait l'objet entre 2013 et 2015 d'une étude financée par l'ONEMA (action n° 9). Elle a d'ores et déjà conduit à la mise en œuvre semi-opérationnelle d'un nouvel outil de numérisation et d'identification automatique d'images de phytoplancton : FlowCAM – ZooPhytoImage (voir en particulier : Grosjean & Wacquet, 2016 ; Neaud-Masson *et al.*, 2016 ; Colas *et al.*, 2016).

Analyses pigmentaires

Introduction : informations fournies par Luis Lampert

Ces analyses permettent d'obtenir une distribution des groupes phytoplanctoniques par l'étude de leurs pigments biomarqueurs, analysés par HPLC. Parmi les avantages de la méthode : une bonne résolution sur toutes les classes de taille, une bonne reproductibilité, une bonne représentativité, un prix abordable et une rapidité d'exécution. Parmi les inconvénients : l'impossibilité de déterminer les espèces, et le manque de spécificité de certains biomarqueurs. Le nombre de pigments discriminés par les méthodes HPLC a doublé en 20 ans et est passé à une soixantaine avec les méthodes de Van Heukelem & Thomas (2001) et de Zapata *et al.* (2000).

Cette méthode, qui permet d'aborder toutes les classes de taille, peut être utilisée dans des études diverses du compartiment phytoplanctonique au moyen d'outils tels que CHEMTAX (écologie, dynamique phytoplanctonique, processus de dégradation, etc...). Elle permet également d'envisager une surveillance de routine avec des indices appropriés (indices de similarité entre autres), sans besoin de compétences spécifiques en chénotaxonomie, une fois les outils mis en place.

Ces mesures sont aussi nécessaires aux calibrations des capteurs satellite, qui comptent de plus en plus de caméras avec de nombreuses longueurs d'ondes. A terme il est envisageable de pouvoir accéder à la distribution des principales classes algales par les images satellite. Des prototypes existent déjà et donnent des résultats prometteurs (par ex : Jegou, 2013).

Mise en œuvre en 2016

Une étude préliminaire sur les eaux de la Manche et de l'Atlantique dans le cadre d'une convention ONEMA, a permis de valider la pertinence d'un indice composition du phytoplancton basé sur les analyses pigmentaires (Lampert, 2015). Par ailleurs, en Méditerranée, une étude menée par la STARESO dans ce même cadre, avait déjà conduit à la description d'un indice composition, basé sur les pigments et adapté aux eaux méditerranéennes et en particulier corses (Goffart, 2013 ; 2014).

La double perspective de (i) construire un indice composition qui pourrait améliorer l'indicateur phytoplancton tout en affinant les évaluations des masses d'eau pour cet indicateur, (ii) étendre les connaissances sur le nano et le pico-phytoplancton, a paru suffisamment intéressante pour que des analyses pigmentaires soient mises en œuvre dès 2016, dans le cadre du REPHY, du SRN et du RHLN.

En outre, l'implémentation de cette nouvelle technique s'est trouvée facilitée par un contexte favorable :

- disponibilité immédiate ou décalée de deux matériels HPLC : respectivement LER N ayant récupéré l'HPLC de LER PAC TL, et LER BO dont le matériel va se trouver progressivement libéré des analyses de toxines ASP
- personnel motivé et prêt à se former à cette nouvelle technique dans ces deux LERs
- disponibilité en temps agent prévisible dans le cadre des perspectives d'externalisation des activités sanitaires
- comparabilité des résultats obtenus dans des laboratoires différents, si la méthode est la même

La note technique Belin & Lampert (2016) détaille la stratégie d'échantillonnage, les financements obtenus, le planning sur 2016-2018, ce qui est prévu pour les analyses, et ce qui est prévu pour le traitement des données.

En résumé, 16 lieux en Manche Atlantique, et 5 lieux en Méditerranée (dont 2 en Corse), sont échantillonnés pour les pigments, une fois par quinzaine ou une fois par mois, selon les cas. Les échantillons sont congelés dans l'attente de leur traitement par les deux LERs analystes qui sont en cours de formation.

Bancarisation des résultats

Le référentiel pour les analyses pigmentaires a été créé dans Quadrigé en 2015, d'après une description faite par Luis Lampert. 2769 PSFMs sont décrits correspondant à 71 paramètres x 13 fractions x 3 méthodes. Ce référentiel est décrit de façon détaillée en **annexe 4**.

Ce référentiel a été construit pour bancariser les données provenant de différents laboratoires d'analyse, puisqu'il couvre les trois méthodes les plus utilisées pour ce type d'analyses : Van Heukelem et Thomas (2001), Wright *et al.* (1991), Zapata *et al.* (2000).

Dès que les analyses commenceront, ces PSFMs seront intégrés dans les stratégies concernées des programmes REPHY et REPHY-ETUDES. Tout est donc prêt pour que la saisie dans Quadrigé des résultats pour ces nouveaux paramètres puisse se faire. Il faut toutefois noter que la saisie des résultats pour un seul échantillon d'eau va s'alourdir avec l'arrivée de ces nouvelles analyses : 71 lignes de résultats en plus potentiellement (en réalité la totalité des 71 pigments n'est pas analysée). Les nouvelles fonctionnalités de Quadrigé, avec un copier-coller à partir d'Excel par exemple, sont à examiner, à condition que le fichier Excel soit construit à l'image de la stratégie dans Quadrigé. Une solution Quadrilabo serait également à étudier, à condition qu'un fichier modèle soit défini et fourni par la coordination REPHY.

Conclusion

Il serait souhaitable de prévoir un premier bilan des premiers résultats obtenus et des difficultés éventuelles, à échéance du premier trimestre 2017.

Cytométrie en flux

Introduction : informations fournies par Mathilde Schapira

Le nano- et le pico-phytoplancton peuvent contribuer de manière significative à la biomasse phytoplanctonique totale et à la production primaire totale. Cependant, la plupart des études portant sur ces petites classes de taille ont porté sur des systèmes océaniques et/ou oligotrophes et peu d'informations sont disponibles à ce jour sur l'importance de ces classes de taille en milieux côtiers. Quelques études ont cependant mis en évidence l'importance de ces petites classes de taille, et en particulier des cyanobactéries, dans différents types d'écosystèmes estuariens et côtiers dans le monde. Les modifications en termes de classe de taille et de composition du phytoplancton sont de bons indicateurs de la modification des masses d'eau dans lesquels ils se trouvent, que ce soit à petite échelle spatiale ou temporelle (*e.g.* pollution, eutrophisation) ou à grande échelle (*e.g.* changements climatiques) (Thyssen *et al.*, 2011). A moyenne échelle, les gradients thermiques, halins ou nutritifs constituent des zones hautement dynamiques où se produisent de profonds changements écologiques (*e.g.* Schapira *et al.* 2009, 2010 ; Schapira & Seuront 2013).

Ainsi le suivi du pico- et nanophytoplancton peut permettre d'acquérir des informations plus pertinentes et complètes sur le statut écologique des masses d'eau étudiées, en particulier dans le cadre de suivis écologiques ou d'un réseau d'observation.

La cytométrie en flux consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser : ces signaux sont associés-aux propriétés optiques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne, ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme le phytoplancton. Ces signaux sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés et traités, et les résultats sont présentés sous la forme de cytoigrammes.

Ces analyses permettent d'obtenir des groupes fonctionnels pour la partie du phytoplancton non observable en microscopie optique, c'est-à-dire le nano et le pico-phytoplancton. La cytométrie en flux présente un avantage qualitatif car il s'agit d'une analyse multiparamétrique à l'échelle individuelle (*i.e.* possibilité d'avoir pour chaque cellule sa taille, sa granulosité et ses caractéristiques de fluorescence naturelle ou induite) et donc d'identifier les grands groupes composant le pico- et le nano-phytoplancton.

Mise en œuvre en 2016

Aucune au niveau des réseaux d'observation et de surveillance. En effet, le contexte n'est actuellement pas favorable à l'implémentation en routine de cette nouvelle technique, dans la mesure où un effort important a été porté sur les analyses pigmentaires.

Perspectives

Les perspectives ne semblent pas être à très court terme.

Néanmoins, le suivi réalisé en 2015 sur le point REPHY/RHLN Cabourg (Schapira, *comm. pers.*) donne des pistes intéressantes pour un éventuel passage en routine de ces analyses. Les échantillons prélevés pour ce suivi ont été analysés en début d'année 2016 sur le cytomètre Gallios (Beckman Coulter) de la plateforme cytométrie de la SFR ICORE (Caen) dans le cadre d'un stage INTECHMER (Chasselin, 2016). Par ailleurs, des tests ont été réalisés visant à améliorer le protocole de prélèvement (*i.e.* délai de fixation), de préservation des échantillons (*e.g.* utilisation du Pluronic F68 ; Marie *et al.*, 2014) et d'analyse des cytogrammes (*i.e.* nouveau protocole d'identification spécifique à l'étude des cryptophycées). En outre, une réflexion a été entamée sur les techniques qui pourraient être mises en place en vue de pouvoir comparer les résultats obtenus sur différents appareils et différents analystes, mais aussi sur la bancarisation des données dans Q2.

Dans les critères bloquants, il faut noter qu'il n'y a pas à Ifremer de disponibilité en termes de matériel (cytomètre) pour des analyses dans le cadre des réseaux. Ces analyses ne peuvent donc qu'être sous traitées (par ex au PRECYM à Marseille, ou ECOSYM à Montpellier).

Les compétences Ifremer-ODE sur cette technique sont réduites à quelques personnes (Marc Sourisseau, Marie Latimier, Philippe Souchu, etc –liste non exhaustive), mais il faut citer celle de Mathilde Schapira, qui utilisait régulièrement jusqu'en 2016 la plate-forme de l'Université de Caen pour des analyses de ce type dans le cadre d'études.

Des analyses en cytométrie sont également faites sur des points REPHY/SRN dans le cadre de la collaboration du LER BL avec le CNRS-ULCO Wimereux, mais les données ne sont pas disponibles dans Quadrigé : il faudrait réfléchir à la possibilité d'en bancariser une partie. Ceci est également valable pour les données acquises par le LER N. A noter que les analyses effectuées sur des échantillons analysés en « frais » (c'est-à-dire non fixés), ce qui est le cas des échantillons traités avec le « CytoSens » en mode embarqué par LER BL et ULCO, sont difficilement comparables avec les analyses faites sur des échantillons fixés.

En Méditerranée, les résultats de cytométrie en flux acquis dans les lagunes (analyses faites à ECOSYM à Montpellier), sont actuellement bancarisés, mais sous une forme très synthétique : il faudrait réfléchir à la possibilité de bancariser les résultats détaillés.

Enfin, un problème important à envisager est la difficulté de comparer des résultats acquis avec des matériels différents et des opérateurs différents, sachant que les résultats fournis sont extrêmement dépendants de l'interprétation qu'en fait l'opérateur à partir des cytogrammes.

Bancarisation des résultats

Un référentiel simplifié (deux paramètres) existe depuis longtemps dans Quadrigé pour répondre aux besoins de bancarisation des données du RSL en lagunes méditerranéennes. Il a depuis été complété par quatre autres paramètres. L'ensemble correspond à la méthode Vaquer *et al.* (1996), il est spécifique au RSL.

Un référentiel plus détaillé a été créé dans Quadrige² en 2011 pour bancariser les données de cytométrie en flux suite à une demande d'intégration de données de ce type par les DOMs : ce référentiel est actuellement valide pour la Martinique et la Réunion, moyennant quelques petites modifications en cours. Il est également valide pour toutes les données provenant de la plateforme PRECYM à Marseille. L'ensemble correspond à la méthode Grégori *et al.* (2001). Ce référentiel est détaillé en **annexe 5**, ainsi que les commentaires de l'auteur de la méthode (Gérald Grégori du MIO à Marseille) sur notre façon de bancariser ce type de données.

Ce référentiel a également été envoyé à Mathilde Schapira (LER N) et Felipe Artigas (CNRS-ULCO Wimereux) par C. Belin le 30 décembre 2014, afin de voir s'il convient aux utilisations actuelles ou s'il y a moyen de l'améliorer. Des pistes intéressantes ont d'ores et déjà été données par Mathilde (voir ci-dessous), mais les demandes de modifications faites en particulier par les DOMs depuis quelques mois mériteraient qu'un groupe de travail se penche sur le sujet.

Proposition de Mathilde Schapira. Il est possible d'enregistrer pour chaque population une description statistique (*i.e.* médiane, moyennes arithmétique et géométrique, min, max) sur chaque canal enregistré (taille, granulo, et différentes longueurs d'onde de fluorescence). Chaque population peut donc être définie par la valeur de la médiane sur chaque canal enregistré. Ces données peuvent être bancarisées sur Q2, et donnent « la carte d'identité » de chaque population (taille, granulosité et fluorescence dans les différents canaux). Par ailleurs, ces données peuvent être normalisées par les valeurs enregistrées sur chaque canal pour les billes en latex auto-fluorescentes de référence (ajoutées à chaque échantillon), et ainsi améliorer les comparaisons entre appareils, réglages et analystes. Ces pistes ont été explorées sur les échantillons REPHY/RHLN Cabourg 2015 (Chasselin, 2016), mais une réflexion plus poussée est nécessaire, en particulier du point de vue statistique (à discuter avec D. Soudant).

Le stockage des cytogrammes eux-mêmes ainsi que des fichiers bruts d'analyse, afin de pouvoir revenir sur les données brutes, est à discuter : en tout état de cause, il ne serait pas pertinent de les bancariser dans Q2 car ils sont trop volumineux, mais sans doute dans un espace de stockage externe (*cf.* solutions envisagées pour les données provenant du logiciel ZooPhytoImage). En revanche, il est peut être possible d'enregistrer des données numériques définissant chaque population sur les différents canaux, qui dans l'idéal pourraient être normalisées par des billes de référence.

Conclusion

Il serait souhaitable de prévoir un groupe de travail en 2017, sur les perspectives de la cytométrie en flux, éventuellement couplée avec d'autres outils tels que FlowCAM – ZooPhytoImage.

FlowCAM /ZooPhytoImage

Ce nouvel outil permet la numérisation des cellules de phytoplancton présentes dans un échantillon d'eau (par le matériel FlowCAM), puis le traitement des images obtenues (par le logiciel ZooPhytoImage). Les résultats obtenus en termes d'identification et de dénombrement s'approchent de ceux obtenus par un observateur humain, avec un gain de temps appréciable, de nombreuses informations supplémentaires (telles que les tailles des cellules permettant d'en déduire les biovolumes, etc), et une possibilité de stockage et d'archivage.

Cet outil a été développé dans le cadre de l'action n° 9 de la convention ONEMA 2013-2015, et de collaborations avec : l'Université de Mons en Belgique, et le laboratoire LOG (CNRS-ULCO) à Wimereux. Les contenus des derniers livrables fournis en février 2016 (Grosjean & Wacquet, 2016 ; Neaud-Masson *et al.*, 2016 ; Colas *et al.*, 2016) sont résumés ci-dessous.

Informations extraites des trois livrables fournis en février 2016, dans le cadre de l'action n° 9 de la convention ONEMA 2015

Cf. Grosjean & Wacquet, 2016 ; Neaud-Masson *et al.*, 2016 ; Colas *et al.*, 2016

Livrable 1 : évolution du logiciel ZooPhytoImage

Le logiciel Zoo/Phytoimage permet d'analyser des échantillons de plancton fixés numériquement, c'est-à-dire, sur base d'images obtenues à l'aide d'un appareil spécialisé comme le FlowCAM ou le FastCAM. La classification supervisée (machine learning) permet de classer de manière automatique les particules imagées dans les différents groupes taxonomiques, et d'en dériver ensuite des statistiques sur l'échantillon tout entier : dénombrement, biomasse et spectre de tailles par groupe taxonomique. Des changements majeurs ont été introduits en 2015 dans les calculs réalisés par Zoo/PhytoImage :

- le dénombrement des cellules par colonies qui permet d'exprimer les données par cellules, et non plus par colonies
- l'apprentissage actif qui permet un travail optimisé lors de la validation de la classification effectuée par l'ordinateur : en effet, au cours de la validation des résultats, le logiciel va apprendre à corriger l'erreur au fur et à mesure que le taxonomiste effectue manuellement ce travail de correction ; il en résulte une diminution importante dans la quantité de données qui doit être vérifiée par l'utilisateur
- une optimisation de la procédure de validation qui utilise désormais des outils statistiques poussés, avec par exemple une sélection des particules à vérifier déterminée d'une manière probabiliste (détection des suspects), et un algorithme de correction statistique de l'erreur implémenté sur les résultats finaux

Livrable 2 : mise en œuvre opérationnelle de l'outil FlowCAM / ZooPhytoImage

Les nombreuses numérisations réalisées en 2015 avec les trois FlowCAM présents à Ifremer (Boulogne-sur-Mer, Nantes et Arcachon) ont permis, d'une part d'alimenter les sets d'apprentissage de l'outil, d'autre part de tester son utilisation en routine. Le travail de particularisation du set global vers des sets spécifiques par façades maritimes distinctes Manche et Atlantique a été poursuivi en 2015 afin d'améliorer l'outil de reconnaissance. Une comparaison des résultats des abondances de *Dinophysis* obtenus au microscope et par l'outil optimisé a également été menée : les résultats sont prometteurs (pas de différence significative de dénombrement de *Dinophysis* entre les deux méthodes - test non paramétrique de Wilcoxon) si les corrections d'erreurs sont poursuivies jusqu'à validation manuelle de toutes les particules erronées jusqu'à environ 5 %. La livraison de la dernière version du logiciel ZooPhytoImage v5.4 fin 2015, conduit désormais à disposer d'un outil de reconnaissance opérationnel pour l'analyse en routine des échantillons collectés sur la façade

Atlantique dans le cadre du REPHY. Un catalogue illustré des images du set d'apprentissage Manche-Atlantique 4X, présente un échantillon d'images de chaque classe.

Pour ce qui concerne la bancarisation des données provenant de ZooPhytoImage, une prestation d'expertise a été menée pour proposer une architecture technique de l'ensemble de la chaîne d'acquisition et définir des spécifications d'intégration des données dans la base Quadrige. En termes d'architecture, l'espace de stockage actuel sera rapidement insuffisant. Le projet d'équipement mutualisé de calcul (supercalculateur) et de gestion de données de gros volume nommé DATARMOR, en cours de spécification au sein de l'Ifremer, a été définie comme la cible visée pour la sauvegarde des données FlowCAM et ZooPhytoImage à l'horizon de quelques années. Il a été proposé de ne bancariser dans Quadrige que des informations calculées à l'échelle du taxon, et non pas à l'échelle de la particule. Ainsi, les informations relatives aux particules n'appartenant pas aux taxons phytoplanctoniques, ne seront pas bancarisées dans Quadrige, mais resteront stockées dans le serveur, pour d'éventuelles futures utilisations ou re-jeux. De même pour l'ensemble des images produites par le FlowCAM, et pour les métriques calculées par ZooPhytoImage n'offrant pas un intérêt immédiat sur les particules phytoplanctoniques. Pratiquement, les fichiers de résultats produits par ZooPhytoImage (.RData) seront transformés par un script R en fichiers .csv, puis, via un job Talend, en fichiers Quadrilabo, directement intégrables dans Quadrige. Le référentiel Quadrige doit être complété pour intégrer les paramètres correspondant aux nouvelles métriques à intégrer, les méthodes d'analyse, etc.

Livrable 3 : évolution du matériel de numérisation, du FlowCAM au FastCAM

Le FlowCAM permet la numérisation d'un échantillon de phytoplancton avec des grossissements X10 et X4. Le premier permet une meilleure description morphologique et donc une meilleure résolution taxonomique mais avec un temps d'acquisition environ 16 fois plus long. Ainsi, pour des analyses en routine, seule une numérisation au X4 est possible. Un gain considérable serait de pouvoir réaliser une acquisition au grossissement 10X avec un temps d'analyse plus court, comparable au 4X. Un système d'imagerie rapide en flux a donc été développé en ce sens. Il a été nommé FastCAM. Le système repose sur l'utilisation d'une caméra rapide haute résolution (2 Megapixels) permettant l'acquisition à 340 images/s. Grâce à cela, il permet de numériser 10 mL d'échantillon avec un grossissement X10 en moins de 15 min. La comparaison des images à celles obtenues avec le FlowCAM en un temps équivalent au X4 montre clairement un gain à l'utilisation du FastCAM. Les perspectives sont la constitution d'un set d'apprentissage pour un couplage avec le logiciel ZooPhytoImage.

Conclusion

L'outil FlowCAM-ZooPhytoImage est implémenté sur trois LERs (Boulogne, Nantes et Arcachon) qui sont en phase de routine pour les aspects numérisations via le FlowCAM. L'utilisation du logiciel ZooPhytoImage est par contre limitée actuellement à Nadine Neaud-Masson de la coordination REPHY. Il serait souhaitable que le déploiement de ZooPhytoImage soit effectif dans les LERs BL et AR et envisagé dans d'autres LERs. En effet, il est tout à fait possible qu'un LER dépourvu de FlowCAM puisse utiliser ZooPhytoImage sur des échantillons qu'il aurait fait numériser par un labo pourvu d'un FlowCAM. Mais ceci nécessiterait une organisation à mettre en place.

Par ailleurs, le FlowCAM ayant montré ses limites, il est indispensable que la piste du FastCAM ou d'un outil similaire soit explorée plus sérieusement. Le problème de la concurrence avec la société américaine FluidImaging qui commercialise le FlowCAM, risquant de poser problème si l'on prévoit une mise en production d'un matériel qui n'est pour le moment qu'un prototype, est à solutionner, par exemple via un partenariat avec FluidImaging.

Pour ce qui concerne la bancarisation, il est nécessaire de faire un planning de ce qui pourrait être implémenté et dans quel ordre. En particulier il faudrait préciser comment les informations supplémentaires provenant de ZooPhytoImage, par ex les tailles des particules qui pourraient aboutir au calcul des biovolumes, pourraient être ajoutées rapidement.

Il est donc nécessaire de prévoir un COPIL FlowCAM / ZooPhytoImage, ou un groupe de travail spécifique, en tout début d'année 2017, pour examiner toutes ces questions.

Biodiversité génétique

Informations extraites du livrable 1 fourni en février 2016, dans le cadre de l'action n° 3 de la convention ONEMA 2015

Cf. Hernández-Fariñas *et al.*, 2016

Deux méthodes ont été utilisées pour la recherche d'un indicateur de diversité du phytoplancton : 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). Cette étude s'est basée sur les données recueillies lors de quatre campagnes d'échantillonnage : Pelgas 2012 et 2013 (Gironde), Phytex 2012 (mer d'Iroise et Bretagne sud), et Dynapse 2012 (baie de Concarneau). Trois classes de taille ont été étudiées : pico-phytoplancton 0,2-3 µm, nano-phytoplancton 3-20µm, micro-phytoplancton >20µm.

Les analyses statistiques effectuées sur les données de *metabarcoding* montrent une nette séparation des trois classes de taille étudiées et suggèrent que le pico-phytoplancton est moins variable dans l'espace-temps que le nano- et le micro-phytoplancton. 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 pico-phytoplancton nous avons retrouvé une bonne correspondance entre certains OTUs du groupe des Mamiellophyceae et la chlorophylle *b*, le pigment caractéristique de cette classe de micro-algues. 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 pico-phytoplancton. En effet, au sein du pico-phytoplancton, la chlorophylle *b* est positivement corrélée à la chlorophylle *a* totale, cette dernière étant elle-même indicatrice de la biomasse pico-phytoplanctonique 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. 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.

Conclusion

Les analyses de biodiversité génétique demandent une compétence analytique en génétique et en analyse bio-informatique particulière qui en font des analyses actuellement coûteuses et assez compliquées. L'analyse par metabarcoding ne peut donc pas être considérée comme un paramètre routinier du futur REPHY, il s'agit plutôt d'une action de soutien à la recherche.

Biomasses phytoplanctoniques en carbone

Ces vraies biomasses, obtenues à partir des dénombrements au microscope par l'acquisition du biovolume, sont de plus en plus répandues dans les réseaux d'observation européens. Elles permettent d'éliminer le biais des rapports C:CHLA trop variables. Cette méthode nécessite cependant un effort supplémentaire au moment des dénombrements, raison pour laquelle elle ne pourra pas être mise en place sur tous les points de suivi avant qu'un appareil d'identification et de dénombrement automatique ne soit opérationnel (FlowCam, FastCam, CytoSense...). D'ores et déjà, le logiciel ZooPhytoImage associé au FlowCAM fournit indirectement ce type d'informations, il reste donc à les banqueriser.

Conclusion sur les nouvelles méthodes

Si les analyses pigmentaires, ainsi que l'outil FlowCAM/zooPhytoImage sont d'ores et déjà inclus dans les paramètres et outils du REPHY, les autres méthodes d'observation du phytoplancton n'en sont pas encore à ce stade.

Les groupes de travail proposés pour chacun des paramètres, mesurés ou non encore mesurés, sont donc particulièrement importants pour mieux préciser les enjeux d'une diversification des outils, et devraient à terme conduire à une analyse coûts / bénéfiques.

Conclusion générale

L'observation et la surveillance du phytoplancton et de l'hydrologie mise en œuvre par Ifremer dans les eaux littorales a été clarifiée et optimisée pour aboutir en 2016 à un système plus resserré et qui devrait être plus efficace pour répondre aux différents objectifs de chacune des trois composantes du REPHY (REPHY Observation, REPHY Surveillance, REPHY Sanitaire). Les liens entre le REPHY national et les réseaux régionaux sont désormais éclaircis et leurs missions respectives précisément définies. Enfin, les principes et les critères qui ont fondé cette optimisation ont été décrits afin d'en garder un historique.

L'optimisation en termes de stratégie d'échantillonnage a conduit à ne garder que les lieux de prélèvement pertinents. Ainsi, le nombre de lieux utilisés pour la surveillance globale phytoplancton-hydrologie (REPHY et réseaux régionaux), a été réduit de 27% entre fin 2013 et mi 2016. Ceci a permis de reconcentrer l'effort vers des stratégies d'échantillonnage plus adaptées, et d'offrir une ouverture vers de nouvelles mesures.

Concomitamment, la typologie des lieux a été précisée, afin que pour chaque lieu, le ou les objectifs auxquels il doit répondre soient clairement établis. L'application de cette typologie à chacun des lieux est détaillée dans le Tome 2.

Une revue systématique des paramètres historiquement mesurés a consisté à décrire pour chacun de ces paramètres : un bref historique, les méthodes d'analyse utilisées, les laboratoires analystes, les critères de bancarisation, les modifications mises en œuvre en 2016, les modifications et améliorations à prévoir, ainsi que les actions qu'il serait utile de mener en 2017.

D'autres paramètres ont des potentialités intéressantes : une description des avancées et des perspectives en est donc faite. Parmi ces nouveaux paramètres, les analyses pigmentaires tiennent une place particulière, puisqu'elles sont d'ores et déjà mises en œuvre sur certains points du REPHY. De même que l'outil FlowCAM-ZooPhytoImage, qui est également implémenté sur trois LERs.

L'extension de mesures existantes à des nouvelles zones géographiques (cas des nutriments en eaux côtières méditerranéennes), ou la mise en œuvre de nouvelles mesures (cas des pigments) pose à chaque fois le problème de la prise en compte des analyses supplémentaires : quel laboratoire possédant l'équipement adéquat, les capacités techniques et les moyens humains, est capable de prendre en charge un surplus d'analyses, dans un délai raisonnable ? Il est évident que ceci ne peut être fait sans une anticipation importante et une vision à moyen et long terme en termes d'investissement matériel et de moyens humains.

Bibliographie

ARTIGAS L.F., DIDRY M., BONATO S., FENAUX A., PREVOST E., & BRETON E., 2016. Propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basé sur les résultats de cytométrie en flux. Convention Ifremer / Onema 2015. Action 3 – Indice composition - Livrable 2. Février 2016. 39 p.

BELIN C., 2013. Note : Lignes directrices pour l'optimisation REPHY, à court terme (2013). Note, mars 2013. 10 pages

BELIN C., 2015. Réunion Coordination REPHY et PELAGOS. REPHY 2015 et fiche ONEMA Indice composition. Brest, 2 et 3 février 2015. CR diffusé le 26 février 2015. 6 p.

BELIN C. & LAMPERT L., 2016. Mise en place d'analyses pigmentaires dans le cadre du REPHY Observation. Contribution à la finalisation d'un indice composition pour la DCE. Note technique. Version provisoire. ODE/VIGIES et PELAGOS, août 2016, 27 p.

BELIN C., DANIEL A. & NEAUD-MASSON N., 2016. Echantillonnage des nutriments dans le cadre du REPHY Observation. Conclusions tenant compte de la visio-conférence sur les nutriments du 15 mars 2016 et des échanges ultérieurs. Note technique, ODE/VIGIES, juin 2016, 17 p.

BELIN C., LAMOUREUX A. & SOUDANT D., 2014a. Evaluation de la qualité des eaux littorales de la France métropolitaine pour l'élément de qualité Phytoplancton dans le cadre de la DCE. Etat des lieux des règles d'évaluation, et résultats pour la période 2007-2012. Rapport DYNECO / VIGIES / 14-05, avril 2014.

Tome 1 - Etat des lieux, méthodes et synthèse des Résultats

<http://envlit.ifremer.fr/content/download/81901/580117/version/3/file/Evaluation+DCE+phytoplancton+2007-2012+--+Tome+1.pdf>

Tome 2 - Résultats détaillés : fiches par masse d'eau et éléments d'expertise

<http://envlit.ifremer.fr/content/download/81902/580120/version/4/file/Evaluation+DCE+phytoplancton+2007-2012+--+Tome+2.pdf>

BELIN C., LEFEBVRE A., DANIEL A., DELMAS D., LAMPERT L., SIANO R., BRUN M., NEAUD-MASSON N., SOUDANT D., 2014b. REPHY futur pour phytoplancton et hydrologie. Eléments de réflexion. CR de la visio-conférence du 9 juillet 2014.

BELIN C., LEFEBVRE A., MENET-NEDELEC F., AUBY I., TRUT G. & DEROLEZ V., 2015. Surveillance phytoplancton et hydrologie 2015. REPHY et réseaux régionaux. Note diffusée le 26 février 2015.

BELIN C., SOUDANT D., HERNANDEZ-FARINAS T. & BRUN M., 2014c. Document de travail en vue de la description du Réseau d'Observation et du Réseau Optimisé pour le phytoplancton et l'hydrologie. Etat détaillé des lieux de prélèvement phyto – hydro des réseaux REPHY, SRN, RHLN et ARCHYD et premières propositions.

CHASSELIN L., 2016. La cytométrie en flux appliquée à l'étude des micro-organismes marins: pico/nanophytoplancton, bactéries hétérotrophes et particules virales. Rapport de stage, Technicien Supérieur de la Mer 2^{ème} année, Intechmer, Cherbourg. 35pp.

CLAQUIN P., ARTIGAS L.F., BELIN C., DEL AMO Y., RIGAUT-JALABERT F., RIOU P. & SIMON N., 2016. Compte rendu Atelier Phytoplancton - Labellisation SOMLIT & Collaboration REPHY-Observation. Station Marine de Luc-sur-Mer – CREC- Université de Caen – Normandie, 24 au 26 novembre 2015. 7 p.

COLAS F., TARDIVEL M., EVRARD J., FOREST B., CRASSOUS M.P., LUNVEN M. & DANIELOU M.M., 2016. Evolution du matériel de numérisation : prototype FastCAM et perspectives. Convention Ifremer / Onema 2015. Action 9 - FlowCAM / ZooPhytoImage - Livrable 3. Rapport final, février 2016. 42 p.

GOFFART A., 2013. Validation de l'indice de composition phytoplanctonique IC Medit dans des masses d'eau côtières méditerranéennes caractérisées par un gradient croissant d'eutrophisation. Convention Ifremer / Onema 2012. Action Méthodes de bio-indication en eaux littorales. Indicateur phytoplancton et physico-chimie - Livrable A4. 29 p. Rapport intermédiaire, février 2013.

GOFFART A., 2014. Validation de l'indice composition IC Medit pour les eaux côtières de Corse et de la région PACA. Convention Ifremer / Onema 2013. Action 3. Indice Composition. Livrable n° B. 30 p. Rapport final, juillet 2014.

GREGORI G., COLOSIMO A. & DENIS M., 2001. Phytoplankton group dynamics in the Bay of Marseilles during a 2-years survey based on analytical flow cytometry. *Cytometry*, 44:247-256.

GROSJEAN Ph. & WACQUET G., 2016. Version évolutive de l'outil opérationnel de numérisation et d'analyse semi-automatique d'images de phytoplancton, utilisant le matériel FlowCAM et le logiciel Zoo/PhytoImage. Nouvelles perspectives. Convention Ifremer / Onema 2015. Action 9 - FlowCAM / ZooPhytoImage. Livrable 1. Rapport final, février 2016. 120 p.

HERNANDEZ-FARINAS T., 2015. Analyse et modélisation des évolutions à long terme de la biodiversité phytoplanctonique dans les zones côtières sous l'effet des pressions environnementales et anthropiques. Thèse de Doctorat. Université de Nantes. Faculté des Sciences et des Techniques. École Doctorale VENAM (Végétal-Environnement-Nutrition-Agroalimentaire-Mer). Discipline Océanologie Biologique. Spécialité Biologie et écologie côtières. 353 p.

HERNANDEZ-FARINAS T., BRUN M., SIANO R. & DELMAS D., 2016. Propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basé sur les résultats des méthodes microscopie, pigments et diversité génétique. Convention Ifremer / Onema 2015. Action 3 - Indice Composition - Livrable 1. Rapport final, février 2016. 68 p.

JEGOU K., 2013. Identification satellitaire des efflorescences de deux dinoflagellés, *Lepidodinium chlorophorum* et *Karenia mikimotoi*, grâce à leurs caractéristiques optiques. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00158/26912/>

LAMPERT L., 2015. Test d'un Indice de composition pigmentaire pour les secteurs Atlantique et Manche (DCE)

Rapport DCE. R.INT.DIR ODE/DYNECO/PELAGOS 2015-02. 56 p.

<http://archimer.ifremer.fr/doc/00254/36556/>

in Premières propositions pour un indice de composition du phytoplancton, basé sur les résultats des méthodes pigments et diversité génétique - Convention Ifremer / Onema 2014 - Action 3 - Indice Composition - Livrable 1.

MARIE D., RIGAUT-JALABERT F., VAULOT D., 2014. An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples. *Cytometry Part A*, 85 (11): 962-968.

NEAUD-MASSON N. & BELIN C., 2016. Cahier de Procédures REPHYTOX. Document de prescription. Version 1. Rapport ODE/VIGIES/16-08, juin 2016, 48 p.

http://envlit.ifremer.fr/content/download/83181/601705/version/9/file/Cahier-Procédures-REPHYTOX_v1.pdf

NEAUD-MASSON N., LEFEBVRE A., BELIN C., GAUTHIER E., HUGUET A., SZIDON A., LEFEBVRE A. & CUVELLIEZ R., 2016. Mise en oeuvre opérationnelle de l'outil FlowCAM-Zoo/PhytoImage dans le cadre de la surveillance REPHY. Résultats sur 12-18 mois.. Convention Ifremer / Onema 2015. Action 9 - FlowCAM / ZooPhytoImage - Livrable 2. Rapport final, février 2016. 266 p.

SCHAPIRA M., BUSCOT M.J., POLLET T., LETERME S.C., CHAPERON C. & SEURONT L., 2009. Distribution of heterotrophic bacteria and virus-like particles along a salinity gradient in a hypersaline coastal lagoon. *Aquatic Microbial Ecology* 54: 171-183.

SCHAPIRA M., BUSCOT M.J., POLLET T., LETERME S.C. & SEURONT L., 2010. Distribution of picophytoplankton communities from brackish to hypersaline waters in a South Australian coastal lagoon. *Saline Systems* 6: 2.

SCHAPIRA M. & SEURONT L., 2013. Picophytoplankton community structure in a hypersaline coastal lagoon: Role of salinity and links with viral and microbial communities. *In* : Cyanobacteria : Ecology, toxicology and management, Aloysio Da S. Ferrão-Filho (ed.) : 111-138 pp.

THYSSEN M., BECKER B., EDIGER D., YILMAZ D., GARCIA N., DENIS M., 2011. Phytoplankton distribution during two contrasted summers in a Mediterranean harbour: combining automated submersible flow cytométrie with conventional techniques. *Environmental Monitoring Assessment* 173: 1-16.

VAN HEUKELEM L. & THOMAS C.S., 2001. « Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments ». *Journal of Chromatography A* 910 (1): 31-49. doi:10.1016/S0378-4347(00)00603-4.

VAQUER A., TROUSSELLIER M., COURTIES C., & BIBENT B., 1996. Standing stock and dynamics of picophytoplankton in the Thau lagoon (northwest Mediterranean coast). *Limnol. Oceanogr.* Vol.41 n°8 pp1821-1828.

WRIGHT S.W., JEFFREY S.W., MANTOURA R.F.C., LLEWELLYN C.A., BJORNLAND T., REPETA D. & WELSCHMEYER N., 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 77: 183-196.

ZAPATA M., RODRIGUEZ F., & GARRIDO J.L., 2000. « Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases ». *Marine Ecology Progress Series* 195: 29-45. [doi:10.3354/meps195029](https://doi.org/10.3354/meps195029).

Annexe 1 : Sigles et acronymes

Directives européennes

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

DCSMM : Directive Cadre Stratégie Milieu Marin

Réseaux

REPHY : Réseau d'Observation et de Surveillance du Phytoplancton et de l'Hydrologie dans les eaux littorales

- **REPHY Observation** : partie du REPHY, ciblé sur un objectif recherche
- **REPHY Surveillance** : partie du REPHY, complétant le REPHY Observation, pour répondre aux Directives européennes (DCE et DCSMM)
- **REPHY ETUDES** : programme Quadrige créé en 2016 rassemblant des études comportant des paramètres similaires à ceux du REPHY, mais sur une durée limitée

REPHYTOX : Réseau de Surveillance des Phycotoxines dans les organismes marins

SRN : Suivi Régional des Nutriments, en Artois Picardie

RHLN : Réseau Hydrologique du Littoral Normand

ARCHYD : Arcachon Hydrologie

RSLHYD/OBSLAG : Observatoire Lagunes en Méditerranée

Stratégies REPHY

PhyTot : Phytoplancton Total

PhyInd : Phytoplancton Indicateur

PhyTox : Phytoplancton Toxique

LER : laboratoire Ifremer Environnement Ressource

LER BL : Boulogne

LER N : Port en Bessin

LER BN : Dinard

LER BO : Concarneau

LER MPL TM : La Trinité

LER MPL NT : Nantes

LER PC : L'Houmeau

LER AR : Arcachon

LER LR : Sète

LER PAC TL : La Seyne sur mer

LER PAC CO : Bastia

Autres laboratoires Ifremer

ODE VIGIES : Océanographie et Dynamique des Ecosystèmes – Valorisation de l'Information pour la Gestion Intégrée Et la Surveillance

DYNECO PELAGOS : Dynamique des Ecosystèmes Côtiers - Pelagos

Organismes

ONEMA : Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques

AEAP : Agence de l'Eau Artois Picardie

AESN : Agence de l'Eau Seine Normandie

AELB : Agence de l'Eau Loire Bretagne

AEAG : Agence de l'Eau Adour Garonne

AERMC : Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse

ASSOO : Association O d'Ouessant

CQEL : Cellule Qualité Eaux Littorales

CRC-PDL : Comité Régional de la Conchyliculture des Pays de la Loire

CSLN : Cellule de Suivi du Littoral Normand

GIPRE : Groupe d'Intérêt pour la Réhabilitation de l'Etang de Berre

MINYVEL44 : MINYVEL44

P2A34 : P2A Développement : Pêche, Aquaculture, Aquariotechnique

RN_CAMARGUE : Réserve Nationale de Camargue

SMEL : Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral

SNSM17-TREMB : Société Nationale de Sauvetage en Mer de La Tremblade (17)

SPEL : Service Police Eaux Littorales

STARESO : Station de Recherches Sous-marines et Océanographiques

SYMEL : Syndicat Mixte Espaces Littoraux de la Manche

VILLEFRANCHE : Station marine de Villefranche sur mer (Paris VI)

Autres

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

IR ILICO : Infrastructure de Recherche Littorale et Côtière

QUADRILABO : outil permettant d'intégrer des données dans Quadriga à partir d'un fichier EXCEL

Annexe 2 : Récapitulatif de l'optimisation de la surveillance Phytoplancton et Hydrologie en 2014 et 2015

Les critères de choix utilisés pour l'élaboration de la liste des lieux retenus, ainsi que les principales étapes du travail réalisé entre mi 2014 et fin 2015, sont décrits en détail ci-dessous.

Elaboration de la liste des lieux retenus

Dans une première étape, l'optimisation a consisté à épurer le réseau des lieux échantillonnés, en sauvegardant le « mieux » de ce qui existait, au regard des réponses que les données acquises sur ces lieux pouvaient apporter sur diverses problématiques. Chaque lieu d'échantillonnage conservé devait pouvoir répondre aux objectifs fixés pour l'un et/ou l'autre des niveaux Réseau d'Observation / Réseau Surveillance, sachant que les exigences sont plus fortes pour le Réseau d'Observation. Dans le contexte actuel, ceci n'a pas pu se faire sans une réduction plus ou moins drastique des lieux existants, et une remise à plat des stratégies d'échantillonnage et des paramètres mesurés sur chacun des lieux conservés.

Critères de choix

Les propositions faites par la coordination REPHY en juillet 2014 pour le devenir de chaque lieu d'échantillonnage se sont essentiellement basées sur :

- les travaux de Dominique Soudant, donnant un rang à chaque série de données chlorophylle par lieu et par niveau d'échantillonnage : voir détails dans l'**annexe 2 bis**
- les travaux de Tania Hernández-Fariñas, donnant un rang à chaque série de données phytoplancton (flores totales et flores indicatrices), par lieu : voir détails dans l'**annexe 2 ter**

En effet, ces deux paramètres (chlorophylle et phytoplancton dénombré) sont les plus importants pour les études portant sur la biomasse, l'abondance et la biodiversité du phytoplancton. Même si les paramètres physico-chimiques et les nutriments sont cruciaux pour l'interprétation de ces données, il a été considéré que le choix serait principalement guidé à partir d'un compromis entre le rang pour la chlorophylle et le rang pour le phytoplancton.

Pour les réponses faites par les LERs entre août et octobre 2014 sur ces propositions, des critères supplémentaires ont également été pris en compte, en particulier :

- la représentativité géographique du lieu : celui-ci peut-il représenter une large zone, ou bien est-il plutôt représentatif d'une zone très locale ?
- la redondance de séries entre elles : peut-on envisager la suppression d'une série au regard de l'historique connu sur deux séries proches (géographiquement et en termes de données) ?
- la variabilité de la série : une variabilité importante peut être un critère pour ne pas retenir une série alors qu'une autre série proche est moins soumise aux changements hydrodynamiques

- l'utilisation d'un lieu pour des programmes de recherche ou pour des réseaux régionaux avec d'autres objectifs
- la proximité ou non d'un système de mesure à haute fréquence (Marel, etc)
- les relations fructueuses avec des partenaires universitaires, et la proximité de sites SOMLIT ou RESOMAR avec possibilité d'échanges de données

Entre novembre 2014 et mi 2015, le travail a continué entre la coordination REPHY et chacun des LERs, afin de définir précisément :

- les lieux retenus pour le Réseau d'Observation, avec les échéanciers pour que ces lieux respectent, s'ils ne le font pas déjà, les exigences requises pour ce REPHY Observation, en particulier en termes de fréquences d'échantillonnage et de paramètres associés
- parmi ces lieux du REPHY Observation, les quelques lieux « clés » qui pourraient devenir supports de nouvelles mesures
- les lieux retenus pour répondre à la DCE en supplément des lieux Observation, sachant que ces lieux répondent tous déjà aux exigences requises par la DCE (exigences décrites dans Belin *et al.*, 2014a). A noter que dans certains cas, il est demandé explicitement de s'en tenir à ces exigences et de ne pas en faire plus, afin de porter l'effort vers le REPHY Observation
- les lieux retenus pour le REPHY sanitaire au sens strict, sachant que certains lieux apparaissant comme actifs en 2014 n'étaient plus échantillonnés depuis des années

Par ailleurs, la réflexion sur l'amélioration des paramètres existants (chlorophylle par ex.) et la mise en place de nouveaux paramètres complémentaires a continué avec DYNECO / PELAGOS (Belin, 2015).

Annexe 2 bis. Rang des séries chlorophylle-a – Travaux Dominique Soudant

Les critères utilisés pour déterminer le rang de chaque série de données chlorophylle ont été les suivants :

- dernière année de suivi
- nombre de tranches de dix années de suivi : ce critère ainsi calculé évite la discrimination trop fine qui résulterait de la prise en compte du nombre d'années de suivi
- nombre de dizaines de pour cents de données présentes, relativement à une unité de temps choisie arbitrairement comme la semaine
- nombre de données par an

Les informations sur les séries chlorophylle disponibles dans les données des réseaux REPHY, SRN, RHLN et ARCHYD, et le tableau synthétique du rang calculé pour chacune des séries sont disponibles dans Belin *et al.*, (2014c)

Un filtrage est ensuite effectué (dans le fichier résultant) pour ne pas tenir compte des séries répondant à des critères non acceptables :

- supprimer les séries sur une seule année
- une série doit avoir au moins 104 données (une fois par semaine pendant deux ans)
- supprimer les séries avec le plus gros gap > 20% de la série totale
- supprimer les séries dont la dernière année de mesure n'est pas dans les cinq dernières années

Les informations sur les rangs des séries temporelles conservées après ces traitements ont été introduites dans le document détaillé transmis aux LERs en juillet 2014 (Belin *et al.*, 2014c)

Annexe 2 ter. Rang des séries Flores Totales et Flores Indicatrices – Travaux Tania Hernández-Fariñas

Les critères utilisés pour déterminer le rang de chaque série de données Flores Totales et Flores Indicatrices ont été choisis pour être cohérents avec ceux choisis pour la chlorophylle :

- dernière année de suivi
- nombre de tranches de dix années de suivi : ce critère ainsi calculé évite la discrimination trop fine qui résulterait de la prise en compte du nombre d'années de suivi
- nombre de dizaines de pour cents de données présentes, relativement à une unité de temps choisie arbitrairement comme le mois
- nombre de données par an

Les informations sur les séries Flores Totales et sur les séries Flores Indicatrices disponibles dans les données des réseaux REPHY, SRN et RHLN, et le tableau synthétique du rang calculé pour chacune des séries sont disponibles dans Belin *et al.*, (2014c)

Un filtrage est ensuite effectué pour éliminer les séries répondant à des critères non acceptables (similaires à ceux retenus pour la chlorophylle) :

- supprimer les séries sur une seule année
- une série doit avoir au moins 24 données (une fois par mois pendant deux ans)
- supprimer les séries dont la dernière année de mesure n'est pas dans les cinq dernières années

Les informations sur les rangs des séries temporelles conservées après ces traitements ont été introduites dans le dans le document détaillé transmis aux LERs en juillet 2014 (Belin *et al.*, 2014c)

Annexe 3 : Bancarisation

Paramètres historiquement mesurés

La bancarisation des résultats dans Quadrigé est assurée via le référentiel des PSFMs (Paramètres-Supports-Fractions-Méthodes). Pour chaque paramètre sont listées ci-dessous les différentes combinaisons de PSFMs utilisées, dans le cadre des programmes REPHY et réseaux régionaux.

Ces informations sont extraites des stratégies de ces différents programmes : **les questions en rouge sont à examiner.**

Nutriments

Paramètre code	Paramètre libellé	Support	Fraction	Méthode	Commentaire
NH4	Ammonium	Eau filtrée	Sans objet	Fluorimétrie flux (Aminot A. Kérouel R. 2007 - Ammonium)	Méthode recommandée , utilisée par les quatre LERs accrédités, par LER BL pour le point REPHY-SRN Bif (échantillons hors DCE) et par STARESO
NH4	Ammonium	Eau filtrée	Sans objet	Spectrophotométrie flux (Aminot A. Kérouel R. 2007 - Ammonium)	Méthode utilisée par le LER LR pour quatre points lagunes dans le cadre du RSLHYD
NH4	Ammonium	Eau filtrée	Sans objet	Spectrophotométrie manuelle (Aminot et Chaussepied 1983 - Ammonium)	Méthode utilisée pour analyses faites par le LER BL pour les six points SRN stricts, et par le SMEL
NO3+NO2	Nitrate + nitrite	Eau filtrée	Sans objet	Spectrophotométrie flux (Aminot A. Kérouel R. 2007 - Nitrite + nitrate)	Méthode recommandée , utilisée par les quatre LERs accrédités, par le LER BL et par STARESO
NO3+NO2	Nitrate + nitrite	Eau filtrée	Sans objet	Spectrophotométrie manuelle (Aminot et Chaussepied 1983 - Nitrite + nitrate)	Méthode utilisée pour analyses faites par le SMEL
PO4	Phosphate	Eau filtrée	Sans objet	Spectrophotométrie flux (Aminot A. Kérouel R. 2007 - Phosphate)	Méthode recommandée , utilisée par les quatre LERs accrédités, par le LER BL et par STARESO
PO4	Phosphate	Eau filtrée	Sans objet	Spectrophotométrie manuelle (Aminot et Chaussepied 1983 - Phosphate)	Méthode utilisée pour analyses faites par le SMEL
SIOH	Silicate	Eau filtrée	Sans objet	Spectrophotométrie flux (Aminot A. Kérouel R. 2007 - Silicate)	Méthode recommandée , utilisée par les quatre LERs accrédités, par le LER BL et par STARESO
SIOH	Silicate	Eau filtrée	Sans objet	Spectrophotométrie manuelle (Aminot et Chaussepied 1983 - Silicate)	Méthode utilisée pour analyses faites par le SMEL

Chlorophylle

Paramètre code	Paramètre libellé	Support	Fraction	Méthode	Commentaire
CHLOROA	Chlorophylle a	Masse d'eau, eau brute	Phase particulaire $\geq 0.7 \mu\text{m}$	Spectrophotométrie monochromatique (Aminot A. Kérouel R. 2004 - Chlorophylle)	Une des deux méthodes recommandées , utilisée par la majorité des LERs et par le SMEL
CHLOROA	Chlorophylle a	Masse d'eau, eau brute	Phase particulaire $\geq 0.7 \mu\text{m}$	Fluorimétrie (Aminot A. Kérouel R. 2004 - Chlorophylle)	Une des deux méthodes recommandées , utilisée par les LERs PC, AR et TL
CHLOROA	Chlorophylle a	Masse d'eau, eau brute	Phase particulaire $\geq 1.2 \mu\text{m}$	Spectrométrie d'absorption moléculaire (NF T90-117 1999 - Chlorophylle)	Méthode utilisée pour analyses faites par LABOCEA-GIP (sept points)
CHLOROA	Chlorophylle a	Masse d'eau, eau brute	Phase particulaire $\geq 0.7 \mu\text{m}$	Spectrofluorimétrie (Neveux et Lantoiné, 1993)	Méthode utilisée pour analyses faites par ECOSYM (points dans lagunes)

Les Phéopigments sont analysés selon les mêmes méthodes

Paramètres physico-chimiques

Paramètre code	Paramètre libellé	Support	Fraction	Méthode	Commentaire
TEMP	Température de l'eau	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Capteur de température in situ	Méthode recommandée , utilisée par tous (LERs et partenaires)
SALI	Salinité	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Capteur de conductivité in situ	Méthode recommandée , utilisée par tous (LERs et partenaires)
TURB	Turbidité	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Turbidimètre optique (lumière blanche - TURB) dans échantillon	Méthode utilisée par LER BL (pour REPHY + SRN), SMEL, SPEL44
TURB-FNU	Turbidité FNU	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Capteur turbidimètre norme ISO 7027 in situ	Une des deux méthodes recommandées , utilisée par trois LERs et quatre partenaires
TURB-FNU	Turbidité FNU	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Turbidimètre optique (ISO 7027 - TURB FNU) dans échantillon	Une des deux méthodes recommandées , utilisée par huit LERs et deux partenaires
OXYGENE	Oxygène dissous	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Capteur oxygène à luminescence mg/l	Méthode recommandée , utilisée par presque tous les LERs et partenaires
OXYGENE	Oxygène dissous	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Capteur oxygène à membrane électrochimique mg/l	Méthode utilisée par CSLN, LER LR, P2A34, GIPRE, RN-CAMARGUE et PAC CO

Annexe 4 : Référentiel Quadrige existant pour les analyses pigmentaires

Ce référentiel a été décrit par Luis Lampert. 2769 PSFMs sont décrits correspondant à 71 paramètres x 13 fractions x 3 méthodes.

Les 71 paramètres sont les suivants :

Allo	Alloxanthin
Anth	Antheraxanthin
Asta	Astaxanthin
Auro	Auroxanthin
Bchla	Bacteriochlorophyll a
beta,beta-Car	beta,beta-Carotene (beta carotène)
beta,epsilon-Car	beta,epsilon-Carotene (alpha carotène)
beta,psi-Car	beta,psi-Carotene
But-fuco	19'-Butanoyloxyfucoxanthin
Calo	Caloxanthin
Cantha	Canthaxanthin
Chlide-a	Chlorophyllide a
Chlide-b	Chlorophyllide b
CHLOROA	Chlorophylle a
CHLOROA'	Chlorophyll a epimer
CHLOROA-allo	Chlorophyll a allomer
CHLOROB	Chlorophyll b
CHLOROB'	Chlorophyll b epimer
CHLOROC1	Chlorophyll c1
CHLOROC1+C2	Chlorophyll c1 + Chlorophyll c2
CHLOROC2	Chlorophyll c2
CHLOROC2-MGDG_14:0-14:0	Chlorophyll c2-monogalactosyldiacylglyceride ester [14:0/14:0]
CHLOROC2-MGDG_18:4-14:0	Chlorophyll c2-monogalactosyldiacylglyceride ester [18:4/14:0]
CHLOROC3	Chlorophyll c3
CHLOROD	Chlorophyll d
C-neo	9'-cis-Neoxanthin
C-neochr	9'-cis-Neochrome
Croco	Crocoxanthin
Cryp	Cryptoxanthin
Dhlut	Dihydrolutein
Diadchr	Diadinochrome
Diadino	Diadinoxanthin
Diato	Diatoxanthin
Dino	Dinoxanthin
DVCHLOROA	Divinyl chlorophyll a
DVCHLOROB	Divinyl chlorophyll b
Echin	Echinenone
epsilon,epsilon-Car	epsilon,epsilon-Carotene
Eutr	Eutreptiellanone
Fuco	Fucoxanthin
Gyro-de	Gyroxanthin dodecanoate ethanoate
Hex-fuco	19'-Hexanoyloxyfucoxanthin
Hex-kfuco	19'-hexanoyloxy-4-ketofucoxanthin
Loro	Loroxanthin
Loro-d	Loroxanthin dodecanoate
Lut	Lutein
Lyco	psi,psi-Carotene (Lycopene)

Mg-DVP	Magnesium 2,4-dyvinilpheoporphyrin a5 monomethyl ester
Micral	Micromonal
Microl	Micromonol
Monado	Monadoxanthin
Mutato	Mutatoxanthin
MV-CHLOROC3	Monovinyl Chlorophyll C3
Myxo	Myxol quinoside
Nosto	Nostoxanthin
Oscil	Oscillol diquinoside
Peri	Peridinin
Phe-a	Pheophytin a
Phe-b	Pheophytin b
Pheide-a	Pheophorbide a
Pphe-a	Pyropheophytin a
Ppheide-a	Pyropheophorbide a
Pras	Prasinoxanthin
Siph	Siphonaxanthin
Siph-do	Siphonaxanthin dodecenote
T-neo	all-trans-Neoxanthin
Uri	Uriolide
Vauch	Vaucheriaxanthin
Vauch-eo	Vaucheriaxanthin ethanoate octanoate
Viola	Violaxanthin
Zea	Zeaxanthin

Les 13 fractions sont les suivantes :

Phase particulaire $\geq 0.35 \mu\text{m}$
Phase particulaire $\geq 0.45 \mu\text{m}$
Phase particulaire $\leq [0.45-200[\mu\text{m}$
Phase particulaire $\geq 0.7 \mu\text{m}$
Phase particulaire $\geq 1.2 \mu\text{m}$
Phase particulaire $\geq 20 \mu\text{m}$
Phase particulaire $[0.7-1[\mu\text{m}$
Phase particulaire $[0.7-10[\mu\text{m}$
Phase particulaire $[0.7-20[\mu\text{m}$
Phase particulaire $[0.7-3[\mu\text{m}$
Phase particulaire $\geq 1 \mu\text{m}$
Phase particulaire $\geq 10 \mu\text{m}$
Phase particulaire $\geq 3 \mu\text{m}$

Les trois méthodes sont les suivantes :

Chromatographie liquide - pigments phytoplanctoniques (Van Heukelem et Thomas 2001)
Chromatographie liquide - pigments phytoplanctoniques (Wright et al. 1991)
Chromatographie liquide - pigments phytoplanctoniques (Zapata et al. 2000)

L'unité est systématiquement : $\mu\text{g.l}^{-1}$

Annexe 5. Référentiel Quadrigé existant pour les analyses de cytométrie en flux

Six PSFMs (surlignés en violet dans le tableau) correspondent à la bancarisation des données du RSL (méthode Vaquer et al., 1996), dont trois (NANOSUP3, PEUKINF3 et PCYAN) séparent le nano et le pico-phytoplancton à 3 μm , les autres à 2 μm .

Onze PSFMs correspondent actuellement à la bancarisation des données DOMs, et plus globalement à la bancarisation des données provenant des analyses faites au PRECYM à Marseille (méthode Grégori et al., 2001). Le nano et le pico-phytoplancton sont séparés à 2 μm .

Paramètre		Support	Fraction	Méthode	Unité
NANO-CRYPTOPHYCEES	Nanophytoplancton > 2 μm - Cryptophycées	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (Gregori et al., 2001)	n(cellules)/mL
NANO-CYANOFIL	Nanophytoplancton > 2 μm - Cyanobactéries filamenteuses	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (Gregori et al., 2001)	n(cellules)/mL
NANO-EUCARYOTE	Nanophytoplancton > 2 μm - Eucaryotes	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (Gregori et al., 2001)	n(cellules)/mL
NANOSUP3	Nanophytoplancton (>3 μm)	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (RSL, Vaquer et al. 1996)	10.E+6 cellules.l-1
NANO-TOT-SUP2	Nanophytoplancton total > 2 μm	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (Gregori et al., 2001)	n(cellules)/mL
NANO-TOT-SUP2	Nanophytoplancton total > 2 μm	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (RSL, Vaquer et al. 1996)	10.E+6 cellules.l-1
PCYAN	Picophytoplancton procaryote (<3 μm)	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (RSL, Vaquer et al. 1996)	10.E+6 cellules.l-1
PEUKINF3	Picophytoplancton eukaryote (<3 μm)	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (RSL, Vaquer et al. 1996)	10.E+6 cellules.l-1
PICO-CYANO-TOT	Picophytoplancton < 2 μm - Total cyanobactéries	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (Gregori et al., 2001)	n(cellules)/mL
PICO-CYANO-TOT	Picophytoplancton < 2 μm - Total cyanobactéries	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (RSL, Vaquer et al. 1996)	10.E+6 cellules.l-1
PICO-CYA-PROCHLO	Picophytoplancton < 2 μm - Cyanobactéries faible fluorescence - Prochlorococcus	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (Gregori et al., 2001)	n(cellules)/mL
PICO-CYA-SYNECHO	Picophytoplancton < 2 μm - Cyanobactéries fluorescence intermédiaire et forte - Synechococcus	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (Gregori et al., 2001)	n(cellules)/mL
PICO-CYA-SYNECHO-1	Picophytoplancton < 2 μm - Cyanobactéries fluorescence intermédiaire - Synechococcus	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (Gregori et al., 2001)	n(cellules)/mL
PICO-CYA-SYNECHO-2	Picophytoplancton < 2 μm - Cyanobactéries forte fluorescence - Synechococcus	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (Gregori et al., 2001)	n(cellules)/mL
PICO-EUCARYOTE	Picophytoplancton < 2 μm - Eucaryotes	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (Gregori et al., 2001)	n(cellules)/mL
PICO-TOT-INF2	Picophytoplancton total < 2 μm	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (Gregori et al., 2001)	n(cellules)/mL
PICO-TOT-INF2	Picophytoplancton total < 2 μm	Masse d'eau, eau brute	Sans objet	Cytométrie en flux (RSL, Vaquer et al. 1996)	10.E+6 cellules.l-1

Attention : les unités sont différentes entre les deux méthodes Vaquer *et al.* et Grégori *et al.*