



NOTE DE SYNTHÈSE Convention CNRS-IFREMER

Synthèse bibliographique sur les techniques de suivi de l'abondance, biomasse et diversité du phytoplancton en eaux marines



Mathias BROUTIN
Guillaume CAFFIER
Farida MADI
Luis Felipe ARTIGAS

Sommaire

1	Introduction	2
2	Les techniques les plus utilisées	3
2.1	La microscopie	3
2.2	Mesure de la chlorophylle a et des pheopigments	4
2.2.1	La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)	4
2.2.2	La spectrophotométrie et la fluorimétrie	4
2.2.3	Methodes satellitales	6
2.3	Méthodes moleculaires	6
2.4	Mesures automatisées	6
2.5	La cytométrie en flux	7
2.6	Observations	7
3	La cytométrie en flux, une technique d'avenir ?	8
3.1	Contexte	8
3.2	FACS	8
3.3	Le FlowCAM	8
3.4	Le CytoSense	9
3.4.1	Le CytoSub	9
3.4.2	Le FlowCytoBot et le CytoBuoy	10
3.5	Observation	11
4	La complémentarité des méthodes	11
4.1	Cytométrie en flux et microscopie	11
4.2	HPLC et microscopie	12
4.3	Comparaison hplc et cytométrie en flux	12
4.4	Cytométrie en flux et technique du C ¹⁴	12
4.5	Microscopie, spectrophotométrie, spectrofluorimétrie et cytométrie en flux	13
4.6	Comparaison entre techniques	13
4.7	Méthodes satellitales et HPLC, cytométrie en flux et fluorimétrie	13
4.8	Observations	14
5	Synthèse	14
6	Annexes	16
7	Références	21

1 INTRODUCTION

Le phytoplancton est composé de l'ensemble du plancton végétal, c'est-à-dire des microorganismes photosynthétiques (Jeffrey et *al.* 1997a) dérivant dans les masses d'eaux. Il s'agit de cellules, colonies ou filaments dont les mouvements dépendent essentiellement de ceux de l'environnement aquatique et/ou qui sont mobiles mais dont les déplacements sont relativement restreints dans la masse d'eau.

Il existe deux types de phytoplancton selon la présence ou non d'un noyau cellulaire (respectivement Eucaryote et Procaryote), appartenant aux domaines taxonomiques Eukarya et Bacteria, respectivement. Les principaux groupes sont déterminés par des critères morphologiques, cytologiques, génétiques, biochimiques et reproductifs. On distingue plusieurs groupes principaux généralement considérés dans les études de la dynamique phytoplanctonique (liste non exhaustive) : Cyanobactéries, Chlorophytes, Xanthophycées, Chrysophycées, Diatomées (Bacillariophycées), les Cryptophytes, les Dinoflagellés et les Euglenophytes. Une autre classification, selon la taille, se superpose à la précédente : le picoplancton (de 0,2 à 2 μm), le nanoplancton (de 2 à 20 μm) et le microplancton (de 20 à 200 μm). Le phytoplancton est un groupe polyphylétique très diversifié comptant plus de 15000 espèces décrites (Thyssen 2008) dont 4000 marines (Simon et *al.* 2009) et dont la majorité est probablement toujours non décrite, spécialement au sein du pico- et nanoplancton (Simon et *al.* 2009).

En tant que principal producteur primaire, le phytoplancton est à la base des écosystèmes aquatiques et est capable de réagir rapidement aux perturbations du milieu (i.e. apports en nutriments, changements de température, salinité, turbidité, turbulence ou stratification), qu'elles soient d'origine naturelle ou anthropogénique (Smayda, 1998). Les changements quantitatifs et qualitatifs qui ont lieu au sein des communautés phytoplanctoniques ont un impact sur l'ensemble de la chaîne trophique (Stockner et Antia, 1986, Thyssen, 2008). C'est pourquoi ce compartiment a été choisit comme bio-indicateur potentiel de la qualité des masses d'eau. Il est notamment utilisé dans le cadre de la directive européenne cadre sur l'eau DCE (Rolland, 2009, Soudant et Belin, 2010). Il est donc important de pouvoir suivre et évaluer sa composition, son abondance et sa biomasse ainsi que sa variabilité spatio-temporelle, mais ceci reste une tâche délicate. En effet la répartition du phytoplancton est très hétérogène et sa dynamique est très rapide (certaines espèces peuvent se diviser 2 fois par jour (Thyssen 2008)). Le phytoplancton est très sensible aux variations biotiques (lyses virales, prédation) et abiotiques (hydrologie, vent, salinité) (Padisak et *al.* 2006, Salsamo et *al.* 2006, Anneville et *al.* 2008, Rolland 2009). En partie grâce aux capacités rapides de division (Thyssen et *al.* 2008a), le phytoplancton a une capacité adaptative aux changements physiques ou chimiques (Smayda 1997 & 1998).

Pour l'étudier, plusieurs techniques plus ou moins récentes existent (Tableau 1). Chacune possède ses propres avantages et ses propres limites (en termes de milieu d'étude, de concentrations mesurées ainsi que de taille minimale pour les individus échantillonnés) (Tableau 1).

Parmi les variables de base échantillonnées, la chlorophylle *a* est un pigment photosynthétique qui est présent dans la quasi totalité des cellules phytoplanctoniques en tant que pigment principal des centres réactionnels des photosystèmes. La détermination de sa concentration est souvent utilisée pour évaluer la quantité totale de phytoplancton en terme de biomasse photosynthétique (Keebler et *al.* 2010, Claustre et *al.* 2003), mais n'est, par son universalité, pas discriminant au niveau des

grands groupes. Cependant des pigments dits accessoires sont aussi présents chez la plupart des grands groupes et ils peuvent être mesurés par HPLC (cf. plus loin) et utilisés afin de les différencier. Ceci étant, la résolution de cette détermination pigmentaire n'est pas très importante et souvent s'arrête au nom du groupe et non pas à la famille ou à l'espèce (Jeffret et Vest 1997b, Lemaire 2002, Thyssen 2008).

La méthode d'Utermöhl (Utermöhl 1931) est une technique quantitative standard utilisée dans le monde entier pour l'identification et le dénombrement du phytoplancton. Cette technique de comptage microscopique permet d'atteindre le degré d'identification spécifique. Cependant, il s'agit d'une technique d'expert et chronophage. Des variantes de ces techniques existent de nos jours (Paxinos et Mitchell 2000). Mais surtout, d'autres méthodes (cytométrie en flux, analyse d'image, fluorescence spectrale...) aux vues des problématiques étudiées semblent plus indiquées pour suivre les communautés phytoplanctoniques.

2 LES TECHNIQUES LES PLUS UTILISEES

Depuis de nombreuses années les scientifiques s'intéressent au suivi du phytoplancton d'un point de vue fondamental ou pratique. Il existe plusieurs techniques plus ou moins récentes pour le quantifier et l'identifier.

2.1 LA MICROSCOPIE

La **microscopie optique inversée** est la technique la plus ancienne (Tableau 1) et elle permet l'observation d'échantillons sédimentés, l'**identification** et le **comptage** des cellules phytoplanctoniques (Utermöhl, 1931). La méthode d'**estimation des biovolumes** est aussi très utilisée. Chaque taxon a un biovolume spécifique. Soit on affecte un biovolume cellulaire moyen pour le taxon considéré (établi au préalable par microscopie sur le site d'étude ou à partir de la littérature scientifique), soit on le calcule directement selon un protocole établi. Le biovolume d'un taxon est en fait le produit du nombre d'individu (/ml) et de son biovolume spécifique (en μm^3). Pour chaque taxon, une forme géométrique simple qui lui correspond le mieux lui est assignée (Menden-Deuer et Lessard, 2000 ; Reckerman et al., 2001).

Par la suite, la **microscopie à épifluorescence** reposant sur l'utilisation de la fluorescence émise par les pigments a fait son apparition dans les études du phytoplancton (Brock, 1978 ; Tableau 1). Elle a permis de distinguer les cellules contenant des pigments photosynthétiques et a permis de détecter les cellules picoplanctoniques contrairement à la microscopie optique inversée qui ne pouvait pas atteindre cette gamme de taille (Caron, 1983 ; Beardsley et al., 2005). Il y a d'ailleurs deux types de microscopes à épifluorescence. Le microscope à épifluorescence inversée (observation d'une cuve sédimentée) et le microscope à épifluorescence directe (dans ce cas, le volume d'eau est filtré et l'observation s'effectue sur le filtre).

Enfin, les premiers **microscopes électroniques à balayage** (MEB) ont vu le jour. Ces microscopes permettent, de part leur technologie, de réaliser une identification très précise du phytoplancton de par sa morphologie externe. Ils ont été utilisés pour différencier des espèces du genre *Pseudonitzschia* par exemple ou même de distinguer différents types morphologiques d'un même taxon (Guiselin et al., 2009 ; Sazhin et al., 2007).

La microscopie, qu'elle soit inversée, à épifluorescence ou électronique à balayage, repose sur l'identification de caractères morphologiques ou autres composants visibles. Ces techniques sont gourmandes en temps, demandent d'être spécialiste (notamment la microscopie optique), sont soumises à l'effet de l'observateur, à la fatigue/déconcentration et les erreurs sont difficilement quantifiables (Thyssen 2008, Karlson et al. 2010). C'est pourquoi, pour palier à ces problèmes, des techniques automatisées de comptage et de reconnaissance ont vu le jour.

2.2 METHODES BASEES SUR LA MESURE OU LA DETECTION DE PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES

D'autres méthodes dites « classiques » reposent sur la mesure de la chlorophylle a et des phéopigments (pigments dégradés). La plupart des méthodes de quantification de la concentration de la chlorophylle a sont basées sur l'extraction de cellules placées dans un solvant organique comme le méthanol, l'éthanol ou l'acétone et sont ensuite déterminées par spectrophotométrie (Richards et Thompson 1952, Parsons et Strickland 1963, Lorenzen 1967) et fluorimétrie (Holm-Hansen et al. 1965 ; Yentsch & Menzel 1966) ou chromatographie. Les pigments phytoplanctoniques sont mesurés en fonction de leurs caractéristiques spectroscopiques : absorption de la lumière (spectrophotométrie) ou fluorescence (fluorimétrie). Il existe des techniques non séparatives (**spectrophotométrie** et **fluorimétrie**) ou bien séparatives (**HPLC**) (Tableau 1) (Aminot et Kérouel 2004).

Il est intéressant de travailler sur les pigments pour l'identification et la quantification des espèces phytoplanctoniques car la plupart des bactéries, protozoaires et détritiques n'ont pas de pigments alors que toutes les cellules phytoplanctoniques en sont pourvues. De plus, les cellules mortes perdent rapidement ce contenu pigmentaire par dégradation, ce qui permet de différencier les cellules mortes des vivantes (Wright 2005).

Cependant, il faut garder à l'esprit qu'avec ces estimations, certains biais existent. En effet, la fluorescence n'est pas la concentration en chlorophylle a : lors de forts éclaircissements des profils verticaux de fluorescence peuvent par exemple indiquer une diminution de la fluorescence dans la zone de surface, alors que les analyses effectuées par extraction de la chlorophylle dans la même zone indiquent que ce n'est pas le cas. Ce phénomène est appelé *quenching non photochimique* (ou extinction de fluorescence) : les photosystèmes émettent de la fluorescence lors de la photosynthèse. Lorsque consécutivement à un fort éclaircissement (en pleine journée par exemple) ils sont saturés, ils n'émettent plus de fluorescence. La mesure de fluorescence sous estime donc la quantité de chlorophylle a dans ces conditions (Falfowski et Raven, 2007).

Un autre biais existant est relatif au calcul de la biomasse phytoplanctonique à partir de la chlorophylle a . En effet une augmentation de chlorophylle a peut refléter une adaptation des cellules à de faibles luminosités et à un état nutritionnel et être interprétée comme une augmentation de biomasse alors que ce n'est pas le cas (Arrigo, 2005).

2.2.1 La spectrophotométrie et la fluorimétrie

In vitro

La **spectrophotométrie** et la **fluorimétrie** sont utilisées pour quantifier la chlorophylle a et les phéopigments en laboratoire sur un extrait pigmentaire (Yentsch et Menzel 1963 ; Holm-Hansen et Riemann 1978 ; Herbland et al. 1985, Aminot et Kérouel 2004 ; le méthanol et l'acétone sont en général utilisés comme solvants organiques) relevé à partir d'un échantillon d'eau filtrée sur un filtre à

porosité variable (en général de l'ordre de 0,7 μm , GH/F Whatman). La spectrophotométrie est moins sensible que la fluorimétrie : elle exige donc de filtrer un plus grand volume d'eau (Aminot et Kérouel 2004). Toutefois, pour suivre la dynamique du phytoplancton il semble nécessaire d'avoir une méthode relativement performante à haute résolution temporelle et spatiale car l'évolution des communautés phytoplanctoniques est souvent très rapide : certaines espèces peuvent se diviser 2 fois par jour (Thyssen 2008).

In vivo

Basée sur la fluorimétrie classique introduite par Yentsch et Menzel en 1963, la **fluorimétrie *in vivo*** a fait son apparition en 1966, lorsque Lorenzen obtient à partir d'un fluorimètre un enregistrement de la fluorescence *in vivo* de l'eau de mer pompée à travers une cuve (Lampert 2001). De nos jours, la technique a bien évolué et plusieurs fabricants ont confectionné des fluorimètres couplés à des bathysondes ou un poisson ondulant (SeaSoar de Chelsea inc.) ce qui permet d'obtenir des profils de fluorescence en temps réel (Lampert 2001). Le **FluoroProbe** (bbe, Moldaenke) (Tableau 1) est de plus en plus utilisé de nos jours. C'est un instrument de mesure immergeable qui utilise les propriétés de fluorescence spectrale spécifiques à chaque groupe phytoplanctonique (See et al. 2005). Il est très sensible et rapide pour la détermination des groupes d'algues, leur concentration et l'analyse de la chlorophylle totale (Gregor et Marsálek 2004, Blanco et al. 2008). Il est possible de différencier 5 classes spectrales : les Chlorophytes, les Cyanobactéries (contenant majoritairement de la phycocyanine), les Chromophytes et Dinophytes (algues brunes), les Cryptophytes (See et al. 2005, Blanco et al. 2008) et les Cyanobactéries contenant majoritairement de la phycoérythrine (cf. projet ANR « Proliphyc » - système opérationnel pour la surveillance et l'alerte en temps réel des **proliférations phytoplanctoniques** application aux cyanobactéries - , n°ANR : ANR-06-ECOT-017). Il s'agit d'un exemple d'instrument relativement puissant et d'utilisation facile. Avec cet appareil, on obtient très rapidement et automatiquement un grand nombre de données ainsi que la possibilité de faire des études *in situ* (Gregor et Marsalek 2003). Cet instrument a aussi l'avantage de permettre de distinguer des taxons phytoplanctoniques regroupés en fonction de leurs caractéristiques pigmentaires de fluorescence après excitation par différentes longueurs d'onde ou groupes spectraux. Cependant, le fluoroprobe n'est pas capable de distinguer certaines classes. Par exemple, les diatomées, les dinoflagellées et les haptophytes ne peuvent pas être séparées car leur spectre de fluorescence est proche (See et al. 2005). Il est possible toutefois de définir des empreintes supplémentaires ce qui permet d'adapter l'appareil au milieu dans lequel il est utilisé (comme pour le genre *Phaeocystis*, E. Houliez, thèse de Doctorat UL1 en cours et article en préparation).

2.2.2 La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été introduite par Jeffrey (1968) et est utilisée depuis pour l'identification des principaux taxons à partir de l'analyse de leur cortège pigmentaire spécifique (Jacobsen 1978, Otsuki et Takamura 1987, Mackey et al. 1996; Lampert 2001). Son principe repose sur la physique de séparation d'espèces chimiques, applicable même dans un mélange très complexe.

Une monographie sur les pigments phytoplanctoniques a vu le jour après une dizaine d'années de travail (Jeffrey et al. 1997a). Cette technique permet d'identifier les grands groupes taxonomiques sur la base de pigments spécifiques et donne des informations sur l'écophysiologie de l'espèce. L'HPLC reste largement utilisée car elle permet une analyse poussée traitant quasiment tous les

pigments, ce qui apporte une détermination taxonomique claire jusqu'aux groupes phytoplanctoniques (Lampert 2001, Lemaire 2002, Irigoien et al. 2004).

2.2.3 Methodes satellitales

La chlorophylle *a*, de même que les pigments accessoires possèdent des spectres d'absorption qui leur permettent d'être distingués de leur environnement. Cette propriété leur permet aussi d'être utilisés par les satellites s'intéressants à la couleur de l'océan (Garver et Siegel 1997). Des **méthodes satellitales (télédétection)** sont utilisées en océanographie pour la détection des blooms phytoplanctoniques (Gohin et al., 2008) et des groupes phytoplanctoniques (méthode **PHYSAT**, Tableau 1). En 1978, la NASA lançait le programme Coastal Zone Color Scanner, programme de télédétection du phytoplancton reposant sur la chlorophylle *a* comme indicateur de biomasse autotrophe totale. Depuis 1996, de nombreux programmes ont été lancés (exemple : POLDER, SeaWifs, MOS, OCTS, OCM, MODIS...). C'est le spectre d'absorption du phytoplancton qui influence la couleur de l'eau (de plus, à ces longueurs d'onde, la fluorescence de la chlorophylle *a* et des biliprotéines à 685nm peuvent aussi être significatives (Lampert 2001). Les blooms monospécifiques sont fréquemment observés et détectés depuis les satellites comme par exemple les blooms de Coccolithophores (Lampert et al., 2001 ; Gohin et al. 2008).

La technique PHYSAT, méthode de télédétection créée en 2005, repose sur un algorithme permettant de détecter les groupes de phytoplanctons majeurs à partir d'anomalies dans le signal marin mesuré par les satellites s'intéressant à la couleur des océans (Alvain et al. 2008). Pour l'instant, cette technique permet d'identifier 4 groupes majeurs de phytoplancton (Diatomées, *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, nanoeucaryotes). L'addition de groupes supplémentaires est en cours, ainsi que son adaptation aux eaux côtières qui posent problème à cause de leur forte turbidité. Cette adaptation se fait dans le cadre de projets au sein du LOG par Séverine Alvain.

2.3 METHODES MOLECULAIRES

En tant que méthodes complémentaires aux comptages microscopiques et à la mesure des pigments, l'utilisation de **méthodes moléculaires** a été élargie à l'océanographie pour affiner la détection des espèces. Ces méthodes utilisent un équipement spécialisé et requièrent des connaissances sur la diversité du phytoplancton dans une région spécifique (Karlson et al. 2010). Trois méthodes principales sont utilisées : la méthode des puces à ADN (Gescher et al. 2010), les sondes moléculaires à rARN ciblées dans un système d'hybridation sandwich (Marin et Scholin 2010) et la PCR quantitative pour détecter et énumérer le phytoplancton (Galluzzi et Penna 2010). Par exemple pour la méthode des puces à ADN, à partir d'un échantillon de phytoplancton, l'ARN spécifique est isolé, marqué puis il y a une hybridation sur la puce. Ensuite le signal fluorescent est détecté (en cas de présence de l'espèce) par un scanner qui, en fonction de la composition, va permettre l'identification (Gescher et al. 2010). Finalement, la métagénomique s'est révélée au cours des dernières années une stratégie puissante pour obtenir des informations complémentaires sur la structure, l'écologie et l'évolution des communautés microbiennes en permettant l'accès aux gènes des microorganismes qui demeurent pour la plupart non cultivés (Moon-van der Staay et al. 2001 ; Shi et al. 2009)

2.4 MESURES AUTOMATISEES

Certains appareils utilisés couramment en océanographie permettent, au delà de la mesure manuelle, de collecter automatiquement des données comme la température, la salinité, le courant, la fluorescence *in vivo*, l'oxygène dissous, etc., et sont utilisés comme sondes ou profileurs. De nos

jours, des stations fixes sont placées dans certains milieux aquatiques, comme le réseau de bouées MAREL (Hamon 2004) ou « smart buoys » (Hydes et *al.* 1998). Elles ont de nombreux avantages comprenant une bonne évaluation des changements sur le court et le long terme. Cependant, de gros inconvénients existent comme le grand nombre de données manquantes dues au biofouling sur les senseurs, des difficultés de maintenance causées par la difficulté d'accès à la station durant les périodes de mauvais temps et le coût de maintenance causé par l'utilisation de bateaux (Wehde et *al.* 2003). Basée sur ces problèmes et limitations, l'utilisation de systèmes directement intégrés aux bateaux semble être une bonne alternative pour des mesures à la fois eulériennes et lagrangiennes (Flemming et *al.* 2002). Le **FerryBox** (<http://www.ferrybox.org/>) (Tableau 1), utilisant le principe des bouées qui collectent et mesurent automatiquement de nombreux paramètres à l'intérieur d'un bateau, apporte de nombreuses solutions aux difficultés de réponse aux problèmes techniques des bouées. Ici, il s'agit bien d'une nouvelle stratégie de mesure et non d'une nouvelle méthode pour mesurer le phytoplancton. Ce dispositif doit-être couplé à d'autres instruments comme un fluorimètre *in situ* ou un cytomètre en flux.

2.5 LA CYTOMETRIE EN FLUX

Une autre technique largement utilisée (surtout pour des études à plus haute résolution temporelle et spatiale) est la **cytométrie en flux** (Tableau 1 et 2). Il s'agit d'une technique utilisée dans le but d'analyser individuellement les particules en suspension dans un milieu liquide et de les compter de façon automatique (Marie et *al.* 1999). Un flux laminaire entraîne les particules individualisées qui passent à travers un faisceau laser, ce qui produit une diffusion de la lumière parfois accompagnée d'une émission fluorescente produite par l'excitation d'un pigment photosynthétique ou d'un marqueur fluorescent (Guiselin 2010). Cette technique est particulièrement pertinente pour compter et mesurer rapidement des cellules individuelles isolées ou pour discriminer des sous-populations homogènes sur des critères de fluorescence et de taille (Olson et *al.* 1993). De plus, certaines fonctions du cytomètre en flux, comme le tri cellulaire, ont ouvert de nouvelles perspectives quant à l'étude de la dynamique des populations phytoplanctoniques dans le milieu naturel (Davey et Kell 1996, Vives-Rego et *al.* 2000, Reckermann 2000). Couplée aux systèmes d'analyse d'images ou à des observations microscopiques ponctuelles, la cytométrie en flux, et plus particulièrement le CytoSense, permet d'étudier la prolifération des espèces phytoplanctoniques dominantes (de taille allant de 0.8µm à 800µm pour le CytoSense et le CytoSub) mais pas celle des espèces rares étant donné le relativement faible volume échantillonné (Guiselin, 2010).

2.6 OBSERVATIONS

Les principales limites des méthodes dites « classiques » (telles que les différents types de microscopie ou la mesure de la fluorescence *in vitro*) sont qu'elles nécessitent de nombreux échantillons transportés au laboratoire et le fait qu'il peut subvenir des changements lors de leur stockage (Gregor et Marsalek 2003). Mais surtout, ces méthodes ne sont pas adaptées pour des analyses à haute fréquence car les fréquences d'échantillonnage et de traitement de ces échantillons sont faibles (Thyssen 2008). Or, le cycle cellulaire des cellules phytoplanctoniques peut être très rapide, et les poussées phytoplanctoniques peuvent apparaître ou disparaître au cours d'une même semaine. Il est donc particulièrement intéressant lorsqu'on travaille sur cette problématique de pouvoir mesurer à haute fréquence.

3 LA CYTOMETRIE EN FLUX, UNE TECHNIQUE D'AVENIR ?

3.1 CONTEXTE

Durant les 20 dernières années, la cytométrie en flux a été reconnue comme un instrument puissant pour l'étude de l'écologie du phytoplancton (Cellamare et al. 2009). Cette technique provient à la base de la médecine (Frankel et al. 1990) et sa première utilisation en océanographie remonte au milieu des années 1980 (Yentsch et al. 1983 ; Olson et al. 1983). Elle représente une solution d'analyse répondant à certaines contraintes rencontrées lors des études par les méthodes classiques (temps, nombre d'échantillons, variété des résultats et paramètres propres pouvant être associés à la physiologie, fonction tri). Il en existe de nombreux modèles, parfois très différents (tableau 2). Les nouveaux modèles sont plus efficaces qu'il y a 10 ans pour étudier les communautés phytoplanctoniques dans le temps et dans l'espace avec des informations sur leur diversité optique et dimensionnelle (Thyssen et al. 2008). Régulièrement de nouvelles machines arrivent sur le marché.

Un nouveau type de cytogramme en flux a récemment fait son apparition. Ces appareils couplent l'analyse d'images, donc la microscopie, avec la technologie de cytométrie en flux (See et al. 2005, Karlson et al. 2010). Il existe 3 instruments combinant ces 2 approches : le **FlowCam**, l'**Imaging Flowcytobot** et le **Cytosense**. Ces instruments permettent de prendre des photos des cellules passant dans l'appareil. L'imaging Flowcytobot et le **FlowCam** pourraient être qualifiés de cytomètres en flux couplés à des « microscopes automatisés ». De ce fait, la plupart des utilisateurs n'utilisent que très peu les fonctions du cytomètre. Les cellules passent dans l'appareil, sont prises en photos et classées selon un algorithme (avec une possibilité de classement/vérification des photos à l'œil nu). Cette technique est très intéressante pour les grandes cellules et ne se base pas sur la fluorescence comme les cytomètres classiques. Ceci permet d'étudier toutes les cellules, détritiques inclus. La vitesse de prise d'images est très rapide. Par exemple avec le FlowCam pour récupérer 200 images de cellules d'une taille similaire à *K. brevis* dans des eaux côtières il faut compter environ 15 minutes. En utilisant la microscopie inversée la tâche aurait été 5 à 10 fois plus longue et sans information sur la fluorescence des cellules (Buskey et Hyatt 2006).

3.2 FACS

La gamme des FACS a été largement utilisée en océanographie. Par exemple, Thomson et al. (2009) ont étudié l'abondance du nanophytoplancton, des nanoflagellés hétérotrophiques, des particules virales et des bactéries entre 30 et 80° du cercle polaire antarctique. Rodriguez et al. (2010) ont quant à eux étudiés les flux de carbone à travers les groupes majeurs de phytoplancton. L'identification des groupes majeurs a été faite par cytométrie en flux. Zhao et al. (2010) ont, entre septembre et octobre 2004 en mer des Philippines, étudié les populations de *Prochlorococcus*, *Synechococcus* et des picoeucaryotes.

3.3 LE FLOWCAM

Le FlowCam est une combinaison entre la microscopie et la cytométrie en flux. L'acquisition d'images se fait en temps réel et les données sont stockées sur un ordinateur. Il possède deux modes de détection : fluorescence (laser) ou scattering (diffusion lumière) et un mode de détection automatique. Une photo numérique est obtenue par particule comprise entre 1µm et 2mm. Pendant la numérisation, de nombreux paramètres (caractéristiques des images) sont mesurés en plus de la création de l'image. Il peut analyser une grande quantité de particule en peu de temps (des milliers

de particules par minute, données fluid imaging technologies). Par rapport un à cytomètre en flux classique, le FlowCam est donc capable de discriminer les particules non seulement sur leur spectre, mais aussi sur leur morphologie. C'est donc un outil extrêmement intéressant, cependant quelques problèmes sont liés à cet appareil et doivent être résolus : 1) des problèmes liés à l'imagerie, concernant la netteté, la position de la particule par rapport à l'objectif, et la segmentation de l'image ; 2) des problèmes liés à l'échantillonnage, concernant la concentration cellulaire, le volume analysable et le choix d'analyser des échantillons vivants ou fixés. La discrimination est meilleure sur les échantillons vivants, car les échantillons fixés présentent des cellules dégradées qui ne sont plus reconnaissables par le logiciel de reconnaissance. Le vivant serait à favoriser mais il ne faut pas plus de 12 ou 24 H entre le prélèvement et la numérisation ce qui demande une certaine organisation ; 3) des problèmes liés à l'identification automatique, concernant la banque d'images, les tests d'évaluation et le fait qu'il faille privilégier le nombre de taxons au détriment de la précision ou le contraire (Compte rendu réunion outils identification et quantification du plancton, IFREMER, 2011).

Le **FlowCAM** est largement utilisé lors des blooms d'algues toxiques (HAB). Bauman et al. (2010), en octobre et novembre 2008, ont étudié un bloom de plus de 500 km² du dinoflagellé *Cochlodinium polykrikoides* dans le golfe d'Oman. Buskey et Hyatt (2006), quant à eux, ont testé les capacités du FlowCam à améliorer les protocoles de surveillance des HAB en enregistrant automatiquement des informations sur la taille et la fluorescence.

3.4 LE CYTOSENSE

Le Cytosense est un cytomètre de paillasse permettant une analyse des cellules allant de 0.8µm à 800µm. Il base son système de détection et de reconnaissance sur le scanning des propriétés optiques permettant de travailler à la fois sur les attributs et cytogrammes, et sur les profils de détection (Caillault et al. 2009). Il peut également être couplé à un système d'acquisition d'images et d'analyse du signal, même si cela représente un travail de spécialiste (Babin et al., 2005). Avec cet appareil, l'image vient confirmer les cytogrammes et compléter une discrimination essentiellement basée sur les signaux cytométriques. Dubelaar et al. (2004) ont suivi le comportement d'environ 40 groupes d'organismes trouvés dans la Oude Rijn river. Guiselin (2010) a aussi basé sa thèse sur l'utilisation de cet appareil en zone côtière de la Manche orientale. Elle y a fait une analyse descriptive des communautés phytoplanctoniques (abondances et composition taxonomique) en relation avec les sels nutritifs aux échelles saisonnières et pluriannuelles de 2005 à 2007. De nombreuses espèces y ont été étudiées et identifiées, ainsi que de nombreux blooms comme ceux de *Pseudonitzschia seriata* ou *Phaeocystis globosa*.

Le CytoSense a été développé dans le but d'étudier les cellules phytoplanctoniques de grandes tailles, caractéristiques des zones côtières productives (Dubelaar et al., 2000). Selon ces caractéristiques, le CytoSense peut analyser des cellules de 0.8 à 800µm de large et des volumes d'eau relativement élevés offrant la possibilité d'étudier des cellules peu concentrées (Ricquiers 2008).

3.4.1 Le CytoSub

Le **CytoSub**, version immergeable du CytoSense, peut analyser des cellules submicroniques à 800 µm de large et quelques millimètres de long (Thyssen et al. 2008 b). Cet instrument a été utilisé par Thyssen à haute fréquence et à de nombreuses reprises (Thyssen 2008, Thyssen et al. 2008, Thyssen 2009). Tout d'abord pour une expérience durant l'été 2005 dans la baie de Marseille qui a permis de

différencier 7 groupes phytoplanctoniques entre 1 et 50 μm . Il a aussi été utilisé à bord du Royal Research Ship Discovery de novembre à décembre 2004 au large des îles Crozet. Au cours des étés 2005-2006, une étude dans le port de Marseille sur la comparaison entre la cytométrie en flux, l'HPLC, la microscopie optique et la fluorimétrie a aussi été faite. En avril 2007, une étude sur l'hétérogénéité de la distribution du phytoplancton de surface le long de la radiale Açores-Bretagne (eaux côtières et marines) a permis d'identifier 6 groupes différents.

3.4.2 Le FlowCytoBot et le CytoBuoy

De nouveaux modèles jouissent d'une facilité de déploiement *in situ* et d'une analyse à haute fréquence des successions phytoplanctoniques. **FlowCytoBot et CytoBuoy** (version immergeable autonome du CytoSense) sont aujourd'hui une solution viable pour étudier la dynamique des populations planctoniques sans risque de perdre des informations importantes sur des échelles spatio-temporelles (Jacquet et al, 1998 ; Swanson et al. 2010 ; Pereira et al. 2011). Il est possible avec ces appareils de faire des études à haute fréquence et des mesures *in situ*, ce qui ne l'est pas avec de nombreux autres modèles de cytomètres en flux (Thyssen et al. 2008 b).

En 2007, deux études de Olson et Sosik ont utilisé l'**Imaging Flowcytobot** dans le port de Woods Hole pendant 2 mois. Les scientifiques, suite à cette étude, pensent que l'Imaging Flowcytobot n'est pas adapté aux eaux côtières à cause de la trop grande taille des organismes. En 2008 Campbell et al. (2010) ainsi que Swanson et al. (2010) ont utilisé cet appareil dans l'estuaire de l'Aransas au Texas. En février, ils ont détecté un bloom de *Dinophysis* grâce à une inspection manuelle des images. Avant cela, ils avaient déjà détecté *Myrionecta rubra* (proie de *Dinophysis*) et après le bloom de *Prorocentrum*, un autre dymoflagellé toxique.

Le CytoBuoy a notamment été utilisé par Pereira et al. (2011) au large du nord-est de Rio de Janeiro afin de mesurer la quantité et la composition de la communauté phytoplanctonique. 5 groupes taxonomiques ont été recensés. 2 groupes de cyanobactéries (type *Prochlorococcus* et *Synechococcus*) et 3 groupes d'eucaryotes de taille différente. Les cytomètres en flux automatisés et submersibles ont été développés et utilisés dans le but d'obtenir des résultats significatifs sur la dynamique des populations de phytoplancton (Babin et al. 2005). Un autre avantage est d'étudier directement le phytoplancton. Il n'y a pas besoin d'échantillonner et donc moins de risque d'abimer les cellules à cause des manipulations ou des substances utilisées pour les préserver (exemple : glutaraldéhyde et formaldéhyde, Buskey et Hyatt 2006). Les problèmes lors du stockage des échantillons sont aussi écartés.

Ces cytomètres en flux immergeables sont différents des autres cytomètres en flux de laboratoire car ils contiennent une coque étanche et résistante à la pression. Mais plus important, ils opèrent en continu et en autonomie, sous le contrôle d'un ordinateur dont le programme peut-être modifié par un opérateur. Par exemple, le FlowCytoBot permet une fréquence d'échantillonnage de 20 minutes (Olson et Sosik, 2007). Le Flowcytobot ressemble au CytoBuoy mais les deux instruments diffèrent sur certains points. Par exemple, le Flow Cytobot se base essentiellement sur l'analyse d'image pour la reconnaissance des espèces ou groupes microphytoplanctoniques, alors que le CytoBuoy base son analyse et sa discrimination sur les signaux cytométriques scannés (dont les algorithmes de reconnaissance sont actuellement en cours d'amélioration, notamment dans le cadre du projet DYMAPHY et du programme développé par Thomas Rutten (Rutten et al. 2005)). D'autre part, le FlowCytobot est relié à la côte par un câble pour l'alimentation et la communication. Le CytoBuoy est

alimenté grâce à une batterie et le transfert de données vers la terre se fait par radio ou bien directement par un câble (Thyssen et *al.* 2008 b). Les capacités d'opérer à distance sans câble permettent au CytoBuoy d'être plus flexible mais limite le nombre de mesures potentiellement faisable et son taux de transfert de données (Dubelaar et al., 1999).

De nombreux aspects de ces appareils pourraient-être améliorés. Par exemple pour le Flowcytobot, une réduction de la taille de l'appareil, une augmentation du taux d'échantillonnage, et une augmentation de fiabilité pourraient-être d'une grande utilité (Olson et *al.* 2003). Mais ces cytomètres immergeables n'ont pas que des avantages.

3.5 OBSERVATION

Il semble aujourd'hui nécessaire d'approfondir les applications faites par des cytomètres dans le but d'atteindre leur seuils extrêmes de détection ainsi que de planifier leur utilisation future selon les besoins de l'étude et les milieux d'investigation.

4 LA COMPLEMENTARITE DES METHODES

Chaque technique est pourvue d'avantages et d'inconvénients qui lui sont propres. Il semble de ce fait intéressant de promouvoir la complémentarité des différentes méthodes. Certains avantages d'une technique pourraient résoudre les inconvénients d'une autre et inversement. Dans un souci d'optimisation, l'utilisation de plusieurs méthodes sur une même étude permettrait un meilleur rendement et une meilleure appréciation des communautés phytoplanctoniques et de leur évolution. De nombreuses études utilisent ce principe de complémentarité des méthodes. Nous proposons d'en présenter certaines (Tableau 4).

4.1 CYTOMETRIE EN FLUX ET MICROSCOPIE

Les valeurs d'abondances des pico-cyanobactéries estimées par cytométrie en flux sont beaucoup plus fiables que celles obtenues par microscopie à épifluorescence qui elle est plus adaptée aux grosses cellules phytoplanctoniques (Cellamare 2005). Le principal problème étant que les quantités d'eau filtrées et étudiées doivent-être beaucoup plus grandes pour la microscopie à épifluorescence pour être significatives (Duhamel, 2004) et donc demander un temps de travail beaucoup plus grand. Par contre, la microscopie à épifluorescence permet de distinguer les formes individuelles des formes coloniales ce que fait difficilement un cytomètre en flux conventionnel (Cellamare 2005).

Le principe de complémentarité a permis dans le cas d'études faites surtout en eaux douces, au niveau des lacs Léman, d'Annecy et du Bourget, une représentation intégrale de la structure et de la dynamique phytoplanctonique (Cellamare 2005). En effet, lors de cette étude la cytométrie en flux a été utilisée pour quantifier les abondances réelles, les variations temporelles du picophytoplancton, des cyanobactéries filamenteuses et des eucaryotes discriminables en cytométrie. La microscopie inversée a fournit une identification taxonomique des espèces représentatives de chaque groupe isolés avec la fonction tri du cytomètre. Elle a permis l'identification des groupes et espèces qui n'avaient pas été observées avec la cytométrie en flux. Quant à la microscopie à épifluorescence, elle a contribué à la discrimination des lacs ayant une prédominance en cellules individuelles ou coloniales. L'utilisation de ces techniques en eau douce semble très similaire à leur utilisation en eau de mer. Leur application au niveau estuarien et au niveau des eaux côtières a été réalisé en Manche Orientale (Guiselin, 2010, thèse et article en cours de préparation)

4.2 HPLC ET MICROSCOPIE

Une étude comparative effectuée par Roy et al. (1996) a montré que les données apportées par la microscopie permettent d'aller plus loin que l'HPLC dans la détermination spécifique mais qu'il reste des problèmes au niveau de l'identification des petites cellules. De plus, même si la microscopie permet d'aller plus loin dans la détermination spécifique, elle reste une technique chronophage et de spécialiste. L'HPLC permet une analyse poussée traitant quasiment tous les pigments, ce qui apporte une détermination taxonomique claire des groupes phytoplanctoniques (Lemaire 2002, Goffart 2010). L'étude des petites cellules est le domaine de prédilection de la cytométrie en flux.

De plus, certaines études ont montré que l'analyse HPLC pouvait être associée à la microscopie optique dans le but d'identifier les espèces dominantes (Havskum et al. 2004 ; Lampert, 2001). Malheureusement cette combinaison ne peut pas être utilisée à haute fréquence. Il est donc impossible d'apprécier la biomasse globale ou de déterminer l'impact de facteurs externes sur la production du phytoplancton (Thyssen 2008).

4.3 COMPARAISON HPLC ET CYTOMETRIE EN FLUX

Certains scientifiques ont aussi comparé les résultats issus de la détermination par HPLC à la cytométrie en flux. L'autofluorescence du phytoplancton permet des analyses utilisant un cytomètre en flux. Cette méthode, comme dans l'étude de Stachowski et al. (2009) n'étudie que les populations de phytoplancton photosynthétiques. Le comptage rapide des cellules permet une utilisation robuste des statistiques pour valider les résultats. Cependant, le FACScan utilisé dans cette étude ne permet d'analyser que des cellules d'un diamètre inférieur à 80 micromètres. L'appréciation de la communauté phytoplanctonique n'est donc que partielle. La cytométrie en flux dans cette étude sur l'impact du fongicide Opus® (epoxiconazole) n'est utile que pour étudier l'impact de ce fongicide sur de petites espèces comme *Synechococcus* par exemple. D'autres instruments comme le Cytosub ou le Cytosense semblent plus adaptés étant donné qu'il peuvent étudier des tailles de cellules beaucoup plus grandes (0,8-800µm).

L'HPLC contrairement à la cytométrie en flux nous informe sur les pigments d'une grande partie de la communauté photosynthétique. Cependant, l'identification avec l'HPLC lors de cette étude s'arrête au niveau de la classe ce qui ne permet pas de déterminer précisément les organismes impactés. Néanmoins, l'HPLC a montré une perturbation de la communauté et une perte de pigments ce qui suggère une diversité plus faible.

Une autre étude, (Thyssen et al., 2008) montre que les résultats obtenus par HPLC, donne une meilleure identification du phytoplancton que par la cytométrie en flux. Cependant, cette dernière méthode, utilisée à haute fréquence, permet de mieux rendre compte de la variabilité du milieu. Avec la combinaison des deux méthodes on obtient donc des informations fiables sur la composition et la variabilité du phytoplancton.

4.4 CYTOMETRIE EN FLUX ET TECHNIQUE DU C¹⁴

Rodriguez et al. (2010) ont fait une étude dans le but de comprendre le cycle du carbone océanique. Pour cela, il a fallu quantifier la contribution des groupes majeurs de phytoplancton dans la production du carbone. Les chercheurs ont combiné la cytométrie en flux avec la technique de ¹⁴C et des expériences de dilution. La technique de dilution de l'eau de mer est couplée avec l'HPLC pour l'analyse de pigments et la cytométrie en flux est utilisée pour estimer la croissance et le taux de

broutage des groupes de phytoplancton majeur à la surface de l'eau. Les taux de croissance ont été corrigés par rapport à leur photo-acclimatation basés sur les changements de fluorescence par cellules détectées par cytométrie en flux.

4.5 MICROSCOPIE, SPECTROPHOTOMETRIE, SPECTROFLUORIMETRIE ET CYTOMETRIE EN FLUX

Durant sa thèse, Rolland (2009) a utilisé quatre outils différents afin de suivre le phytoplancton en eau douce : la microscopie optique, le dosage de la chlorophylle *a* par spectrophotométrie en laboratoire, le dosage de la chlorophylle *a in situ* par spectrofluorimétrie (bbe FluoroProbe) et la cytométrie en flux utilisant sa fonction tri. Cette thèse porte sur l'étude de la dynamique et diversité du phytoplancton dans le réservoir Marne (bassin versant de la Seine) et étudie donc les eaux douces. La microscopie a fourni des informations précises (qualitatives et quantitatives) sur la diversité, le biovolume des espèces et leur dynamique spatiale et temporelle. La spectrophotométrie a apporté un aperçu global de la biomasse phytoplanctonique (sans tenir compte de la physiologie des cellules). La spectrofluorométrie *in situ* a aidé à estimer quantitativement la biomasse phytoplanctonique active et à différencier plusieurs groupes spectraux. La cytométrie en flux a permis de suivre les populations majoritaires grâce à la fonction de tri cellulaire, suivie d'une mise en culture et d'une reconnaissance de ces dernières.

4.6 COMPARAISON TECHNIQUES *IN-SITU* – TECHNIQUES DE LABORATOIRE

Une étude de See et al. (2005) a utilisé différentes techniques d'étude du phytoplancton dans le Golfe du Mexique. En fonctionnant par station, ils ont extrait de l'eau, directement analysée sur le bateau (utilisant un Fluoroprobe et un FlowCAM, ce dernier étant un appareil couplant l'analyse d'image et la cytométrie en flux) ou préparé pour le laboratoire (HPLC, microscopie optique et à épifluorescence). La structure de la communauté phytoplanctonique a été déterminée avec l'algorithme CHEMTAX (Mackey et al. 1996), basé sur les pigments algaux, qui répartit les organismes en 5 catégories (diatomées, dinoflagellées, chlorophytes, cryptophytes et cyanobactéries). Ces groupes correspondent aux groupes donnés par l'analyse Fluoroprobe. Le FlowCAM a été utilisé pour déterminer l'abondance. L'HPLC a été utilisée pour déterminer les pigments phytoplanctoniques. Pour la comparaison entre techniques, la microscopie optique et la microscopie à épifluorescence ont été utilisées. Les abondances trouvées avec les techniques du FlowCam et du microscope à épifluorescence dans cette étude sont similaires. Par contre l'abondance entre le FlowCam et la microscopie optique étaient significativement différentes. De même l'abondance trouvée avec le Fluoroprobe était similaire à l'HPLC mais surestimée par rapport au CHEMTAX. De là, il est possible d'essayer de comprendre ces différences afin de pouvoir choisir la technique la plus adaptée à notre problématique. En cela, le principe de complémentarité des méthodes est aussi important. Les auteurs concluent sur le fait que l'association entre le Fluoroprobe et le FlowCam semble être une combinaison prometteuse pour la surveillance des eaux côtières et pour la détection précoce des blooms de phytoplancton.

4.7 METHODES SATELLITALES ET HPLC, CYTOMETRIE EN FLUX ET FLUORIMETRIE

Les méthodes satellitaires ont quant à elles la quasi nécessité d'être couplées avec une méthode *in situ* en eaux côtières et estuariennes, en tout cas pour l'instant. Colijn (2006) a utilisé l'enregistrement par des sondes *in situ* au sein d'un système Ferrybox pour valider la méthode satellite. Il en a conclu que certains paramètres du Ferrybox comme la fluorescence de la chlorophylle *a* et la turbidité peuvent avec une bonne calibration être utilisés pour valider les données satellites.

Brewin *et al.* (2010), ont quant à eux, combiné la méthode d'HPLC avec la méthode satellite afin de suivre le phytoplancton à large échelle. L'HPLC semble être une bonne technique pour valider les images satellites travaillant sur la couleur de l'océan (Claustre *et al.* 2003). Par contre, il semble que le nanoplancton soit plus difficilement observable *via* le satellite que les autres classes de taille. Ceci est en partie dû au fait que le nanoplancton est plus diversifié que le pico- et le microplancton. Il possède donc une plus grande variabilité de caractéristiques optiques, ce qui le rend difficile à observer à partir d'un satellite (Brewin *et al.* 2010).

Une étude de Thyssen *et al.* (2009) couple la télédétection, la cytométrie en flux de type CytoSub et la fluorimétrie *in vivo* sur un transect partant des Açores et finissant en Bretagne. La distribution des micro-organismes en milieu marin et terrestre est très différente. Ceci est en partie dû au fait que le mouvement perpétuel des masses d'eau homogénéise ou sépare les populations. En plus de cela il faut rajouter les cycles naturels de multiplication cellulaire et d'interaction biologique. Pour que l'échantillon donne de bonnes informations sur la distribution et la production des organismes concernés, il faut que son échelle spatiale soit inférieure à celle du plus petit des mouvements de masse d'eau qui affecte la distribution concernée. Que sa fréquence soit supérieure à la vitesse des mouvements de ces masses d'eau ainsi qu'à la fréquence du cycle cellulaire et des interactions biologiques. Sans ces conditions il n'est pas possible de récupérer de bonnes valeurs de biomasse et de flux. Il est très difficile de satisfaire toutes ces conditions à cause des méthodes non synoptiques qui sont actuellement accessibles. Néanmoins, il est envisageable de coupler les méthodes de télédétection, d'analyse à haute fréquence par fluorimétrie et l'accès aux abondances et à la diversité de taille et de forme par cytométrie en flux automatisée (Thyssen 2008).

4.8 OBSERVATIONS

Le principe de complémentarité des méthodes est renforcé par le fait que les méthodes classiques doivent persister pour s'assurer du bon fonctionnement des méthodes innovantes (Rolland 2009).

Au-delà de la performance des différentes méthodes et machines, il faut se rendre compte que ce groupe d'organismes est si grand qu'il ne peut pas exister de méthode pouvant simultanément en observer sa diversité, son abondance, sa dynamique et sa distribution spatiale (Thyssen 2008).

5 SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

Actuellement, le projet INTERREG IV A 2 Mers DYMAPHY (Développement d'un système d'observation DYnamique pour la détermination de la qualité des eaux MARines, basé sur l'analyse du PHYtoplancton, www.dymaphy.eu) s'intéresse à améliorer l'évaluation de la qualité des eaux marines dans la région des "2 Mers", à travers l'étude des micro-algues (phytoplancton) et de paramètres environnementaux à haute résolution, en associant méthodes traditionnelles et novatrices. Ce type de projet essaye de calibrer les techniques en fonction de leur milieu spécifique et de trouver la meilleure complémentarité possible entre les différentes méthodes. D'autres études sur la viabilité des techniques en fonction des différentes problématiques ou milieux (eau douce, eaux côtière, marines...) devraient voir le jour afin d'optimiser le choix des instruments utilisés.

L'avenir semble donc tourné vers la complémentarité des méthodes pour une bonne caractérisation de la dynamique phytoplanctonique, en dépit des limitations que présentent chaque technique

(Olson et *al.* 1996 ; Jacquet, 2000 ; Lampert 2001 ; Not et *al.*, 2008 ; Thyssen, 2008 ; Rolland, 2009 ; Guiselin 2010). Mais il serait simpliste de considérer que la complémentarité des méthodes consiste en une solution à toutes les études de la dynamique et de la diversité du phytoplancton en eaux marines. En effet, la problématique doit-être déterminante dans le choix des méthodes. Par exemple dans le cas d'une étude sur les blooms d'algues nuisibles (HAB) des mesures globales et rapides (Fluoroprobe, Cytométrie *in situ*, Physat) pourraient-être associées avec des mesures plus spécifiques de laboratoire (techniques classiques de microscopie, automatisées avec la cytométrie en flux, l'analyse d'images et les méthodes moléculaires). Parfois, multiplier le nombre de techniques sur un même sujet d'étude n'est pas forcément pertinent.

Les techniques novatrices et automatisées doivent être perpétuellement améliorées par la multiplication de leurs utilisations (et des publications rendant compte de ces études) et par l'évolution technique des machines. Pour appréhender la dynamique fine du phytoplancton et sa répartition à haute résolution temporelle et spatiale, ainsi que l'ensemble du spectre de tailles du phytoplancton, les machines futures vont devoir travailler avec des caractéristiques plus complexes, et elles vont devoir intégrer des connaissances taxonomiques (Culverhouse 2007).

Au-delà d'un but purement fondamental, de nombreuses applications concrètes de ces techniques seront à l'avenir utiles. Par exemple, les blooms d'algues nuisibles (ex : *Phaeocystis globosa*, *Pseudonitzschia seriata*, *Gymnodinium* sp...) sont de plus en plus récurrents durant cette dernière décennie (Buskey et Hyatt 2006, Bauman et *al.* 2010, Campbell et *al.* 2010). Pour cela il semble nécessaire d'identifier les causes des changements dans les observations, prédire les tendances futures (Guiselin 2010) et pouvoir réagir rapidement face à un bloom mettant en danger la santé publique et la conchyliculture par exemple. Pour cela, il est important de compter sur des techniques d'études et d'analyse de la dynamique à haute résolution temporelle et spatiale, de la composition du phytoplancton.

6 ANNEXES

Tableau 1: Liste de techniques utilisées pour l'étude de la dynamique phytoplanctonique dans les systèmes aquatiques (N.B. : les techniques moléculaires ne sont pas représentées).

Techniques	Période	Champ d'application	Paramètres mesurés	Avantages	Inconvénients
Spectrophotométrie	Depuis 1949	Technique de laboratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Concentrations en chlorophylle <i>a</i>, <i>b</i> et <i>c</i>. - Concentrations en phéopigments. 	<ul style="list-style-type: none"> - Obtention d'informations sur une large gamme de pigments 	<ul style="list-style-type: none"> - Problèmes de diffusion, réflexion et diffraction. - Nécessité de filtration.
Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	Depuis 1968	Technique de laboratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Identification des grands groupes taxonomiques (sur la base de pigments spécifiques). - Marqueurs pigmentaires. - Abondance de chaque classe via des algorithmes sur les pigments caractéristiques déterminés. - Information sur l'écophysologie de l'espèce (ex : la photo-adaptation et le devenir du phytoplancton dans le réseau trophique). 	<ul style="list-style-type: none"> - Il est possible de séparer des solutés de nature non-ionique. - Il est possible de déterminer des paramètres physicochimiques comme l'hydrophobicité - Séparations rapides et ré-équilibration - Appareillage simple - Les phases liées sont chimiquement stables, elles donnent des résultats reproductibles. - Informations sur l'écophysologie de l'espèce - Obtention d'informations sur une large gamme de pigments 	<ul style="list-style-type: none"> - Mécanisme de rétention complexe. - Nécessité de calibrer la machine avec des pigments standards. - Plusieurs possibilités d'analyse pour la détermination des groupes pigmentaires associés à des groupes taxonomiques. - Nécessité d'avoir des signatures d'espèces connues du milieu étudié. - Nécessité de filtration.
Fluorimétrie extractive	Depuis 1963	Technique de laboratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Concentrations en chlorophylle <i>a</i> - Concentrations en phéopigments. 	<ul style="list-style-type: none"> - 50 fois plus sensible que la méthode spectrophotométrique. - Travail avec un volume réduit. - Facilité d'emploi. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessité de calibrer régulièrement la machine. - Nécessité de filtration.
Microscopie inversée	Depuis 1931	Technique de laboratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Identification de la taxonomie des individus. - Prise en compte de chaque organisme qu'il soit sous forme isolée, coloniale ou filamenteuse. - Complément de la cytométrie utilisée en mode tri. Permet l'identification taxonomique des espèces de groupes isolés ou les groupes n'ayant pas été observés en cytométrie. - Couplé à un logiciel cette méthode permet de déterminer la taille, le volume, le biovolume et la biomasse des cellules bactériennes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Renseignements sur la richesse spécifique ou le nombre de taxons présents dans l'échantillon. - Certains peuvent avoir une fonction de microscope à épifluorescence. - Possibilité d'aller jusqu'à l'espèce. - Détermination de l'abondance d'un volume précis (sédimentation). 	<ul style="list-style-type: none"> - Temps d'analyse des échantillons. - Besoin d'avoir des taxonomistes (avoir une formation solide). - Les protocoles de prélèvements et les procédures de stockage altèrent la qualité des événements observables au sein des échantillons. - Difficile pour le nano-plancton, impossible de détecter le picoplancton.
Microscopie à épifluorescence	Depuis 1978	Technique de laboratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Permet d'étudier les caractéristiques, l'abondance et la biomasse du nano- et picoplancton. - Discrimine les formes cellulaires des formes coloniales (en changeant la longueur d'onde d'excitation de l'appareil). - Possibilité de faciliter la détection de certaines espèces par l'ajout de marqueurs fluorescents. - Couplé à un logiciel (Image-Pro Plus) cette méthode permet de déterminer la taille, le volume, le biovolume et la biomasse des cellules bactériennes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Prise en main facile et rapide. - Permet de déterminer si les organismes sont autotrophes ou hétérotrophes. - Permet d'étudier et de compter les organismes nano- et picoplanctoniques. 	<ul style="list-style-type: none"> - Reconnaissance de l'autofluorescence parfois difficile, nécessité de marquage. - Nécessité d'une filtration. - Les images peuvent manquer de netteté, entre autre, à cause de la visualisation de la fluorescence émise hors focus. - Temps de fluorescence limité (fading).
Fluorimétrie <i>in vivo</i> totale et Spectrofluorimétrie de type Fluoroprobe (bbe)	Depuis 1966 et depuis les années 2000	<i>In Situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Détermination de la concentration en chlorophylle <i>a</i> totale (<i>in vivo</i>) - Détection et différenciation des algues en classes spectrales (Cyanobactéries / algues brunes / algues vertes et Cryptophytes). - Il est possible d'ajouter quelques empreintes supplémentaires de groupes ou espèces que l'on souhaite suivre. 	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode sensible, rapide, peu coûteuse, facile à utiliser, sans préparation et en temps réel. - Détermine la concentration en chlorophylle <i>a</i> jusqu'à 100m de profondeur. - Utilise les empreintes enregistrées ou importées. - Jusqu'à 4 mesures par seconde. 	<ul style="list-style-type: none"> - Détermination de groupes très larges, impossible d'arriver au genre ou à l'espèce. - Limitation dans l'importation des empreintes de groupes ou espèces supplémentaires aux groupes prédéfinis (4-5 par appareil). - Possible interférence avec matières dissoutes fluorescentes - Effet de concentration des pigments au sein des cellules (sans changement de biomasse ou abondance)
Téledétection PHYSAT Méthode satellitale	Depuis 1978 Depuis 2005	Approche synoptique	Ces outils ont pour principal but de comprendre le rôle de la pompe biologique planctonique et son évolution en comparaison avec le changement climatique. Il peut aussi être utilisé comme outil d'observation de l'influence du climat sur les écosystèmes.	<ul style="list-style-type: none"> - Identification rapide. - Travail à grande échelle en un temps t (résolution synoptique). 	<ul style="list-style-type: none"> - Peu précis pour les eaux côtières - Difficile distinction du nano- et picoplancton (hormis méthode PHYSAT) - Méthode empirique

Techniques	Période	Champ d'application	Paramètres mesurés	Avantages	Inconvénients
Cytomètre en flux (FCM)	Dépend du modèle	Dépend du modèle	Dépend du modèle	<ul style="list-style-type: none"> - Permet d'analyser un grand nombre de cellules - Résultats statistiques robustes et représentatifs - Permet une analyse multiparamétrique à l'échelle individuelle - Mesures en temps réel (dépend du modèle) - Lorsque le cytomètre est embarqué et qu'il mesure à haute fréquence, il donne des estimations réalistes des biomasses et donc des flux de matière, contrairement aux études ponctuelles qui généralement les sous estiment ou sur estiment. 	<ul style="list-style-type: none"> - Analyse dépendante de l'état physiologique du phytoplancton - Lors du passage dans le laser, la cellule n'est pas toujours droite, ce qui entraîne des problèmes d'imprécision. - Choix du niveau de discrimination difficile : de nombreuses possibilités difficile à appréhender. - Chez la plupart des appareils, les cellules de grande taille ne sont pas prises en compte - Représentation de l'analyse insuffisante pour les petites cellules - Automatisation pour reconnaissance détaillée encore en cours d'exploration - Pollution du cytogramme par le bruit de l'appareil.
FCM FACSalibur, FACSort, FACSsan, FACSanto et FACSvantage	Depuis 1996	Technique de laboratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Abondance et dynamique des virus, bactéries hétérotrophes, picocyanobactéries et petits autotrophes - Etat trophique - But écotoxicologique - Le nombre de cellules ainsi que le contenu en ADN cellulaire (synchronisation de la division cellulaire) taux de croissance des cellules. 	<ul style="list-style-type: none"> - Abondance plus fiable et représentative que la microscopie à épifluorescence - Haut succès de la moyenne d'isolement - Grande sensibilité de <i>Cryptomonas</i> sp. au tri 	<ul style="list-style-type: none"> - Mesures en laboratoire - Quelques groupes non isolés (Cyanobactéries coloniales, Chrysophytes, Euglènes, Dynoflagellés...) - Etudes écotoxicologiques encore limitées - Limité aux phytoplancton inférieur à 80 micromètre - Non automatisé
FCM FlowCam (couplage de la cytométrie en flux et de l'analyse d'image)	Depuis 2002	<i>In Situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Discrimination potentielle d'espèce toxique de non-toxique - Surveillance de la densité des blooms toxiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Plus rapide et moins contraignant que la microscopie classique pour détecter les blooms toxiques en temps réel. - Très bonne fonction de tri 	<ul style="list-style-type: none"> - Mesures en laboratoire - Ne différencie pas les espèces nocives des espèces non nocives. - Les images doivent-être soumises à un expert pour identifier l'espèce.
FCM CytoSense	Depuis 2003	Technique de laboratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Discrimination des bactéries hétérotrophes. - Obtention de FWS (informations de taille), SWS (information morphologique : forme, granularité, paroi cellulaire, composition interne...), FLR (Fluorescence rouge : chlorophylle <i>a</i>), FLY (Fluorescence jaune : phycoérythrine), FLO (Fluorescence orange : phycobiline, spécifique aux cyanobactéries et cryptophytes) et abondances. - Détection d'espèces phytoplanctoniques nocives - Profil des signaux le long des particules (signature optique du phytoplancton) - Module de prise d'image (module Image in flow) 	<ul style="list-style-type: none"> - Grande sensibilité pour les bactéries hétérotrophes. - Possibilité d'étudier de très grands organismes (tube de diamètre intérieur de 800 micromètres) - Option permettant de prendre des photos des cellules 	<ul style="list-style-type: none"> - Mesures en laboratoire - Résolution de l'appareil moins précise pour les petites tailles (nécessité de calibration) - Automatisation de la reconnaissance des profils cytométriques en cours d'exploration - Les images prises doivent-être soumises à un expert pour identifier l'espèce.
FCM CytoBuoy et CytoSub	Depuis 1999	<i>In Situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Mise en évidence de plusieurs groupes discriminés par leurs signatures optiques - Dynamique à petite et grande échelle des abondances (périodicité du cycle cellulaire). - Corrélation des groupes planctoniques avec les paramètres : nutriments, hydrologie et météorologie de l'environnement (orages et upwelling, et progressions saisonnières). 	<ul style="list-style-type: none"> - Mesures <i>in situ</i> - Grande autonomie et résistance. - Indique la variabilité de cycle de cellules et les patches d'abondance de cellules. - Fonctionne jusqu'à 200m de profondeur. - Images de résolution 1 micromètre. 	<ul style="list-style-type: none"> - Les mêmes que pour le CytoSense - Problèmes de transmission - Problèmes d'alimentation - Problèmes d'étanchéité - Résolution à un seul niveau de la colonne d'eau - Automatisation de la reconnaissance encore en cours d'exploration
FCM FlowCytobot et Imaging FlowCytobot	Depuis 2001	<i>In Situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fournit une détection précoce des algues nocives (Dinoflagellés) tel que <i>Dinophysis</i>. - Permet d'avoir des images de la formation de chaînes des diatomées (<i>Guinardia</i>, <i>Thalassiosira</i>, <i>Nitzschia</i>, <i>Skeletonema</i> et <i>Thalassionema</i>). 	<ul style="list-style-type: none"> - Mesures <i>in situ</i> - Automatisation et analyse d'image de meilleure qualité - Classement automatique des images - Téléchargement des images sur un ordinateur à distance - Grande fréquence d'analyse (5mL/20 minutes) - Haute résolution, long terme 	<ul style="list-style-type: none"> - Impossibilité d'analyser des cellules plus larges que 10 µm avec le FlowCytobot - C'est pourquoi l'« Imaging FlowCytobot » a été conçu.

Tableau 2 : Comparaison des différents cytomètres utilisés pour la reconnaissance et le comptage du phytoplancton dans les milieux aquatiques

Milieu	Lieu	Période	Auteurs	Cytomètre	Phytoplancton	Fonction tri	Information	Intérêt d'utilisation
Lacustre, Marin et océanique	Lacs Léman, Bourge, Annecy, Marne et Genève Transect Afrique du Sud-Australie Océan pacifique équatorial Ville franche sur mer Ouest de la mer Méditerranée Le Sénégal (fleuve) 30 à 80° océan Austral Mer des Philippine	1996 et de 2003 à 2007	Shapiro, 2003 ; Frankel et al., 1990 ; Marie et al., 1997 ; Marie et al., 1999 ; Bruyant, 2002 Mocquet, 2005 Cellamare, 2005 ; Not, et al., 2008 ; Jacquet et al., 2008 ; Cellamare et al., 2009 ; Rolland, 2009 ; Stachowski-Haberkorn, et al., 2009 ; Rodriguez et al., 2010 ; Bouvy et al., 2010 ; Thomson et al., 2009 et Zhao et al., 2009	FACSalibur, FACSsort, FACSsan, FACSanto et FACSvantage	Identification de : *Picrocyanobactéries *Diatomée : <i>Stephanodiscus minutulus</i> , <i>Fragilaria crotonensis</i> , <i>crotonensis</i> et <i>Asterionella</i> (60 à 150 µm de longueur). *Cyanobactéries filamenteuses : <i>Planktothrix rubescens</i> , <i>Pseudoanabaena limnetica</i> . *Chrysophycée : <i>Dinobyon</i> , <i>Rhodomonas minuta</i> * <i>Diatoma tenuis</i> et <i>M. gracillima</i> ayant une forme parallélepède et mesure entre 40 et 70 µm. -Énumération des groupes eucaryotes, <i>Prochlorococcus</i> , et <i>Synechococcus</i> jusqu'à une profondeur de 200 m. -Utilisation de fluorochromes : telles que TOTO-1, YOYO-1, et le SYBR Green I. -L'étude des effets des UV sur des organismes au laboratoire et des incubations <i>in situ</i> à différents profondeurs pendant 24h -Impact des fongicides sur les communautés phytoplanctoniques marines.	-Isolement et mise en culture. -Isolement de 45 taxa phytoplanctoniques : *29 algues vertes, *8 cyanobactéries, *7 diatomées, *1 chryptophycée. -Isolement d'une population de Pico-eucaryote à partir des échantillons marins.	- Abondance et dynamique des virus, bactéries hétérotrophes, picocyanobactéries et petits autotrophes -Etat trophique -But écotoxicologique -Le nombre de cellules ainsi que le contenu en ADN cellulaire (synchronisation de la division cellulaire), taux de croissance des cellules.	-Valeurs d'abondance plus fiables et plus représentatives que la microscopie à épifluorescence -Meilleure discrimination avec SYBR green I que Hoechst 33342 entre <i>Prochlorococcus</i> et bactéries hétérotrophes. -Haut succès de la moyenne d'isolement - Développement de 80% des populations totales triées -Constitution de 47% des monocultures -Pas d'isolement de quelques groupes telles que : Cyanobactéries coloniales, Chrysophytes, Euglènes, et Dinoflagellés ... -Grande sensibilité de <i>Cryptomonas sp.</i> au tri -Etudes écotoxicologiques encore limitées (détection seulement pour <i>Prasinophyte-like</i> pour des concentrations >100µg/l ⁻¹).
Marin	Eau côtière : Golfe du Mexique et côtes de Floride Golfe de Oman, Dibba et Musandam Pacific équatorial	2002 à 2005 et 2008	Babin et al., 2005 ; Buskey et Hyatt, 2006 Bauman et al., 2010 Brzezinski et al., 2010	Imaging Flow Cytometer FlowCam	- Identification de cellules microplanctoniques de 1 à 2000 µm -Benchtop, portable, et sous-marin Le FlowCAM est un écoulement continu de formation image -Utilisable pour des cellules naturelles + des cellules cultivées. -Emploie 2 modes de compte: 1) mode de déclenchement automatique: prend une image de n'importe quel objet ayant une taille similaire à celle de la cellule cible. 2) le mode de fluorescence : cellules sont comptées, identifiées sur la base du signal de fluorescence. Programme de comparaison d'image des différentes espèces est bien établi pour <i>K. brevis</i> mais pas pour les autres (e.g. <i>H. rotundata</i>)		- Discrimination potentielle d'espèces toxiques et non-toxiques eg : <i>Pseudonitzschia</i> - Floraisons de dinoflagellés toxiques (<i>Karenia brevis</i>) - Surveiller les densités des blooms algaux toxiques (HAB).	-Pour les eaux naturelles, pas suffisant pour détecter les espèces nocives/non nocives (toxines changent en fonction des effets de l'environnement sur l'organisation physiologique) - Les images doivent encore être examinées par un opérateur qualifié pour identifier l'espèce d'intérêt. - Moins pénible et moins long que la microscopie traditionnelle pour la détection de blooms toxiques en temps réel. - Perspective : combiner l'utilisation du FlowCam avec des sondes moléculaires spécifiques.
Marin	Manche orientale (eau côtière) Mer du Nord	2003 et 2008	Dubelaar, et al., 2004; Dubelaar, et Geerders, 2004 Ricquiers, 2008. Guiselin, 2010 Madi, 2010	CytoSense	-Abondance des bactéries hétérotrophes et des nano-phototrophes <50 µm à fréquence journalière. - Microorganismes de 1 à 700 µm offrant la possibilité d'étudier des cellules peu concentrées -Milieu naturel : zone côtière -Conditions expérimentales : microcosme : évolution du réseau trophique microbien et dégradation provoquée par <i>Phaeocystis globosa</i>	- Equipé de la fonction tri - Capacité de tri peut aller jusqu'à 100 particules par seconde	-Discrimination des bactéries hétérotrophes. - La longueur FWS, SWS, FLR, FLY, le ratio FLR/FLY et les abondances. -Détection d'espèces phytoplanctoniques nocives : <i>PseudoNitzschia</i>	-Equipé d'un « module picoplancton » : grande sensibilité pour les petites cellules (pico- et nano-plancton) -Permettant un travail sur l'état physiologique des cellules avant et après marquage - Equipé d'un système d'acquisition d'image : vérification de la discrimination basée sur les profils cytométriques des groupes et parfois des espèces de microphytoplancton
Marin	Transect de South-North à Marseille Port du Roucas Blanc (Marseille) Rio de Janeiro	1999 et de 2005 à 2007	Dubelaar et al., 1999 ; Jacquet, 2000 ; Olson et al., 2003 ; Thyssen, 2008, Thyssen et al., 2008 ; Thyssen et al., 2009 Peirera et al., 2011.	CytoBuoy et Cytosub	-Mesure quantitative de l'ADN des cellules sans extraction. - Variation du cycle cellulaire au cours du temps de <i>Prochlorococcus</i> et de <i>Synechococcus</i> -Bonne estimation du taux de croissance des populations. -Analyse de grandes cellules phytoplanctoniques (1 à 800 µm en largeur et quelques en longueur) -Utilise un volume d'eau relativement grand (~4 cm ³) Les avantages : *flexibilité de déploiement *prélèvement <i>in situ</i> en haute fréquence *mesure multiparamétrique avec programmation. *liquide gaine recyclé.	Le Cytosub est équipé de la fonction tri.	-Mise en évidence de sept groupes cellulaires. -Dynamique à petite et grande échelle des abondances (périodicité du cycle cellulaire). -Corrélation des groupes planctoniques avec les paramètres : nutriments, hydrologie et météorologie de l'environnement (orages, upwelling, et progressions saisonnières).	CytoBuoy : équipé d'une batterie, il y a plus de flexibilité et une meilleure corrélation qu'avec le cytomètre conventionnel. -Indique la variabilité de cycle de cellules et les patches de l'abondance de cellules - Peut être actionné à une profondeur de 200 m. - Enregistrement de 5 variables: FWS, SWS, FLR, FLO et FLY.
Marin et océanique	Côte de New Jersey (Observatoire LEO-15) et l'Observatoire côtier de la vigne du Martha Golfe du Mexique	Juillet- Octobre 2001, 2006 et 2008	Olson et al., 1996 ; Olson et al., 2003 ; Olson et Sosik, 2007 ; Sosik et Olson, 2007 ; Campbell et al. 2010 et Swanson et al., 2010	FlowCyto-bot et Imaging Flow- Cytobot	-FCB couvre la gamme habituelle du phytoplancton (de 1 à 100 µm), -Observation mensuelle du pico- et nanoplancton. -Actionner <i>in situ</i> et sans surveillance et accessibilité des données en temps réel - Relié au rive par des câbles d'alimentation pour l'énergie et la communications. -Basé sur l'analyse de formes d'impulsion de fluorescence. - FCB : facilité de détection de <i>Synechococcus</i> en eaux côtières, pas adapté aux très petites cellules qui manquent de PE (<i>Prochlorococcus</i>) - IFCB : prélève et identifie les cellules beaucoup plus grandes (> 10-100µm nano et microplancton) qui dominent souvent en eaux côtières.		-IFCB est prouvée efficace pour fournir une détection précoce des algues nocives (Dinoflagellés) tel que <i>Dinophysis</i> . -IFCB permet d'avoir des images de la formation chaînes des diatomées (<i>Guinardia</i> , <i>Thalassiosira</i> , <i>Nitzschia</i> , <i>Skeletonema</i> et <i>Thalassionema</i>)	-Amélioration d'analyse d'image <i>in situ</i> et automatisée : IFCB -IFCB : les images peuvent être automatiquement classifiées. - Transfère des images à un ordinateur à distance pour le stockage et d'avantage d'analyse. -IFCB : beaucoup de diatomées et dinoflagellés, sont les composants critiques des écosystèmes côtiers de la qualité suffisante pour permettre la résolution taxonomique au genre et l'espèce. - Fréquence d'analyse : 5 ml/20min

Tableau 3 (Guiselin, 2010) : Spécificités techniques des deux méthodes de comptages phytoplanctoniques utilisées dans cette étude : la cytométrie en flux de type CytoSense et la microscopie.

	Cytométrie en flux	Microscopie traditionnelle
Comptages	10000-20000 cellules	< 500 cellules
Temps d'analyse	< 15 min	> 2 h
Qualité d'analyse	Facile à suivre	Difficile à suivre
Limite de détection	Forte	Modérée
Erreur moyenne de comptage	Faible (3%)	Modérée (10%)
Degré de classification	Difficile	Détaillé
Résultats	Paramètres physiologiques (taille, forme et pigments). Concentration des espèces dominantes entre 0,5 et > 1000 µm	Concentration de toutes les espèces entre 5 et > 1000 µm
Coût de l'instrument	Onéreux	Modéré
Coût total d'analyse (analyse + traitement des données + contrôle qualité)	1 h	4 h

Tableau 4 : Exemple d'études associant plusieurs méthodes pour l'étude du phytoplancton en différents milieux aquatiques.

Etudes	Techniques utilisées	Informations données
Cellamare 2005	Cytométrie en flux	Abondances réelles, variations temporelles du picophytoplancton, des cyanobactéries filamenteuses et des eucaryotes discriminables en cytométrie
	Microscopie à épifluorescence	Distinction des formes individuelles des formes coloniales
	Microscopie inversée	Identification des groupes et espèces non observées avec la cytométrie en flux. Identification des espèces représentatives de chaque groupe isolés avec la fonction tri du cytomètre
Roy et al. 1996	HPLC	Détermination taxonomique claire des groupes phytoplanctoniques
	Cytométrie en flux	Etude des petites cellules (< 2µm)
Rodriguez et al. 2010	HPLC	Analyse de pigments
	Cytométrie en flux	Estimation de la croissance et du taux de broutage des groupes de phytoplancton majeur à la surface de l'eau
Rolland (2009)	Microscopie optique	Informations précises (qualitatives et quantitatives) sur la diversité, le biovolume des espèces et leur dynamique spatiale et temporelle
	Spectrophotométrie	Aperçu global de la biomasse phytoplanctonique (sans tenir compte de la physiologie des cellules)
	Spectrofluorométrie <i>in situ</i>	Estimation quantitative de la biomasse phytoplanctonique active et différenciation plusieurs groupes spectraux
	Cytométrie en flux	Suivi des populations majoritaires grâce à la fonction de tri cellulaire, mise en culture et reconnaissance de ces dernières
See et al. (2005)	Analyse d'image (FlowCam)	Abondance du phytoplancton
	HPLC	détermination des pigments phytoplanctoniques
	Microscopie optique	Abondance du phytoplancton
	Microscopie à épifluorescence	Abondance du phytoplancton
	Méthode satellite	Suivi du phytoplancton à large échelle
Brewin et al. (2010)	HPLC	Validation des observations satellites
	Méthode satellite	Suivi du phytoplancton à large échelle
Thyssen 2008	HPLC, cytométrie en flux et microscopie	Identification et variabilité du phytoplancton
Guiselin	Cytométrie en flux et microscopie	Dynamique des communautés

7 REFERENCES

- Alvain S., Moulin C., Dandonneau Y., Loisel H.** (2008) Seasonal distribution and succession of dominant phytoplankton groups in the global ocean : A satellite view. *GLOBAL BIOGEOCHEMICAL CYCLES, VOL. 22, GB3001, PP.15*
- Aminot A., K erouel R.** (2004) Hydrologie des ecosystems marins : paramètres et analyses. *Book Chapter 12 172-192*
- Anneville, O., Kaiblinger, C., Tadonl k , R.D., Druart, J.C. et Dokulil, M.T.** (2008) Contribution of Long-Term Monitoring to the European Water Framework Directive Implementation. *Proceedings of Taal2007 : The 12th World Lake Conference. Sengupta, M. et Dalwani, R. (eds). pp 1122-1131.*
- Arrigo K.**, 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *NATURE Vol 437|15 September 2005 10.1038/nature04158*
- Babin M., Cullen J.J., Roesler C.S., Donaghay P.L., Doucette G.J., Kahru M., Lewis M.R., Scholin C.A., Sieracki M.E., Sosik H.M.** (2005) New approaches and technologies for observing harmful algal blooms in *Oceanography vol.18, No.2, June 2005 pp.18*
- Bauman A.G., Burt J.A., Feary D.A., Marquis E., Usseglio P.** (2010) Tropical harmful algal blooms: An emerging threat to coral reef communities? *Marine Pollution Bulletin 60 2117-2122*
- Beardsley C., Knittel K., Amann R., Pernthaler J.**, (2005). Quantification and distinction of aplastidic and plastidic marine nanoplankton by fluorescence *in situ* hybridization. *Aquatic microbial ecology. Vol. 41: 163-169, 2005.*
- Blanco A.C., Nadaoka K., Yamamoto T.** (2008) Planktonic and benthic microalgal community composition as indicators of terrestrial influence on a fringing reef in Ishigaki Island, Southwest Japan. *Marine Environmental Research 66 (2008) 520-535*
- Bouvy M., Arfi R., Bernard C., Carr  C., Got P., Pagano M., Troussellier M.** (2010) Estuarine microbial community characteristics as indicators of human-induced changes Senegal River, West Africa. *Estuarine, Coastal and Shelf Science 87 (2010) 573-582*
- Brewin R.J.W, Hardman-Mountford N.J., Lavender S.J., Raitso D.E., Hirata T., Uitz J., Devred E., Bricaud A., Ciotti A., Gentili B.** (2010) An intercomparison of bio-optical techniques for detecting dominant phytoplankton size class from satellite remote sensing. *Remote Sensing of Environment 115 (2011) 325-339*
- Brock, T.D.** (1978) Use of Fluorescence Microscopy for Quantifying Phytoplankton, Especially Filamentous Blue-Green Algae *Limnology and Oceanography Vol. 23, No. 1 pp. 158-160*
- Brzezinski M.A., Baines S.B., Balch W.M., Beucher C.P., Chai F., Dugdale R.C., Krause J.W., Landry M.R., Marchi A., Measures C.I., Nelson D.M., Parker A.E., Poulton A.J., Selph K.E., Strutton P.G., Taylor A.G., Twining B.S.** (2011) Co-limitation of diatoms by iron and silicic acid in the equatorial Pacific. *Deep-Sea Research II 58 (2011) 493-511*
- Bruyant, F.** (2002) Variations circadiennes et spatiales de la photosynth se : Etude dans différentes conditions hydrologiques et trophiques. *Thèse de doctorat, L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI), Spécialité O c nologie Biologique. pp.271*
- Buskey E.J., Hyatt C.J.** (2006) Use of the FlowCAM for semi-automated recognition and enumeration of red tide cells (*Karenia brevis*) in natural plankton samples. *Harmful Algae 5 (2006) 685-692*
- Caillault E., Hébert P.-A., Guiselin N. & Artigas L.F.** (2009) Classification de cytogrammes par appariement  lastique : Vers la discrimination automatique du phytoplancton marin par cytométrie en flux. *L'objet - 8/2009. LMO'2009, pp. 1-15*

Campbell L., Olson R.J., Sosik H.M., Abraham A., Henrichs D.W., Hyatt C.J., Buskey E.J. (2010) First harmful Dinophysis (Dinophyceae, Dinophysiales) bloom in the U.S. is revealed by automated imaging flow cytometry. *Journal of Phycology*, Vol 46(1), pp. 66–75

Caron D.A., (1983). Technique for Enumeration of Heterotrophic and Phototrophic Nanoplankton, Using Epifluorescence Microscopy, and Comparison with Other Procedures. *Applied and environmental microbiology*, Aug. 1983, p. 491-498 Vol. 46, No. 2.

Cellamare M. (2005) Mémoire de Master « Mention Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie » « Spécialité Océanographie et Environnement Marins » Dynamique et diversité du pico-, nano- et microphytoplancton des lacs Léman, d'Annecy et du Bourget. In *Mémoire de Master « Mention Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie » « Spécialité Océanographie et Environnements Marins » Année 2 pp.66*

Cellamare M., Rolland A., Jacquet S. (2009) Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton. *J Appl Phycol* 22:87–100

Claustre H., Hooker S.B., Heukelem L.V., Berthon J.-F., Barlow R., Ras J., Sessions H., Targa C., Thomas C.S., Linde D.V.D., Marty J.-C. (2003) An intercomparison of HPLC phytoplankton pigment methods using in situ samples: application to remote sensing database activities. *Marine Chemistry* 85 41– 61

Coljin F. (2006) Report on the use of Ferrybox data for validation purposes of satellite data. *Fifth Framework Programme of the European Commission 1998-2002 Energy, Environment and Sustainable Development (EESD) Programme*

Culverhouse P.F. (2007) Human and machine factors in algae monitoring performance. *Ecological Informatics* Vol.2, Issue.4, 361-366

Davey H.M., Kell D.B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analysis. *Microbiological Reviews*. pp.641-696.

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

Dubelaar G.B.J., Jonker R.R. (2000) Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. *Sci Mar* 64:135–156

Dubelaar, G. B. J., Geerders, P.J.F. (2004) Innovative technologies to monitor plankton dynamics. Scanning Flow Cytometry: A New Dimension in Real-Time, In-Situ Water Quality Monitoring. *Sea Technology*, 15-21

Dubelaar, G. B.J., Geerders, P.J.F. and Jonker, R.R. (2004) High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics. *J. Environ. Monit.*, 2004, 6, 946-952

Duhamel S. (2004) Etude quantitative et fonctionnelle des bactériophages du lac Léman : Comparaison de méthodes pour estimer la mortalité bactérienne due à la lyse virale et au broutage par les protozoaires flagellés. *Stage de DEA Océanologie Biologique effectué à la station d'Hydrobiologie Lacustre INRA, Thonon-les-Bains*, pp.32.

DYMAPHY : Développement d'un système d'observation DYnamique pour la détermination de la qualité des eaux MARines, basé sur l'analyse du PHYtoplancton (INTERREG IV A « 2 Mers Seas Zeeën » program) www.dymaphy.eu

Falkovski P.G., et Raven J.A., 2007. Aquatic photosynthesis. Second edition. Princeton.

Flemming N.C., Vallerga S., Pinardi N., Behrens H.W.A., Manzella G., Prandle D., Stel J.H. (2002): Operational Oceanography: implementation at the European and regional seas. *Proc. Second International Conference on EuroGOOS, Elsevier Oceanography Series Publication series 17.*

Frankel S.L., Binder B.J., Chrsholm S.W., Shapiro H.M. (1990) A high sensitivity flow cytometer for studying picoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 35(5) 1164-1169

- Galluzzi L., Penna A.** (2010) Quantitative PCR for detection and enumeration of phytoplankton. *In Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis pp.120*
- Garver S.A., Siegel D.A.** (1997). Inherent optical property inversion of ocean color spectra and its biogeochemical interpretation 1. *Journal of Geophysical Research, vol 102, No. C8, pp. 18,607-18,625*
- Gescher C., Metfies K., Medlin L.K.** (2010) Hybridisation and microarray fluorescent detection of phytoplankton. *In Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis pp.120*
- Goffart A.** (2010) Mise au point de l'indice composition dans le cadre de l'indicateur phytoplancton. Les indices de composition phytoplanctonique en eaux côtières. *Synthèse bibliographique. Ifremer*
- Gohin Francis, Saulquin Bertrand, Oger-Jeanneret Helene, Lozac' h L, Lampert Luis, Lefebvre Alain, Riou Philippe, Bruchon F** (2008). Towards a better assessment of the ecological status of coastal waters using satellite-derived chlorophyll-a concentrations. *Remote Sensing of Environment, 112(8), pp. 3329-3340*
- Gregor J., Marsalek B.** (2003) Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a : a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. *Water Research Vol.38, Issue.3, Pages 517-522*
- Guiselin N., Courcot L., Artigas L.F., Le Jéloux A., Brylinski J.M., 2009.** An optimised protocol to prepare *Phaeocystis globosa* morphotypes for scanning electron microscopy observation. *Journal of Microbiological Methods 77 (2009) 119–123.*
- Guiselin N., Artigas L.F. & Brylinski J.M.** (2010) Etude de la dynamique des communautés phytoplanctoniques par microscopie et cytométrie en flux, en eaux côtières de la Manche orientale. *Contrat Agence de l'Eau Artois Picardie n° 5306500 (2005-2009)*
- Guiselin N.** (2010) Etude de la dynamique des communautés phytoplanctoniques par la microscopie et cytométrie en flux, en eaux côtières de la Manche orientale ; *Thèse de doctorat Université du littoral côte d'opale pp.237*
- Hamon M.** (2004) Mesures Automatisées en Réseau pour l'Environnement Littoral *in Rapport MAREL Ifremer*
- Havskum H., Schlüter L., Scharek R., Berdalet E., Jacquet S.** (2004) Routine quantification of phytoplankton groups-microscopy or pigment analysis ? *Marine ecology. Progress series vol. 273, pp. 31-42*
- Herbland A., LeBouteiller A., Raimbault P.,** (1985). Size structure of phytoplankton in the Equatorial Atlantic Ocean. *Deep Sea Res., 32: 819-836.*
- Holm-Hansen O., Lorenzen C.J., Holmes R.W., Strickland J.D.H.,** (1965) Fluorometric determination of chlorophyll. *J Cons Perm Int Explor Mer 30:3–15.*
- Holm-Hansen O. & Riemann B.,** (1978). Chlorophyll a determination: improvements in methodology. *Oikos, 30, 438-447.*
- Hsiu-Ping L., Gwo-Ching G., and Tung-Ming H.** (2002) Phytoplankton pigment analysis by HPLC and its application in algal community investigations. *Bot. Bull. Acad. Sin. 43: 283-290*
- Hydes D.J., Wright P.N., Waddington I., Rawlinson M.B.,** (1998). Real-time monitoring of eutrophication processes using a data buoy. *Conference Proceedings Volume I.Oceanography International 98, 10-13 March 1998 Brighton, U.K. ISBN 0900254203, pp 59-67.*
- Irogoien X., Meyer B., Harris R., Harbour D.** (2004) Using HPLC pigment analysis to investigate phytoplankton taxonomy: the importance of knowing your species. *Helgoland Marine Research Vol.58, No.2, 77-82*
- Jacobsen T.R.** (1978) A quantitative method for the separation of chlorophyll a and b from phytoplankton pigments by HPLC. *Mar Sci Comm 4:33–47.*
- Jacquet S., Lennon J.-F., Marie D., Vaulot D.** (1998) Picoplankton population dynamics in coastal waters of the NW Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography. 43: 1916-1931*

- Jacquet S.** (2000) Dynamique des populations picoplanctoniques marines. *Thèse de doctorat, université de Paris 6. Spécialité : Océanologie Biologique et Environnement Marin*. pp.138
- Jacquet S., Druart J. C., Perga M., Girel C., Paolini G., Lazzarotto J., Domaizon I., Berdjeb L., Humbert J. F., Perney P., Laine L., Kerrien F.** (2008) Suivi de la qualité des eaux du lac du Bourget pour l'année 2007. *Rapport 2008*, pp.162
- Jeffrey, S.W.** (1968). Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochim. Biophys. Acta*, 162: 271-285.
- Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W.** (1997a) Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. *Monographs on oceanographic methodology, UNESCO publishing*. pp.661
- Jeffrey S.W., Vest M.** (1997b) Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In *Jeffrey, S. W., R. F. C. Mantoura & S. W. Wright (eds.), Phytoplankton pigments in oceanography*, pp 37-84. – UNESCO Publishing, Paris.
- Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E.** (2010) Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. *Paris, UNESCO. IOC Manuals and Guides, no. 55*. pp.113
- Keebler, Kelly J., Roesler, Collin S., Laine, Edward P.,** (2010) Using in situ chlorophyll methods for detection of phytoplankton biomass. *Geological Society of America Abstracts with Programs, Vol. 42, No. 1*, pp. 136
- Lampert L.** (2001). Dynamique saisonnière et variabilité pigmentaire des populations phytoplanctoniques dans l'atlantique nord (golfe de Gascogne). *Thèse de l'université de Bretagne Occidentale* pp.351
- Lampert L., Quéguiner B., Labasque T., Pichon A., Lebreton N.** (2001). Spatial variability of phytoplankton composition and biomass on the eastern continental shelf of the Bay of Biscay (north-east Atlantic Ocean). Evidence for a bloom of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) in spring 1998. *Continental Shelf Research*. Vol. 22, No 8, 1225-1247.
- Lemaire E.** (2002) Biomarqueurs pigmentaires dans les estuaires macrotidaux européens. *Thèse de l'université de Bordeaux I*, pp.236
- Lorenzen C.J.,** (1967) Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol Oceanogr* ;12:243–6.
- Mackey MD, Mackey DJ, Higgins HW, Wright SW** (1996) CHEMTAX—a program for estimating class abundance from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 144:265–283
- Madi F.,** (2010) Techniques alternatives d'étude de la dynamique et de la diversité dy phytoplancton : Utilisation de la cytométrie en flux. *Rapport bibliographique de Master Recherche Biodiversité des écosystèmes continentaux et marins université du littoral côte d'opale*. pp.28
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet S., Vaultot, D.** (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 186-193
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaultot, D. Brussaard, C.** (1999) Current protocols in cytometry. *John Wiley & Sons, Inc. New York*. 11.11.1-11.11.15
- Marin R., Scholin C.A.** (2010) Toxic algal detection using rRNA-targeted probes in a semi-automated sandwich hybridization format. In *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis* pp.120
- Mocquet, C.,** (2005) Effets des UV sur le contenu pigmentaire d'algues phytoplanctoniques, en culture et sur des populations in situ. *Mémoire de Master. Spécialité Océanographie et Environnements Marins*. pp.39
- Moon-van der Staay, S. Y., De Wachter, R. & Vaultot, D.** (2001). Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* 409:607-10.

- Olson R.J., Frankel S.L., Chisholm S.W., Shapiro M.** (1983) An inexpensive flow cytometer for the analysis of fluorescence signals in phytoplankton: Chlorophyll and DNA distributions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* Volume 68, Issue 2, 8 April 1983, Pages 129-144
- Olson R. J., Zettler E.R., Durand M.D.** (1993) Phytoplankton analysis using flow cytometry. In *Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. pp 175-186.
- Olson R.J., Chekalyuk A.M., Sosik H.M.** (1996) Phytoplankton photosynthetic characteristics from fluorescence induction assays of individual cells. *Limnol. Oceanogr.*, 41(6): 1253-1263.
- Olson R.J, Shalapyonok A., Sosik H.M.** (2003) An automated submersible flow cytometer for analyzing pico- and nanophytoplankton: FlowCytobot. *Deep-Sea Research I* 50 (2003) 301–315
- Olson, R.J., Sosik H.M.** (2007) A submersible imaging-in-flow instrument to analyze nano and microplankton: Imaging FlowCytobot. *Limnol. Oceanogr.: Methods* 5: 195–203.
- Otsuki A., Takamura N.** (1987) Comparison of chlorophyll a concentrations measured by fluorometric HPLC and spectrophotometric methods in highly eutrophic small Lake Kasumiagura. *Verh int Ver Limnol* 23:944–51.
- Padisák J., Borics G., Grigorszky I., Soróczki-Pinter E.** (2006) Use of phytoplankton assemblages for monitoring ecological status of lakes within the Water Framework Directive : the assemblage index. *Hydrobiologia*. 553 : 1-14.
- Parsons T.R., Strickland J.D.H.** (1963) Discussion of spectrophotometric determination of marine pigments with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J Mar Res* 21:155–63.
- Paxinos R., Mitchell G.J.** (2000) A rapid Utermöhl method for estimating algal numbers. *Journal of Plankton Research* Vol.22, No.12 pp.2255-2262
- Pereira G.C., Ebecken N.F.F.,** (2011) Combining in situ flow cytometry and artificial neural networks for aquatic systems monitoring. *Expert Systems with Applications* xxx (2011) xxx-xxx
- Reckermann M.** (2000) Flow sorting in aquatic ecology. *Sci Mar* 64:235–246
- Reckerman M., Colijn F., Schilling P,** 2001. Phytoplankton counting and biovolume estimation. Ring test round 2 (RT 2001), exercise report; July 2001.
- Richards F.A., Thompson T.G.** (1952) The estimation and characterization of planktonic populations by pigment analysis. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J Marine Res* 11:156–72.
- Ricquiers L.** (2008) Développement méthodologique du CytoSense : caractérisation et dynamique des micro-organismes en Manche orientale. In *Mémoire de Master 2 Recherche*. pp.36
- Rodriguez A.G., Larasa M., Estrada M., Vidal M., Marrasé C.** (2010) Carbon fluxes through major phytoplankton groups during the spring bloom and post-bloom in the North western Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research I* 57 486–500
- Roland A.** (2009) Dynamique et diversité du phytoplancton dans le réservoir marne (bassin versant de la Seine). *Thèse de doctorat Université de Savoie* pp.261
- Roy S., Chanut J., Gosselin M., Sime-Ngando T.** (1996) Characterisation of phytoplankton communities in the lower St. Lawrence Estuary using HPLC-detected pigments and cell microscopy. *Marine Ecology Progress Series*. 142:55-73
- Rutten T.P.A., Sandee B., Hofman A.R.T.** (2005). Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: a successful approach? *Cytometry*. 64: 16-26.
- Salsamo N., Morabito G., Buzzi F., Garibaldi L., Simona M., Mosello R.** (2006) Phytoplankton as an indicator of the water quality of the deep lakes south of the Alps. *Hydrobiologia*. 563 : 167-187.

- Sazhin A.F., Artigas L.F., Nejstgaard J.C., Frischer M.E.**, 2007. The colonization of two *Phaeocystis* species (*Prymnesiophyceae*) by pennate diatoms and other protists: a significant contribution to colony biomass. *Biogeochemistry* (2007) 83:137–145 - DOI 10.1007/s10533-007-9086-2.
- See J.H., Campbell L., Richardson T.L., Pinckney J.L. and Shen R.** (2005) Combining new technologies for determination of phytoplankton community structure in the northern Gulf of Mexico. *Journal of Phycology*, 41 : 305–310
- Shapiro, H.M.** (2003) Practical flow cytometry. 4th Edition. Edition: WILEY-LISS, A John Wiley & Sons, Inc., Publication. New York USA. pp.681
- Shi, X. L., Marie, D., Jardillier, L., Scanlan, D. J. & Vaultot, D.** (2009). Groups without cultured representatives dominate eukaryotic picophytoplankton in the oligotrophic South East Pacific Ocean. *PLoS ONE* 4:e7657.
- Simon N., Cras A.L., Foulon E., Lemée R.** (2009) Diversity and evolution of marine phytoplankton. *C. R. Biologies* 332: 159–170.
- Smayda, T.J.** (1997). Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1137-1153.
- Smayda T.J.** (1998) Patterns of variability characterizing marine phytoplankton, with examples from Narragansett Bay. *ICES Journal of Marine Science Vol.55, Issue4, pp.562-573*
- Swanson K.M., Flewelling L.J., Byrd M., Nunez A., Villareal T.A.**, (2010) The 2008 Texas Dinophysis ovum bloom: Distribution and toxicity. *Harmful Algae, Volume 9, Issue 2, February 2010, Pages 190-199*
- Soudant D., Belin C.** (2010) Évaluation DCE janvier 2010 Éléments d'expertise. Élément de qualité : phytoplancton. *Rapport de l'Agence de l'eau : Artois-Picardie pp.27*
- Stachowski-Haberkorn, S., Quiniou, L., Beker, B., Haberkorn, H., Marie, D. and De la Broise, D.** (2009) Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities *Ecotoxicology*, 18: 364–376.
- Stockner J.G., Antia, N.J.** (1986) Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: A multidisciplinary perspective. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43 : 2472-2503
- Thomson P.G., Davidson A.T., Enden R.v.d., Pearce I., Seuront L., Paterson J.S., Williams G.D.** (2010) Distribution and abundance of marine microbes in the Southern Ocean between 30 and 80°E. *Deep-Sea Research II* 57 815–827
- Thyssen M.** (2008) Analyse à haute fréquence spatiale et temporelle du phytoplancton à l'aide de la cytométrie en flux automatisée et immergeable. *Thèse de doctorat. pp.217.*
- Thyssen M., Mathieu D., Garcia N., Denis M.** (2008 a) Short-term variation of the phytoplankton assemblage in the bay of Marseille (France) monitored by in situ flow cytometry. *Journal of Plankton Research Vol.30 No.9 1027-1040*
- Thyssen M., Tarran G.A., Zubkov M., Holland R.J., Gregori G., Burkill P.H., Denis M.** (2008 b) The emergence of automated high-frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability. *Journal of Plankton Research Vol.30 No.3 pp.333-343*
- Thyssen M., Garcia N., Denis M.** (2009) Sub meso scale phytoplankton distribution in the north east Atlantic surface waters determined with an automated flow cytometer. *Conférence Méditerranéenne Côtière et Maritime EDITION 1, HAMMAMET, TUNISIE*
- Utermöhl von H.** (1931) Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons (Mit besondere Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Ver. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, 5, 567–595.
- Vives-Rego J., Lebaron P., Nebe-von Caron, G.** (2000) Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews.* 24 : 429-448.

Wehde H., Petersen W., Petschatnikov M., Schroeder F., Colijn F. (2003) Development and distribution of plankton observed with ferrybox system for monitoring coastal waters. *ICES Annual Science Conference 2003, 24-27 September 2003, Tallinn (Estonia)*.

Wright S.W. (2005) Analysis of phytoplankton populations using pigment markers. Course notes for a workshop « Pigment analysis of Antarctic microorganisms », *Course notes for a workshop "Pigment Analysis Of Antarctic Microorganisms", University of Malaya, June 29 – July 1*

Yentsch, C. M., Horan, P. K., Muirhead, K., Dortch, Q., Haugen, E. M., Legendre, L., Murphy, L. S., Phinney, D., Pomponi, S. A., Spinrad, R. W., Wood, A. M., Yentsch, C. S., and Zaharenc, B. J. (1983). Flow cytometry and sorting: a powerful technique with potential applications in aquatic sciences. *Limnology and Oceanography* 28: 1275–80.

Yentsch C.S. & Menzel D.W., (1963). A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep Sea Res.*, 10: 221-231.

Zhao S., Wei J., Yue H., Xiao T. (2010) Picophytoplankton abundance and community structure in the Philippine Sea, western Pacific. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* Vol. 28 No. 1, P. 88-95, 2010