

2013 - **Domaine** Evolution, fonctionnement et évaluation des écosystèmes littoraux
Action 3 Indice Composition

**Acquisition de données complémentaires
aux dénombrements, avec les techniques de
cytométrie en flux, fluorescence totale ou
spectrale. Etat d'avancement et premiers
résultats.**

Action 3. Indice Composition. Livrable n° A III

Rapport final, 23 septembre 2014

**Luis Felipe ARTIGAS (ULCO), Morgane DIDRY (CNRS-
ULCO), Vanille BARTHELEMY (CNRS-ULCO), Mathias
BROUTIN (CNRS-ULCO), Simon BONATO (ULCO), Fabrice
LIZON (UL1), Alain LEFEBVRE (IFREMER)**

Septembre 2014

AUTEURS

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

Morgane DIDRY, assistante ingénieur (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale), Morgane.Didry@univ-littoral.fr

Vanille BARTHELEMY, stagiaire D.U. GIZC ULCO (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale)

Simon BONATO, doctorant (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale), Simon.Bonato@univ-littoral.fr

Mathias BROUTIN, ingénieur d'études (CNRS UMR 8187 LOG - Université du Littoral Côte d'Opale), Communication.dymaphy@univ-littoral.fr

Fabrice LIZON, Maître de Conférences (CNRS UMR 8187 LOG – Université de Lille 1), Fabrice.Lizon@univ-lille1.fr

Alain LEFEBVRE, cadre de recherche (IFREMER LER/BL), Alain.Lefebvre@ifremer.fr

CORRESPONDANTS

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

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

AUTRES CONTRIBUTEURS

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

Eric LECUYER, technicien (CNRS UMR 8187 LOG)

Vincent DUQUESNE, technicien (IFREMER LER/BL)

Camille BLONDEL, technicienne (IFREMER LER/BL)

Droits d'usage :
Niveau géographique :
Couverture géographique : nationale

RESUME

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

Les travaux antérieurs montrent que la construction d'un indice de composition doit tenir compte de la diversité de l'ensemble du phytoplancton. Or, les comptages microscopiques ne concernent en général que le micro-phytoplancton. Il est donc nécessaire de prendre en compte des informations supplémentaires qui tiennent compte du nano- et du pico-phytoplancton, dont l'importance dans la diversité du phytoplancton est cruciale.

Afin d'appréhender la diversité du phytoplancton dans toutes ses composantes, il est donc proposé de ne pas se limiter au microphytoplancton, mais de considérer également les autres composants du phytoplancton, tels que le nano- et le pico-phytoplancton. Ceux-ci peuvent être mesurés par différentes techniques, qui sont complémentaires : cytométrie en flux traditionnelle ou cytométrie en flux permettant d'enregistrer le profil optique de chaque particule, analyse des pigments par HPLC, fluorescence spectrale, FlowCAM / Phytolmage, biodiversité génétique.

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

Les différentes actions du présent livrable concernent les échantillonnages et mesures en cours depuis 2013, principalement réalisées en collaboration entre l'UMR LOG de Wimereux et le laboratoire IFREMER LER/Boulogne, en collaboration avec les laboratoires DYNECO/PELAGOS, DYNECO/VIGIES d'IFREMER et LISIC-ULCO.

Tout particulièrement, il s'agissait de poursuivre la comparaison des résultats obtenus à partir de différentes techniques innovantes, dont la cytométrie en flux et la fluorimétrie spectrale, en appliquant ces techniques aux échantillons issus des réseaux ou des campagnes de surveillance et d'observation en cours en Manche orientale et Mer du Nord sud. Ces mesures ont été réalisées en référence aux données impliquant des comptages microscopiques et des analyses pigmentaires (méthodes traditionnelles pour le suivi du phytoplancton).

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

MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

Manche Orientale - Groupes phytoplanctoniques – Cytométrie en Flux de type Scanning – Fluorimétrie spectrale – Analyses pigmentaires

TITLE

Acquisition of complementary data, other than microscopic counts, by using techniques of flow cytometry and total or spectral fluorescence. Progress and first results.

ABSTRACT

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

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

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

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

The actions described in the present report concern the samples and continuous measurements ongoing since 2013, carried out in collaboration between the LOG laboratory (CNRS UMR 8187) from Wimereux and the laboratory IFREMER LER/Boulogne, including the participation of laboratories DYNECO/PELAGOS, DYNECO/VIGIES from IFREMER, and LISIC-ULCO from Calais. The aim was to continue the comparison of results obtained by different innovative techniques, as the flow cytometry and the spectral fluorescence, by applying these techniques to samples that come from networks or monitoring cruises ongoing in Eastern English Channel.

These measurements were carried out referring to microscopic counts and pigments analysis (traditional methods used as reference for phytoplankton monitoring).

These innovative techniques, when used at high resolution, permit a better understanding of the phytoplankton diversity and allow not only the construction of a composition index for the WFD, but help bringing some important information, that could be used to estimate the ecological quality of all marine waters, in the frame of the Marine Strategy Framework Directive.

KEY WORDS (THEMATIC AND GEOGRAPHICAL AREA)

Eastern English Channel – Phytoplankton groups – Scanning Flow Cytometry – Spectral fluorescence – Pigments analysis

SYNTHESE POUR L'ACTION OPERATIONNELLE

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

Les différentes actions du présent livrable concernent les échantillonnages et mesures en cours depuis 2013, principalement réalisées en collaboration entre l'UMR LOG de Wimereux et le laboratoire IFREMER LER/Boulogne, en collaboration avec les laboratoires DYNECO/PELAGOS, DYNECO/VIGIES d'IFREMER et LISIC-ULCO.

Tout particulièrement, il s'agissait de poursuivre la comparaison des résultats obtenus à partir de différentes techniques innovantes, dont la cytométrie en flux et la fluorimétrie spectrale, en appliquant ces techniques aux échantillons issus des réseaux ou des campagnes de surveillance et d'observation en cours en Manche orientale et Mer du Nord sud. Ces mesures ont été réalisées en référence aux données impliquant des comptages microscopiques et des analyses pigmentaires (méthodes traditionnelles pour le suivi du phytoplancton).

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

- Le transect côte-large proche du Déroit du Pas-de-Calais (Radiale de la Baie Saint Jean – Wimereux-Slack), constitué de neuf points (R0 à R4) et s'étendant sur 9,7km (5.25 milles nautiques). En 2013, les prélèvements sur le gradient côte-large ont été réalisés depuis mars : 7 radiales complètes et 7 radiales de 3 à 7 points ont ainsi été échantillonnées. Des mesures de fluorescence spectrale et de cytométrie en flux ont été réalisées (données non présentées, en cours d'analyse), ainsi que quelques analyses pigmentaires (HPLC, données non présentées, en cours d'analyse), des comptages phytoplanctoniques associés et des analyses d'image (d'avril à juillet 2013, 5 radiales, données en cours d'analyse).
- Le réseau de surveillance de la qualité des eaux marines côtières (Suivi Régional Des Nutriments SRN – Réseau de suivi du phytoplancton et des phycotoxines REPHY, IFREMER), avec trois stations en face de Boulogne-sur-Mer, trois stations en face de Dunkerque et cinq stations en Baie de Somme. En ce qui concerne les analyses réalisées sur ces échantillons SRN, des mesures de fluorescence spectrale, de cytométrie en flux et d'analyse d'images (d'avril à août) complémentaires aux comptages phytoplanctoniques ont été réalisées sur les sites de Dunkerque (6 x 3 points d'avril à octobre), de Boulogne sur Mer (5 x 3 points d'avril à juillet) et en Baie de Somme (8 x 5 points d'avril à octobre).
- Le Service d'Observation Littorale SOMLIT de l'INSU, avec une station côtière et une station au Sud de Boulogne-sur-Mer. Les analyses ont été faites sur les stations côte et/ou large SOMLIT, de mars à octobre 2013 (7 fois, dont 5 sur des échantillons à la fois côte et large), en parallèle avec des mesures cytométriques classiques (nano- et picoplancton) et des comptages microscopiques.

Les analyses sont en cours et seront exploitées ensemble avec quelques données acquises en 2014.

La stratégie ici consiste à augmenter la fréquence des échantillonnages dans le cadre du réseau de recherche Wimereux-Slack (campagnes DYPHYRAD, radiale Baie Saint-Jean), mais également et surtout d'étendre l'utilisation de ces techniques innovantes aux réseaux d'observation et surveillance de la région (SRN, REPHY, SOMLIT).

Seuls les points côtiers des différents réseaux (R0-R0'-R1, BL1...) se situent dans les masses d'eau définies par la DCE. Les autres points représentent des masses d'eau de transition (cas des points estuariens Baie de Somme du réseau SRN), ainsi que des eaux frontales et du large et peuvent donc servir de point de comparaison pour les différentes méthodes.

Les suivis analysés dans ce rapport comportent quelques stations de masses d'eau DCE, notamment les trois premières stations de la radiale Saint-Jean. Les stations du large, de même que les stations correspondant à des masses d'eau de transition (cas des points estuariens Baie de Somme du réseau SRN), pourraient représenter des stations de référence par rapport aux stations littorales car représentant toujours des stations de faible profondeur (maximum 50m au milieu de la Manche), même si les zones frontales représentent des stations d'accumulation à prendre en compte pour le programme de surveillance à mettre en place pour la DCSMM.

De même, comme elles comportent des compositions phytoplanctoniques parfois différentes des stations côtières, elles permettent de compléter et élargir l'éventail de compositions phytoplanctoniques disponibles pour l'intercomparaison des méthodes.

Les différentes méthodes d'analyses utilisées dans ce suivi de l'abondance et de la biomasse du phytoplancton ont été décrites dans le tableau ci-dessous.

	Abondances par taxon	Biomasses par taxon	Discrimination	Groupes identifiés
Cytométrie en flux de type Cytosense (Cytobuoy®) : application de la technique de Scanning Flow Cytometry	+	+	Valeurs de concentrations absolues (cellules ou fluorescence-proxy équivalents chlorophylle <i>a</i>) par classes de taille et par fluorescence (dépendant de la concentration et de la composition pigmentaire). 8 à 10 groupes de taxons.	<u>Picoplancton</u> -Cyanobactéries (<i>Synechococcus</i>) -Picoeucaryotes I -Picoeucaryotes II <u>Nanoplancton</u> - <i>Phaeocystis globosa</i> -Cryptophytes -Coccolithophoridés <u>Microplancton</u> -Groupe composite : diatomées + colonies de <i>Phaeocystis</i> + dinoflagellés -Diatomées pennées
Fluorimétrie spectrale : cas de la sonde Fluoroproberbe Moldaenke®		+	Valeurs absolues. Limité à 4 groupes spectraux (correspondant à des groupes pigmentaires), mais possibilité de rajouter des empreintes pour discriminer des groupes/espèces d'intérêt (adaptation aux particularités de la région).	-" Algues bleues" (Cyanobactéries à phycocyanine majoritaire) -" Algues vertes" (Chlorobiontes) -" Algues brunes" (diatomées, dinoflagellés, haptobiontes...) -" Cryptophytes" : groupe mixte comprenant Cryptobiontes et Cyanobactéries à phycoérythrine majoritaire - <i>Phaeocystis</i> : empreinte ajoutée

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



Rapport Final

**Participation à la définition d'un indice composition pour
le phytoplancton en Manche - Atlantique
Action Indice Composition. Livrable n° A III**

***Rapport sur l'acquisition de données complémentaires
aux dénombrements, avec les techniques de cytométrie
en flux, fluorescence totale ou spectrale.
Etat d'avancement et premiers résultats***

Février 2014

Luis Felipe ARTIGAS

Morgane DIDRY

Vanille BARTHELEMY

Mathias BROUTIN

Simon BONATO

Fabrice LIZON

Alain LEFEBVRE



Table des matières

I) Contexte de l'action	3
II) Description de l'action.....	4
III) Matériel et méthodes	5
1) Aire d'échantillonnage régulier en Manche Orientale et Mer du Nord.....	5
2) La fluorescence spectrale et la cytométrie en flux de type « Scanning Flow Cytometry »	7
III) Résultats préliminaires.....	8
1) Dynamique saisonnière et distribution du phytoplancton en Manche Orientale (Station côtière R1 – Radiale Baie Saint Jean)	8
2) Dynamique de la distribution spatiale du phytoplancton en Manche Orientale (Radiale Baie Saint Jean) au printemps 2013	9
VI) Conclusion – Perspectives	11
Bibliographie	12

I) Contexte de l'action

Les micro-organismes phytoplanctoniques, à la base de la plupart des réseaux alimentaires marins, sont capables d'intégrer des perturbations naturelles ou induites par l'homme, en modifiant leur physiologie, leur taux de croissance et/ou en conduisant à la dominance d'une espèce ou groupe fonctionnel (modification de la biodiversité). Ils peuvent par conséquent être utilisés comme indicateurs de changements à court et long terme de la qualité de l'eau. De plus, le phytoplancton peut représenter une menace lorsqu'il est responsable de floraisons nuisibles.

Ces efflorescences peuvent provoquer des colorations des eaux, l'asphyxie ou le déclin de la végétation. Les aérosols qui s'en dégagent peuvent avoir des conséquences directes sur la santé humaine. Les écumes et mucus associés peuvent s'accumuler sur les rives et obstruer les filets des scientifiques. Les coquillages peuvent être contaminés par les toxines algales et les poissons et invertébrés tués lors de ces efflorescences toxiques.

La détection précoce de ces événements est essentielle pour déclencher les procédures d'alertes et pour la diffusion de l'information auprès des institutions, des professionnels, des centres d'aquacultures, des fermes d'élevage, des autorités et du grand public.

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

Les travaux antérieurs montrent que la construction d'un indice de composition doit tenir compte de la diversité de l'ensemble du phytoplancton. Or, les comptages microscopiques ne concernent en général que le micro-phytoplancton. Il est donc nécessaire de prendre en compte des informations supplémentaires qui tiennent compte du nano- et du pico-phytoplancton, dont l'importance dans la diversité du phytoplancton est cruciale.

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

Faisant suite au 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), lequel, co-financé par des fonds FEDER entre 2010 et 2014, visait à améliorer les connaissances et l'évaluation des eaux marines de La Manche et de la Mer du Nord à travers le compartiment phytoplanctonique et ses paramètres complémentaires (<http://www.dymaphy.eu>), les techniques de cytométrie en flux et de fluorimétrie spectrale ont continué à être appliquées au niveau des réseaux d'observation et surveillance en Manche Orientale et Sud Mer du Nord, en association avec les premières mesures réalisées par prise d'image automatisée de type FlowCAM/PhytoImage (cf. livrables All fiche « Indice Composition » et livrables 3 et 4 fiche « FlowCAM/Zoo-PhytoImage

II) Description de l'action

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

Les différentes actions du présent livrable concernent les échantillonnages et mesures en cours depuis 2013, principalement réalisées en collaboration entre l'UMR LOG de Wimereux et le laboratoire IFREMER LER/Boulogne, en collaboration avec les laboratoires DYNECO/PELAGOS, DYNECO/VIGIES d'IFREMER et LISIC-ULCO.

Tout, particulièrement, il s'agissait de poursuivre la comparaison des résultats obtenus à partir de différentes techniques innovantes, dont la cytométrie en flux, la fluorimétrie spectrale, en appliquant ces techniques aux échantillons issus des réseaux ou des campagnes de surveillance et d'observation en cours en Manche orientale et sud de la Mer du Nord. Ces mesures ont été réalisées en référence aux données impliquant des comptages microscopiques et des analyses pigmentaires (méthodes traditionnelles pour le suivi du phytoplancton).

III) Matériel et méthodes

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

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

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

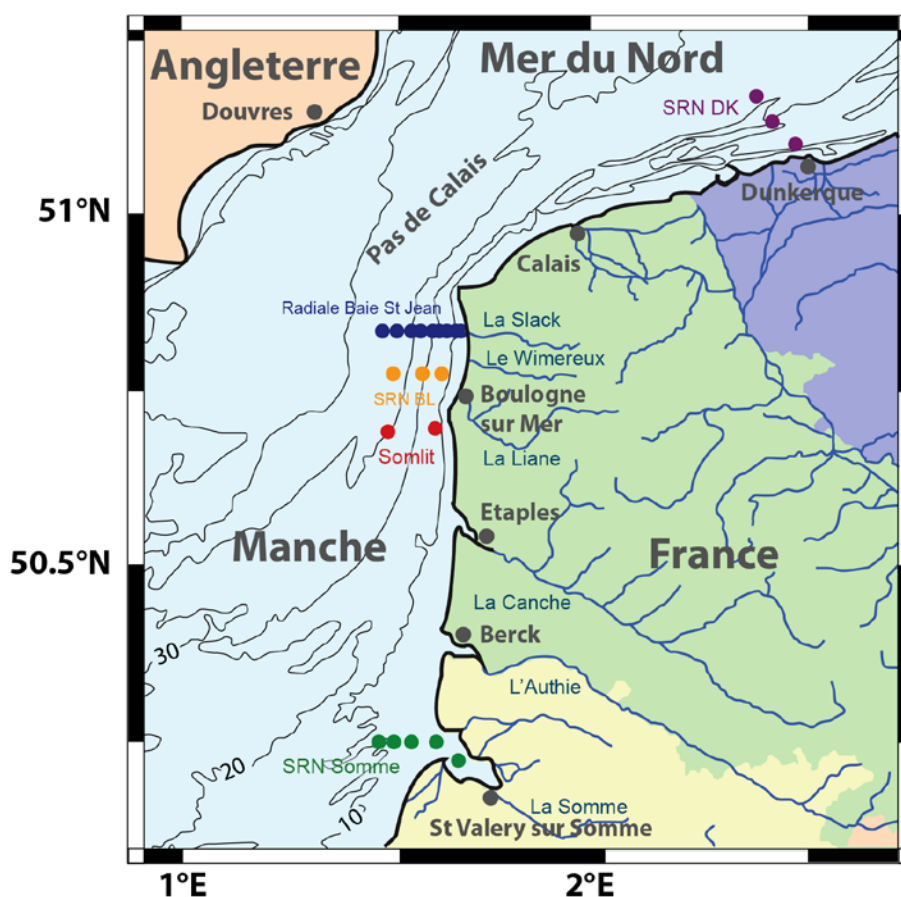


Figure 1 : Localisation des sites d'observation/surveillance du phytoplancton en Manche Orientale et baie sur Mer du Nord (SRN-IFREMER, SOMLIT-INSU, Radiale Baie St Jean – RESOMAR – DYMAPHY).

Convention ONEMA-Ifremer 2013

En 2013, les prélèvements sur le gradient côte-large ont été réalisés depuis mars : 7 radiales complètes et 7 radiales de 3 à 7 points ont ainsi été échantillonnées. Des mesures de fluorescence spectrale et de cytométrie en flux ont été réalisées (données non présentées, en cours d'analyse), ainsi que quelques analyses pigmentaires (HPLC, données non présentées, en cours d'analyse), des comptages phytoplanctoniques associés et des analyses d'image (d'avril à juillet 2013, 5 radiales, données en cours d'analyse).

En ce qui concerne les analyses réalisées sur des échantillons SRN, des mesures de fluorescence spectrale, de cytométrie en flux et d'analyse d'images (d'avril à août) complémentaires aux comptages phytoplanctoniques ont été réalisées sur les sites de Dunkerque, de Boulogne sur Mer et en Baie de Somme.

Finalement, des analyses ont été faites sur les stations côte et/ou large SOMLIT, de mars à octobre 2013, en parallèle avec des mesures cytométriques classiques (nano- et picoplancton) et des comptages microscopiques.

Les analyses sont en cours et seront exploitées ultérieurement. Les résultats des réseaux SRN et SOMLIT ne seront donc pas présentés dans ce rapport, mais seront exploités avec les données de 2014, de même que les données correspondant à 2012 et pas encore présentées dans le livrable AII.

2) La fluorescence spectrale et la cytométrie en flux de type « Scanning Flow Cytometry »

Les techniques utilisées sont présentées dans le Tableau 1. Pour plus de détails sur les techniques de fluorescence spectrale et de cytométrie en flux, ainsi que leur application avec des appareils tels que le Fluoroprobe ou le Cytomètre en Flux Cytosense, se référer à la partie Matériels et Méthodes du rapport AII (Artigas *et al.*, 2014).

Tableau 1 : Présentation des méthodes de cytométrie en flux et de fluorescence spectrale.

	Abondances par taxon	Biomasses par taxon	Discrimination	Groupes identifiés
Cytométrie en flux de type Cytosense (Cytobuoy [®]) : application de la technique de Scanning Flow Cytometry	+	+	Valeurs de concentrations absolues (cellules ou fluorescence-proxy équivalents chlorophylle <i>a</i>) par classes de taille et par fluorescence (dépendant de la concentration et de la composition pigmentaire). 8 à 10 groupes de taxons.	<u>Picoplancton</u> -Cyanobactéries (<i>Synechococcus</i>) -Picoeucaryotes I -Picoeucaryotes II <u>Nanoplancton</u> - <i>Phaeocystis globosa</i> -Cryptophytes -Coccolithophoridés <u>Microplancton</u> -Groupe composite : diatomées + colonies de <i>Phaeocystis</i> + dinoflagellés -Diatomées pennées
Fluorimétrie spectrale : cas de la sonde Fluoroprobe-bbe Moldaenke [®]		+	Valeurs absolues. Limité à 4 groupes spectraux (correspondant à des groupes pigmentaires), mais possibilité de rajouter des empreintes pour discriminer des groupes/espèces d'intérêt (adaptation aux particularités de la région).	- "Algues bleues" (Cyanobactéries à phycocyanine majoritaire) - "Algues vertes" (Chlorobiontes) - "Algues brunes" (diatomées, dinoflagellés, haptobiontes...) - "Cryptophytes" : groupe mixte comprenant Cryptobiontes et Cyanobactéries à phycoérythrine majoritaire - <i>Phaeocystis</i> : empreinte ajoutée

III) Résultats préliminaires

1) Dynamique saisonnière et distribution du phytoplancton en Manche Orientale (Station côtière R1 – Radiale Baie Saint Jean)

La dynamique saisonnière du phytoplancton a été suivie de façon hebdomadaire par les techniques de cytométrie en flux et de fluorescence au niveau d'une radiale côte-large à proximité du détroit du Pas de Calais (radiale Baie Saint Jean, au large des fleuves Wimereux et Slack). Ici, nous ne présentons que les résultats concernant la fluorescence spectrale, les données cytométriques étant encore en cours d'analyse.

En fin d'hiver-début de printemps 2013, on détecte un premier pic printanier d'accumulation de biomasse phytoplanctonique décelé à la fois en termes de concentration chlorophyllienne et de fluorescence totale, majoritairement dû aux diatomées et au début d'accumulation de nanophytoplancton (cryptophytes et *Phaeocystis globosa*).

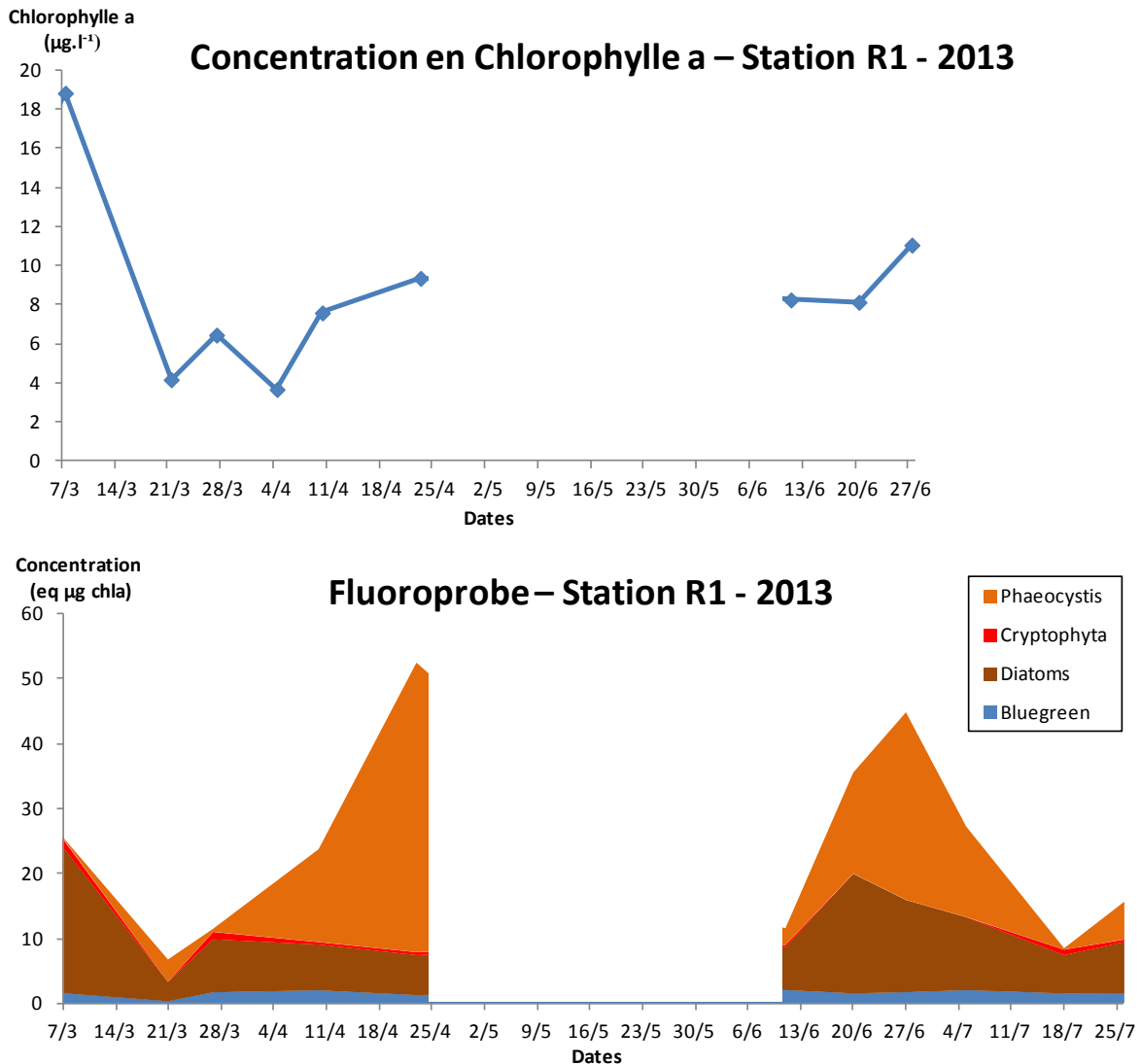


Figure 1 : Dynamique saisonnière des concentrations en chlorophylle a (haut) et des groupes spectraux phytoplanctoniques déterminés par fluorimétrie spectrale- Fluoroprobe (bas) au cours du printemps 2013 – Station, R1 (radiale Baie Saint Jean)

Par la suite, le bloom de *Phaeocystis globosa* se met en place et on assiste à une augmentation de la biomasse nanoplanctonique (*Phaeocystis*) alors que celle des diatomées reste stable. Cette augmentation est atténuée en termes de concentration chlorophyllienne, même si elle est décelable.

Après une période d'interruption de l'échantillonnage en raison du mauvais temps, la reprise nous montre une seconde phase d'augmentation est mise en évidence à la fin du printemps, à la fois dû aux cellules nanoplanctoniques (*Phaeocystis*) et aux diatomées, remontée du même ordre de grandeur que celle du mois d'avril.

2) Dynamique de la distribution spatiale du phytoplancton en Manche Orientale (Radiale Baie Saint Jean) au printemps 2013

L'examen de la distribution spatiale des groupes phytoplanctoniques a été réalisé en référence à la répartition des concentrations en chlorophylle *a* totale, en termes de fluorescence à la fois par cytométrie en flux (données non présentées car encore en cours d'analyse) et par fluorescence spectrale à différents moments du printemps 2013 (Figure 2).

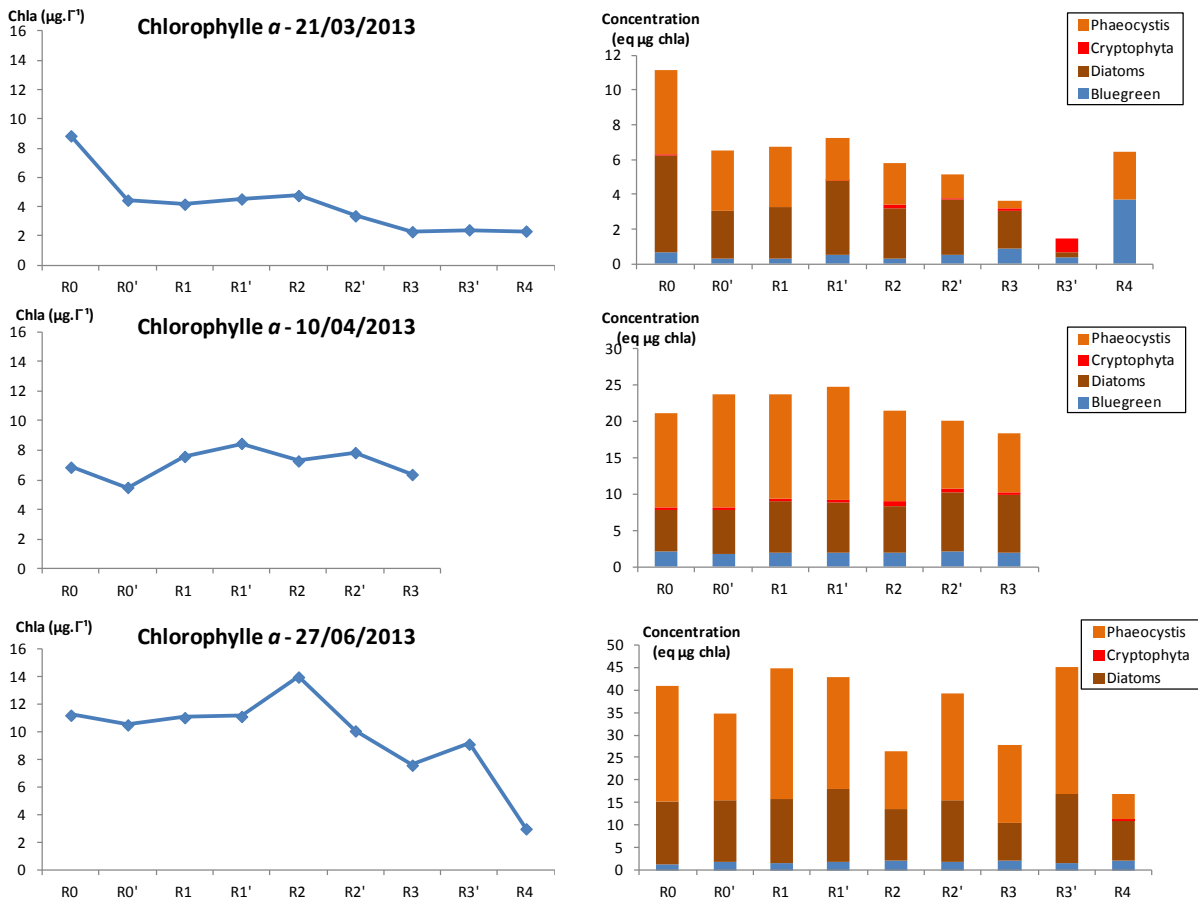


Figure 2: Dynamique de la distribution spatiale des concentrations en chlorophylle *a* (gauche) et des groupes spectraux phytoplanctoniques déterminés par fluorimétrie spectrale- Fluoroprobe (droite) au cours du printemps 2013 – Station R1 (radiale Baie Saint Jean)

Convention ONEMA-Ifremer 2013

Des périodes distinctes de la mise en place, déroulement ou déclin des blooms phytoplanctoniques ont ainsi été mises en évidence au sein d'un gradient côte-large proche du détroit du Pas de Calais (radiale de la Baie Saint Jean), à haute résolution spatiale (résolution infra-kilométrique).

Au début du printemps, une décroissance a été enregistrée en terme de fluorescence ainsi que par les mesures des concentrations pigmentaires (chlorophylle *a*). Les valeurs absolues des concentrations pigmentaires dépassent les 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$ à la côte. Les diatomées sont majoritaires, suivies par les Haptophytes (*Phaeocystis*). Cyanobactéries (« Bluegreen algae ») et Cryptophytes deviennent importantes au large.

Au milieu du printemps, les valeurs totales se stabilisent le long du gradient, présentant un léger maximum au niveau des stations frontales (R1'). L'espèce *Phaeocystis globosa* devient majoritaire en termes de fluorescence, même si les diatomées sont bien représentées notamment au large (ainsi que les cyanobactéries).

A la fin du printemps, les concentrations chlorophylliennes demeurent à leurs plus forts niveaux, de même que les données fluorimétriques, stables à la côte et décroissantes au-delà du front (notamment en termes de concentrations chlorophylliennes). Hormis la station du large, le Fluoroprobe continue à détecter majoritairement des Haptophytes (*Phaeocystis*) mais également de forts niveaux de diatomées pouvant dépasser ponctuellement 50% par rapport à la fluorescence totale.

VI) Conclusion – Perspectives

Le suivi combiné de la distribution spatiale phytoplanctonique à haute résolution (kilométrique ou sub-kilométrique) au cours de campagnes d'observation régulières réalisées à résolution temporelle hebdomadaire (radiale Baie Saint Jean) ou bi-hebdomadaire (SRN et SOMLIIT) permettront de mettre en évidence, par des techniques complémentaires aux comptages microscopiques, la complexité des proliférations/accumulation, des changements de dominance d'un groupe phytoplanctonique à un autre, répondant à des changements des conditions du milieu et d'avancée de la saison.

Les analyses pigmentaires (en cours d'analyse) permettront de compléter les données de référence auxquelles les techniques semi-automatisées, telles que la cytométrie en flux de type scanning (CytoSense, données encore en cours d'analyse) et la fluorimétrie spectrale, pourront être comparées, en plus des comptages microscopiques.

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

Le but serait alors de généraliser l'utilisation de ces techniques sur d'autres sites de surveillance DCE et lors d'autres campagnes d'observation afin de renforcer et tester leurs limites d'applicabilité, ainsi que celles des indicateurs en construction.

Bibliographie

Artigas L.F., Didry M., Lampert L., Barthélémy V., Bonato S., Lizon F., Broutin M., Gomez F., Lefebvre A. (2014). *Comparaison des résultats obtenus avec différentes techniques d'évaluation du phytoplancton antérieurement à 2013*. Rapport ONEMA-Ifremer. Action Indice Composition Livrable n°All.

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

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

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

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

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

Houliez E., Lizon F., Thyssen M., Artigas L.F., Schmitt F. (2011) Spectral fluorometric characterization of Haptophytes dynamics using the Fluoroprobe: an application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *Journal of Plankton Research* vol.34, n°2, pp. 136-151.

Olson R.J., Zettler E.R. and Durand M.D. (1993) *Phytoplankton analysis using flow cytometry*. p. 175-186. In P. F. Kemp, B. F. Sherr, and J. J. Cole [eds.], *Aquatic microbial ecology*. Lewis.

Ruser A., Popp P., Kolbowski J., Reckermann M., Feuerpfeil P., Egge B., Reineke C., Vanselow K.H. (1999) *Comparison of chlorophyll-fluorescence based measuring systems for the detection of algal groups and the determination of chlorophyll-a concentrations*. *Berichte Forsch.-u. technologiezent. Westküste d. Univ. Kiel*, 19:27-38.

Rutten T.P.A., Sandee B., Hofman A.R.T. (2005) Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: a successful approach? *Cytometry A* 64A:16–26.

Convention ONEMA-Ifremer 2013

Sosik H.M., Olson R.J. (2007) Automated taxonomic classification of phytoplakton sampled with imaging-in-flow cytometry. *Limnol Oceanogr Meth* 5:204-216.

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 : Sciences de l'Environnement Marin. Université de la Méditerranée. 203p.

Thyssen M., Beker B., Ediger D., Yilmaz D., Garcia N. and Denis M. (2010) Phytoplankton analysis during two contrasted summers in a Mediterranean harbour: contribution of submersible flow cytometry to conventional observation techniques. *EMAS*