



UNIVERSITE DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

CNRS UMR LOG 8187

Ecologie planctonique

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DU LITTORAL-COTE D'OPALE

Discipline : Océanologie Biologique

**Etude de la dynamique des communautés
phytoplanctoniques par microscopie et cytométrie en flux,
en eaux côtières de la Manche orientale**

Présentée et soutenue publiquement le 29 janvier 2010

par

Natacha GUISELIN

Devant le jury composé de :

Dr Michel Denis (Dr, CNRS, Université de la Méditerranée)	Rapporteur
Pr Koen Sabbe (Pr, Université de Gent, Belgique)	Rapporteur
Dr Alain Lefebvre (CR, IFREMER)	Examinateur
Dr Jean Prygiel (CR, Agence de l'Eau Artois-Picardie)	Examinateur
Pr Jean-Michel Brylinski (ULCO)	Directeur de thèse
Dr Luis Felipe Artigas (ULCO)	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail, en particulier Messieurs Denis et Sabbe qui ont assuré la tâche de rapporteur. Je remercie également Messieurs Prygiel et Lefebvre qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Messieurs les Professeurs François Schmitt, Directeur de l'UMR CNRS LOG 8193, et Rachid Amara, Directeur de la Maison de la Recherche en Environnements Naturels, pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires.

Je remercie tout particulièrement Messieurs Jean-Michel Brylinski et Luis Felipe Artigas d'avoir dirigé et encadré ce travail de thèse. Je les remercie de leurs conseils, de leur disponibilité et surtout de leur patience pour le temps consacré aux réunions et aux corrections surtout pendant les week-ends et les vacances.

Monsieur Luis Felipe Artigas m'a encadré depuis mon premier stage en maîtrise et m'a initié à l'écologie microbiologique. Il m'a fait partager ses connaissances, toujours avec passion et un enthousiasme « spectaculaire ». Je lui suis particulièrement reconnaissante de son soutien dans les phases difficiles (campagnes océanographiques, colloque, rédaction !). Je lui communique ici toute ma gratitude et ma sympathie.

Je remercie ici toutes les fées et lutins sans qui ce projet n'aurait pas été possible.

Tout d'abord, je souhaite remercier ma fée marraine, Lucie Courcot. Elle m'a encadré dès mon stage de maîtrise et m'a initié à « l'art » subtil du microscope électronique à balayage. Merci d'avoir partagé toutes ces heures à la découverte du monde merveilleux du phytoplancton et d'avoir eu à digérer tout ce jargon taxonomique (mention spéciale à Waterman). Merci pour tous ses conseils, son écoute, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Je remercie également Vincent Cornille, véritable compagnon de galère contre vents et marées. Je lui dois notamment toutes les campagnes et manips en mer surtout celles à « haute fréquence » qui lui ont coûté beaucoup de temps...même pendant les week-ends.

Je souhaite également remercier mon binôme cytométrique, Xavier Mériaux, pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience (que j'avoue avoir mis à rude épreuve). Mais j'espère qu'il se souviendra plutôt des séjours bucoliques au pays des tulipes. Merci aussi pour le co-voiturage et l'entraide calaisienne.

Par ailleurs, je souhaite remercier Elsa Breton pour les cultures et les analyses HPLC. Merci également à Urania Christaki et Dorothée Vincent pour leur conseils et leur aide dans la rédaction d'articles. Je remercie Nicole Degros pour les analyses chimiques et HPLC, Eric Lecuyer pour l'initiation aux prélèvements et à l'analyse de l'ammonium.

Je remercie également les Ifremériens, tout particulièrement, Alain Lefebvre qui m'a encadré au cours de mon stage de DEA, et a bien voulu poursuivre la collaboration. Je souhaite également remercier Pascale Hébert pour m'avoir initié à la reconnaissance phytoplanctonique, Camille pour avoir partagé la cabine de la Thalassa ainsi que Yves Vérin et Jean-Paul Delpech, pour la campagne IBTS.

Merci à toute l'équipe calaisienne du LASL, Messieurs Denis Hamad, Pierre-Alexandre Hébert, Guillaume Wacquet et Madame Emilie Caillault. Il n'a pas toujours été facile de communiquer avec nos jargons scientifiques respectifs mais cela a été un réel plaisir de collaborer avec vous. Mention spéciale à Guillaume pour tous tes éclaircissements mathématiques.

Merci à Michel Denis et Mélilothus Thyssen de m'avoir aimablement accueilli à Marseille au cours d'une formation qui fut certes brève mais très instructive. Je souhaite également remercier Georges Dubelaar et la CytoBuoy's team qui nous ont toujours accueilli avec gentillesse au sein de leur entreprise.

Merci à tout le personnel de la MREN qui rend le quotidien plus agréable à coup de pauses café. Merci à Joni, dernier survivant de la promo de bio 2001 et ami. Merci Frère pour ton soutien et tes encouragements. Merci à la pétillante Karin qui est devenue une véritable amie au delà des murs de la MREN (et j'espère au delà des frontières). Merci à Domy et Ivaneide, pour avoir partagé leur expérience. Merci à Séverine pour les conseils vétérinaires et les promenades sur la digue. Merci à Lucile, coloc' de colloque.

Merci à toutes les personnes que j'aurais oubliées...

Cette étude n'aurait pu être menée à bien sans le soutien financier de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie et la région Nord – Pas de Calais qui ont co-financé ce travail de recherche. Ce travail s'inscrit dans le cadre de deux programmes de recherche, « CPER Ecosystèmes perturbés du littoral: bloom de *Phaeocystis* » et « PNEC Chantier Manche orientale – Sud Mer du Nord ».

Les campagnes océanographiques ont été réalisées à bord du « SEPIA II », mis à disposition par l’Institut National des Sciences de l’Univers (INSU). Merci à l’équipage Charlie, Greg et Noël pour leur aide précieuse.

Je remercie ma famille et belle-famille de m’avoir soutenu, encouragé et supporté au cours de ces 4 années. Merci à tous les amis qui ont eu la patience et le courage de s’accrocher à notre amitié : Jo, Soso & Nono, Max, Ali, Maria...

Enfin, ce travail n’aurait jamais pu aboutir sans le soutien et l’aide de Mathieu. Merci pour tout ce que tu m’apportes, pour ta confiance et ton réconfort. Pour le pire et le meilleur (comme dirait Johnny Hallyday)... Je te dédie cette thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : Matériel et méthodes	11
I. Site d'étude et stratégie d'échantillonnage	11
I.1. Présentation du site d'étude.....	11
I.2. Stratégie d'échantillonnage	13
I.2.1. Etude réalisée à la station SRN1	14
I.2.2. Etudes réalisées à la station R1	15
II. Acquisition des données	17
II.1. Paramètres environnementaux	17
II.1.1. Paramètres physiques	17
II.1.2. Paramètres chimiques.....	17
II.1.2.1. Sels nutritifs.....	17
II.1.2.1.1. Carbone organique dissout (COD)	19
II.2. Abondance et biomasse phytoplanctonique	20
II.2.1. Chlorophylle a	20
II.2.2. Analyses microscopiques	20
II.2.2.1. Identification et analyses au Microscope Electronique à Balayage (MEB)	21
II.2.2.2. Comptages par microscopie à inversion.....	24
III. Mise au point et application du cytomètre en flux, CytoSense	26
III.1. Principe des mesures avec le cytomètre en flux CytoSense.....	26
III.2. Caractéristiques techniques du CytoSense	26
III.2.1. Le système fluidique	26
III.2.2. Le système optique.....	29
III.2.3. Le système électronique	30
III.3. Analyses cytométriques.....	32
III.3.1. Calibration et entretien de routine	32
III.3.1.1. Calibration	32
III.3.1.2. Entretien de l'appareil	32
III.3.2. Protocole de mesure	33
III.3.2.1. Acquisition	33
III.3.2.2. Cultures	34
III.4. Traitement des données cytométriques	34
III.4.1. Méthode de classification manuelle	34
III.4.2. Méthode de classification automatique	36
III.4.2.1. Présentation de la base de données cytométriques	36
III.4.2.2. Présentation du dispositif de classification automatique	37
III.5. Développements méthodologiques	39
III.5.1. Comparaison des méthodes de comptage : cytométrie vs microscopie.....	39
III.5.2. Caractéristiques cytométriques des cultures	40

IV. Traitement statistique et analyse des données	44
IV.1. Analyses graphiques.....	44
IV.1.1. Boîtes de dispersion	44
IV.1.2. Courbe des sommes cumulées.....	44
IV.1.3. Modèle de lissage	45
IV.2. Analyses univariées	45
IV.2.1. Analyse de la biodiversité	45
IV.2.2. Régression linéaire simple	46
IV.3. Analyses multivariées	46
IV.3.1. Analyses factorielles	46
IV.3.2. Analyse des redondances	47
IV.3.3. Matrice de corrélation de Spearman.....	47

CHAPITRE II : Variabilité à long terme (1992-2007) des communautés phytoplanctoniques en Manche orientale **49**

Introduction	49
I. Evolution saisonnière des conditions chimiques et biologiques	51
I.1. Sels nutritifs.....	51
I.2. Chlorophylle <i>a</i>	53
II. Evolution interannuelle des conditions chimiques et biologiques.....	54
II.1. Sels nutritifs.....	54
II.2. Chlorophylle <i>a</i>	56
III. Structure des communautés phytoplanctoniques.....	57
III.1. Composition des communautés phytoplanctoniques	57
III.2. Variations et succession saisonnières.....	59
III.3. Variations et succession interannuelles.....	64

Discussion..... **67**

CHAPITRE III : Succession saisonnière des communautés phytoplanctoniques au cours du printemps en zone côtière de la Manche orientale **73**

Introduction	73
I. Contexte environnemental.....	75
I.1. Conditions météorologiques et hydrographiques	75
I.2. Conditions hydrologiques de surface	77
I.2.1. Température et salinité	77
I.2.2. Conditions chimiques et biologiques	79
I.3. Conditions hydrologiques de la colonne d'eau	83
II. Communautés phytoplanctoniques	85
II.1. Composition et contribution des espèces phytoplanctoniques	85
II.2. Variations temporelles des communautés phytoplanctoniques	87

II.2.1. Variations de la biodiversité.....	87
II.2.2. Variations des stocks phytoplanctoniques.....	90
II.2.3 Variations des espèces phytoplanctoniques	92
II.2.4 Variations des morphotypes de <i>Phaeocystis globosa</i>	94
III. Influence environnementale sur les blooms phytoplanctoniques	96
IV. Structure des communautés phytoplanctoniques.....	102
IV.1 Morphologie et stratégie adaptative des espèces.....	102
IV.2. Analyse de la variabilité des assemblages phytoplanctoniques	104
IV.3. Relations entre les assemblages phytoplanctoniques et les variables environnementales	108
Discussion.....	113
 CHAPITRE IV : Application de la cytométrie en flux à l'étude de la variabilité à court terme du phytoplancton	127
Introduction	127
I. Les classes phytoplanctoniques rencontrées en milieu naturel.....	131
I.1. Identification des groupes	131
I.1.1. Les groupes de cellules de <i>Phaeocystis globosa</i>	133
I.1.2. Les groupes de cellules à fluorescence jaune	134
I.1.3. Les groupes de diatomées	136
I.2. Validation à l'échelle saisonnière	136
I.3. Essai d'automatisation de reconnaissance.....	138
II. Variabilité à court terme	141
II.1. Variations à court terme des facteurs environnementaux	143
II.1.1. Contexte climatique.....	143
II.1.2. Contexte hydrologique et chimique	144
II.3. Variations à court terme des groupes phytoplanctoniques.....	147
II.3.1. Evolution de l'abondance des groupes.....	147
II.3.2. Evolution des paramètres cellulaires des groupes.....	151
II.4. Relations entre les classes phytoplanctoniques et les conditions environnementales.....	153
II.5. Essai d'étude de variabilité journalière des groupes phytoplanctoniques.....	154
Discussion	156
 DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	165
 BIBLIOGRAPHIE	175

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE

Importance des zones côtières et rôle du phytoplancton

Les zones côtières constituent des espaces d'interface entre l'océan, la terre et l'atmosphère. Ces zones sont très productives bien qu'elles ne représentent qu'une faible surface (7% de la surface océanique). En effet, elles contribuent entre 14 et 30% de la production primaire des océans (Mantoura et al., 1991). La colonne d'eau s'y caractérise par une faible profondeur de la couche euphotique et la régénération des nutriments à partir du fond. Cependant, la biomasse photosynthétique y est relativement faible comparée à la biomasse terrestre. Cela est dû à la petite taille des organismes autotrophes qui constituent le phytoplancton et représentent une véritable pompe biologique (Longhurst et Harrison, 1989). Les zones côtières sont également soumises à une importante exploitation anthropique. A l'échelle mondiale, les littoraux comptent parmi les milieux où la pression humaine a le plus fortement augmenté depuis trois siècles. Dix des plus grandes villes du monde se trouvent en bord de mer et la moitié de la population des pays industrialisés vit à moins d'un kilomètre des rivages marins (Paskoff, 1998). Il s'avère donc indispensable de surveiller ces milieux pour préserver ces environnements uniques de par leurs richesses et leurs spécificités.

Le compartiment phytoplanctonique joue un rôle important dans les écosystèmes pélagiques côtiers. En effet, de part sa position de principal producteur primaire des océans, il est en général, à la base des réseaux trophiques (**Fig. 1**). Le phytoplancton est constitué de micro-organismes unicellulaires autotrophes, capables de réaliser la photosynthèse et de produire tous les constituants nécessaires à la cellule en utilisant l'énergie lumineuse et des nutriments inorganiques. La matière organique produite est alors rapidement transférée aux échelons supérieurs. Le phytoplancton se décompose en deux fractions de taille : (i) une fraction de grande taille (ex : diatomées) efficacement broutée par le mésozooplancton (ex : copépodes) et (ii) une fraction de petite taille (ex : flagellés autotrophes) consommée par des protistes hétérotrophes et mixotrophes (nanoflagellés de grande taille, dinoflagellés et ciliés) ou par du macrozooplancton microophage (Frontier et al., 1994). Au sein du réseau trophique planctonique, les bactéries hétérotrophes peuvent être consommées à la fois par des protistes bactéritivores (nanoflagellés et petits ciliés) et par du phytoplancton mixotrophe. Ces prédateurs microbiens représentent également les proies principales d'organismes de niveau trophique supérieur tels que le mésozooplancton.

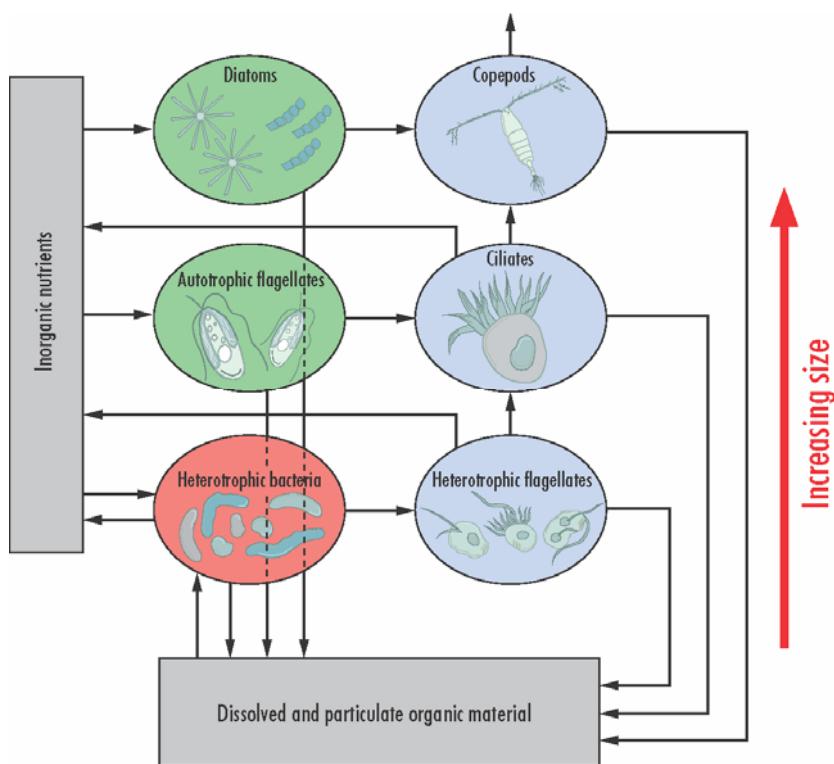
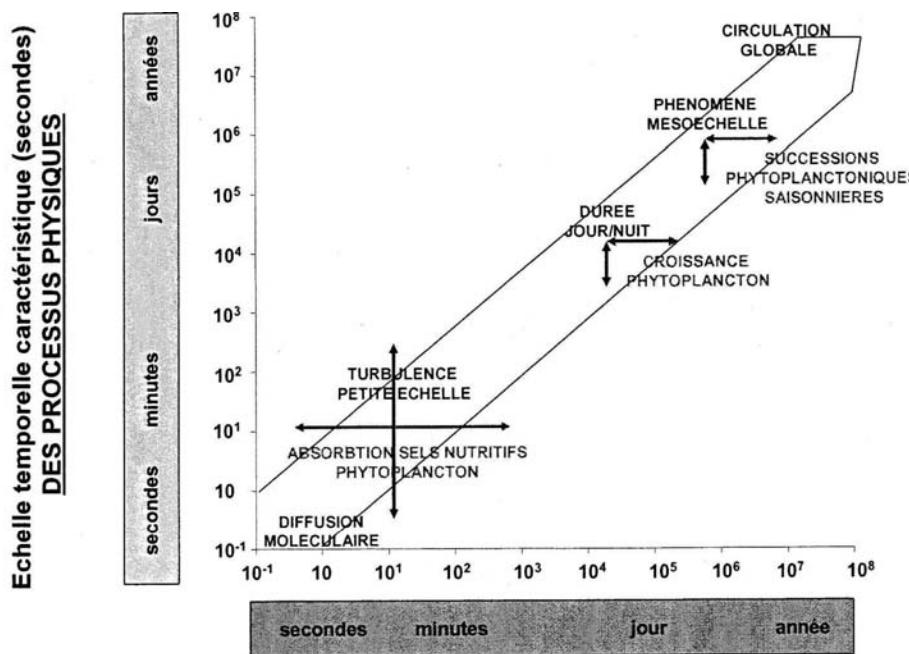


Figure 1: Réseau trophique microbien pélagique d'après Kaiser et al. (2005). Les organismes autotrophes apparaissent en vert, les hétérotrophes en bleu et les bactéries en rouge.

La croissance du phytoplancton peut être limitée par deux types de facteurs : des facteurs physiques tels que la lumière, la température, la turbulence, la turbidité, et des facteurs nutritionnels (sels azotés, phosphates, silicates) d'origine naturelle ou anthropique (Bougis, 1974). Concernant ces facteurs nutritionnels, la zone côtière y est particulièrement sensible en raison des apports significatifs de sels nutritifs via les rivières, les eaux souterraines, l'atmosphère. Il s'agit du phénomène d'eutrophisation qui correspond à un état enrichi du milieu à un point tel qu'il en résulte des nuisances pour l'écosystème (Ménesguen, 2001; Smith et al., 1999).

Variabilité temporelle

Par définition, les organismes planctoniques sont soumis en permanence aux mouvements des masses d'eau, particulièrement au niveau des zones côtières où les courants de marée et les variations bathymétriques génèrent un hydrodynamisme complexe. Ces forçages physiques peuvent s'exprimer à différentes échelles spatiales et temporelles qui se répercutent sur la dynamique phytoplanctonique (**Fig. 2**). Un transfert d'échelle peut se créer entre un phénomène ayant lieu à petite échelle telle que l'absorption des sels nutritifs sur un phénomène à plus grande échelle telle que les successions saisonnières d'espèces.



Echelle temporelle caractéristique (secondes)
DES PROCESSUS PHYSIQUES

Figure 2 : Echelles temporelles des processus physiques et des processus biologiques du phytoplancton associés. D'après Cassayas (2000).

Le compartiment phytoplanctonique se caractérise par une importante diversité, des taux de croissance variables et des réponses rapides aux changements environnementaux (Cloern, 2001). Des observations ponctuelles en un même endroit d'une zone côtière montrent une grande variabilité d'abondance et de composition phytoplanctoniques au cours de l'année, en raison de la grande variabilité d'habitats représentés au sein d'une même masse d'eau (méso- et micro-échelle) (Grossel, 1985 ; Peperzak et al., 1998 ; Reul et al., 2005). Les organismes phytoplanctoniques sont très variables en taille allant du picomètre au micromètre et présentent des statuts trophiques variés tels que l'autotrophie, l'hétérotrophie ou la mixotrophie. La plupart de la production primaire est réalisée par le microplancton constitué essentiellement de diatomées, de dinoflagellés et de Prymnésiophycées (Miller, 2004). Certaines espèces sont capables de se diviser plusieurs fois par jour (Furnas, 1991). En particulier, les efflorescences phytoplanctoniques sont des événements de production rapide et d'accumulation de biomasse qui sont des réponses aux changements provenant de la masse d'eau (e.g. marée), de l'atmosphère (vent) ou de la terre (précipitations et apports fluviaux ; Cloern, 1996). Il en résulte que les efflorescences peuvent être des événements épisodiques de courte durée et d'amplitude variable, des phénomènes saisonniers récurrents ou des événements rares associés à des conditions hydrologiques ou météorologiques ponctuelles récurrentes ou exceptionnelles (**Fig. 3**).

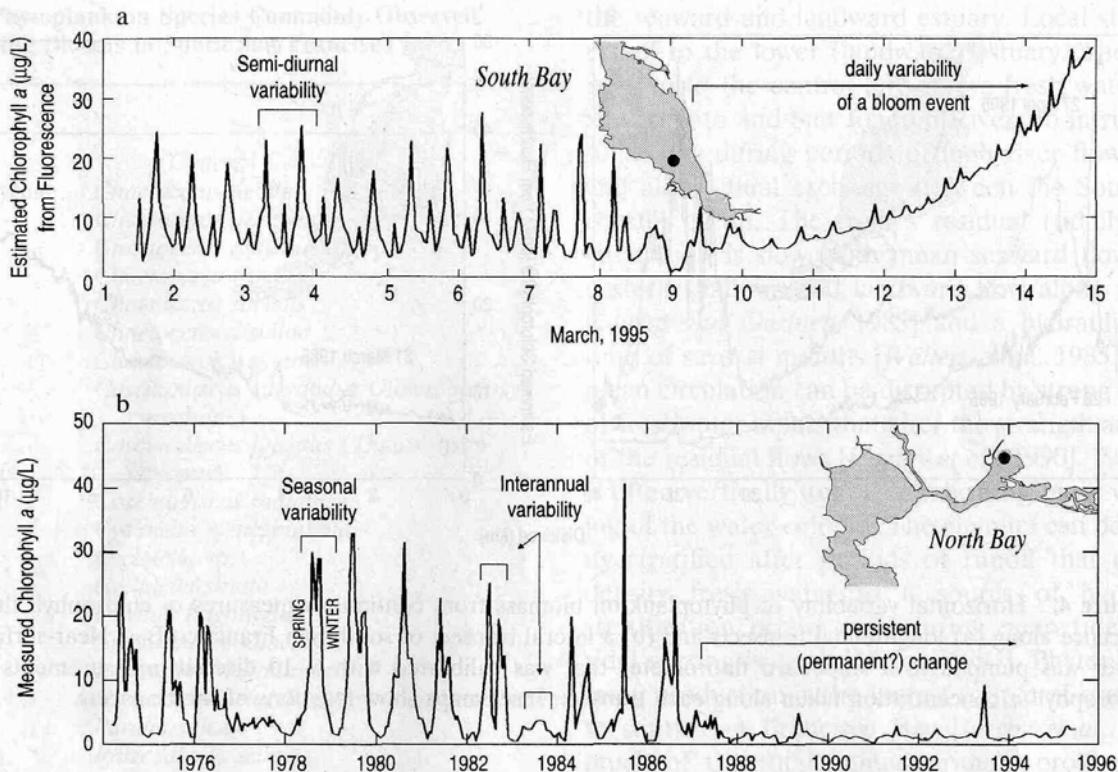


Figure 3 : Exemple illustrant la diversité des échelles de variabilité temporelle de la biomasse phytoplanctonique estimée à partir de concentrations en chlorophylle a ($\mu\text{g.L}^{-1}$), rencontrée dans la Baie de San Francisco, avec en a), les variabilités rencontrées au cours d'un demi-mois et en b), les variabilités rencontrées sur plusieurs années. D'après Cloern (1996).

Comment et pourquoi étudier l'abondance et la biomasse phytoplanctoniques ?

Il est important de qualifier et de quantifier l'abondance et la biomasse du phytoplancton afin de comprendre et de définir au mieux la place de ce compartiment au sein de l'écosystème. La définition des assemblages phytoplanctoniques ne correspond pas nécessairement à une classification taxonomique des organismes, mais il s'agit de regroupements d'espèces en fonction de leur physiologie, morphologie ou autres facteurs qui répondent de la même manière aux variations récurrentes des conditions environnementales (Estrada, 2000). Par ailleurs, le suivi dynamique du phytoplancton et l'apparition des événements nuisibles, voire toxiques, est au cœur même d'importants enjeux sanitaires et environnementaux (Smayda, 1990). Ce suivi est devenu un critère de classement pour la qualité des masses d'eau, d'après la Directive européenne Cadre sur l'Eau (DCE, 2000). Des programmes de surveillance sont mis en place dans différents milieux ou systèmes côtiers pour répondre aux exigences de cette directive. Cependant, la stratégie d'étude dépend de l'objectif posé et il s'agit souvent de trouver un compromis entre une observation pertinente d'un phénomène et une méthodologie

Introduction générale

appropriée. Face au degré de complexité des réponses du compartiment phytoplanctonique, les méthodes d'échantillonnage et d'analyse sont souvent insuffisantes.

La méthode standard la plus utilisée pour déterminer la biomasse phytoplanctonique est le dosage de la chlorophylle *a* par spectrophotométrie ou fluorimétrie (Aminot et Kérouel, 2004). L'analyse des cortèges pigmentaires par chromatographie (HPLC, Mantoura et Llewellyn, 1983) est plus précise, bien que moins répandue que les méthodes déterminant la concentration en chlorophylle *a*, et permet d'obtenir des informations sur les principaux groupes phytoplanctoniques en présence (Jeffrey et al., 1997). Ces méthodes pigmentaires sont certes rapides mais ne permettent pas d'évaluer directement les espèces et leur abondance.

L'analyse taxonomique du phytoplancton est effectuée par microscopie optique. Elle permet une reconnaissance et une quantification en détails (Utermöhl, 1958). Cependant, cette méthode est très coûteuse en temps et demande une qualification de l'opérateur longue à acquérir. De plus, elle ne permet pas d'observer les cellules de petite taille qui peuvent représenter l'essentiel des communautés phytoplanctoniques dans certains milieux. Elle nécessite également d'importantes manipulations avant l'analyse telles que le stockage ou l'utilisation de fixateurs chimiques.

La cytométrie en flux devrait pouvoir offrir à terme un compromis entre la rapidité des méthodes pigmentaires et la précision à l'échelle individuelle des méthodes microscopiques. L'application de la cytométrie en flux dédiée à l'analyse du phytoplancton est relativement récente (Shapiro, 2003). La méthode repose sur les propriétés autofluorescentes des cellules phytoplanctoniques. Elle permet également d'obtenir des informations sur la morphologie des cellules (i.e. taille, forme) et de les quantifier sans manipulation préalable des échantillons. Certains cytomètres en flux ont été développés spécialement pour des applications *in situ* tels que CytoBuoy (Dubelaar et Gerritzen, 2000) ou FlowCytobot (Olson et al, 2003). D'autres sont couplés à un analyseur d'image, permettant une reconnaissance directe des espèces : FlowCam (Sieracki et al., 1998). L'utilisation d'un cytomètre en flux dédié au phytoplancton sera exposée dans ce travail.

L'étude du phytoplancton en Manche orientale

La zone côtière de la Manche orientale a été choisie comme site atelier pour étudier la dynamique phytoplanctonique. Cet écosystème est soumis à un fort régime marégraphique et est un lieu important d'interface avec le continent par le biais d'effluents- Breton (2000)

indique que les assemblages phytoplanctoniques observés dans cette zone sont essentiellement constitués de diatomées de grande taille représentant plus de 85% de la biomasse totale. Par ailleurs, Seuront et Vincent (2008) ont identifié la succession de trois assemblages de diatomées au cours du printemps 2004, correspondant à ceux observés en zone côtière de la Baie Sud de la Mer du Nord. Cependant de fortes concentrations correspondant à l'intense développement d'une Prymnésiophycée, *Phaeocystis globosa*, sont recensées dans ces eaux côtières (Hedin-Bougard, 1980 ; Brunet et al., 1996 ; Breton et al., 2000). Gentilhomme et Lizon (1998) ont souligné le rôle important des sels nutritifs, plus particulièrement azotés, dans la prolifération printanière de cette micro-algue. De plus, les taux d'absorption de ces nutriments seraient influencés par la turbulence (Schapira et al., 2006). Par ailleurs, la variabilité des compartiments biologiques est liée aux successions phytoplanctoniques, à l'évolution des communautés zooplanctoniques (Breton, 2000 ; Cotonnec, 2001 ; Devreker et al., 2005) et à la dynamique bactérienne (Lamy et al., 2006 ; Lamy et al., 2009).

Blooms d'algues nuisibles : cas de *Phaeocystis globosa*

La détermination des assemblages phytoplanctoniques dans des communautés contenant des espèces potentiellement toxiques ou nuisibles (Harmful Algal Blooms - HAB) est d'un intérêt majeur pour comprendre quelles espèces sont favorisées ou entrent en compétition pour de mêmes niches écologiques ou habitats (GEOHAB, 2001).

Les blooms massifs de *Phaeocystis* sont des phénomènes récurrents dans les eaux côtières eutrophisées d'Europe (Lancelot et al., 1998 ; Schoemann et al., 2005). Certaines espèces de ce genre cosmopolite peuvent produire d'importantes quantités de colonies mucilagineuses au cours du printemps. La prolifération massive de ces colonies est reconnue pour avoir des effets négatifs sur les activités aquacoles et de pêche mais elle a également un impact très important sur le fonctionnement de l'écosystème (Weisse et al., 1994 ; Schoemann et al., 2005 ; Nejstgaard et al., 2007). Par conséquent, les blooms de colonies ont été classés parmi les blooms d'algues nuisibles (Anderson et al., 1998 ; Veldhuis et Wassmann, 2005).

La réussite écologique de *Phaeocystis* par rapport aux autres espèces phytoplanctoniques est attribuée à son cycle de vie hétéromorphe, au cours duquel alternent des cellules libres flagellées et des colonies gélatineuses pouvant mesurer jusqu'à plusieurs centimètres (**Fig. 4** ; Rousseau et al., 1994 ; Riegman et van Boekel, 1996 ; Chen et al., 2002). Une théorie considère la formation de colonie comme étant une forme de stratégie en « saut de haie »

(Verity et Medlin, 2003). La formation de colonies crée un décalage de taille pour les brouteurs et conduit à des changements drastiques de composition et de comportement du zooplancton (Wassmann et al., 2005 ; Seuront et Vincent, 2008). Les cellules solitaires sont les plus sujettes à la mortalité causée par le broutage et l'infection virale (Jacobsen et al., 1996 ; Brussaard et al., 1996, 2005). Vivre en colonie constitue alors une voie de succès pour *Phaeocystis* (Veldhuis et al., 2005) mais comment expliquer que cette espèce soit essentiellement le reste de l'année sous forme solitaire (Verity et Medlin, 2003) ? Les cellules en colonie protègeraient contre la prédation et seraient plus productives tandis que les cellules solitaires seraient plus compétitives face aux ressources (Valero et al., 1992 ; Riegman et van Boekel, 1996 ; Verity et Medlin, 2003).

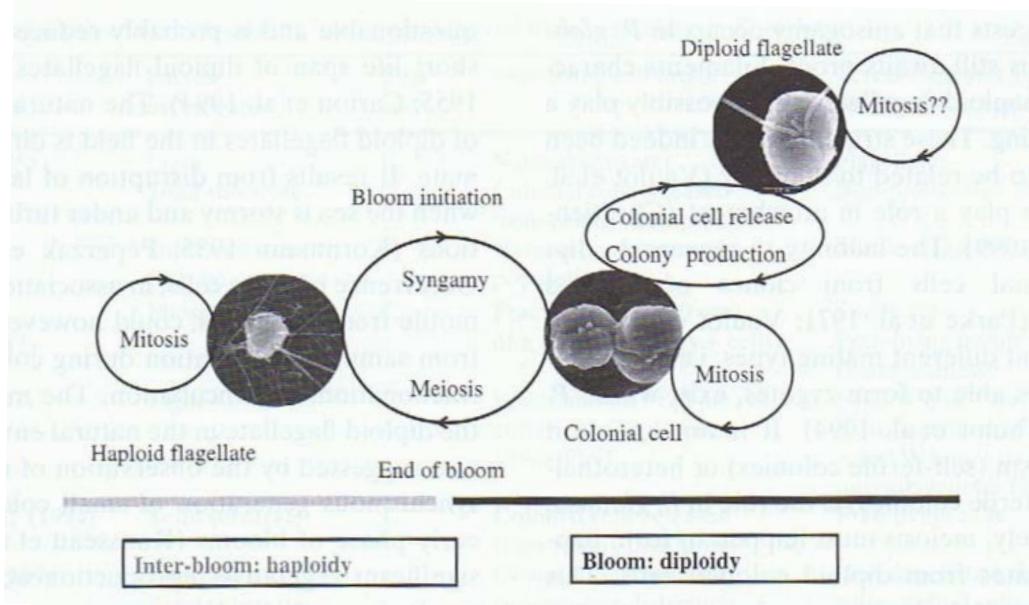


Figure 4 : Cycle de vie haplo-diplobiontique de *Phaeocystis globosa* issu de Rousseau et al. (2007). Trois morphotypes s'alternent : un morphotype haploïde (flagellé haploïde) présent en dehors des blooms et deux morphotypes diploïdes (cellule coloniale et flagellé diploïde) présents pendant les blooms.

A notre connaissance, peu d'études ont été conduites sur la contribution des morphotypes de *Phaeocystis* dans le milieu (Peperzak et al., 1998, 2000 ; Smith et al., 2003 ; Wassmann et al., 2005). Ceci est en partie dû au fait que l'observation des flagellés est particulièrement difficile (Verity et al., 2007a).

D'autres espèces potentiellement toxiques ont été répertoriées dans la zone et forment des blooms récurrents en fin de printemps, ces dernières années. Il s'agit d'espèces de diatomées pennées du genre *Pseudo-nitzschia*. Un lien existerait entre certaines espèces de *Pseudo-nitzschia* et les colonies de *Phaeocystis* (Peperzak et al., 2000 ; Hamm et al., 2000 ; Sazhin et al., 2007). Elles sont régulièrement observées à l'intérieur des colonies et peuvent représenter

jusqu'à 70% de la biomasse de ces amas. Elles sont suspectées d'utiliser les composés organiques (Loureiro et al., 2008), comme ceux générés par la matrice coloniale de *Phaeocystis*. Ces espèces de diatomées sont souvent épiphytes d'autres espèces et leur croissance peut être stimulée par la présence de bactéries (Bates et al., 1998).

Objectifs de l'étude

Comprendre le fonctionnement d'un écosystème passe par l'étude de la variabilité des compartiments qui le composent (Frontier et Pichod-Viale, 1998). En d'autres termes, il s'agit dans cette étude, d'analyser la variabilité du compartiment phytoplanctonique en terme de diversité, d'abondance et de biomasse, aux échelles d'observation les plus pertinentes et en fonction des paramètres biologiques et physico-chimiques forçants. Il s'agit également d'étudier la structure du phytoplancton en termes d'espèces, de populations, d'assemblages et de communautés. Ces termes feront référence dans cette étude aux définitions suivantes : à savoir qu'une population est constituée d'un ensemble d'individus de la même espèce, un assemblage se compose de l'ensemble des espèces en présence, tandis qu'une communauté se définit comme un ensemble plurispécifique déterminé en fonction du problème posé (Barbault, 1992).

D'autre part, les paramètres agissant à petite échelle sur les cellules auront une incidence sur la structure phytoplanctonique (**Fig. 2**). Le concept de transfert d'échelle est défini comme l'action d'un phénomène à petite échelle sur un phénomène à grande échelle et inversement (Frontier et al., 1992). Peu d'études *in situ* ont été menées sur les réactions de ce compartiment biologique à petite échelle temporelle par manque de moyens adaptés à la rapidité et la diversité des réponses (Smayda, 1998 ; Dubelaar et al., 2004 ; Thyssen et al., 2008).

Cette étude a pour objectif principal de caractériser la variabilité temporelle du compartiment phytoplanctonique en Manche orientale, sur différentes échelles d'observation et de définir les variables influençant les successions ainsi que l'occurrence des blooms algaux.

C'est-à-dire de répondre aux questions suivantes:

Quelle est la dynamique du compartiment phytoplanctonique ?

Quelle est la structure phytoplanctonique au sein de l'écosystème Manche orientale?

Quelle méthodologie est la plus appropriée pour suivre au mieux cette variabilité ?

L'étude de la variabilité temporelle des assemblages phytoplanctoniques doit ainsi permettre d'appréhender les modifications apparaissant dans la structure des communautés et de relier ces modifications à la variabilité de paramètres abiotiques (climat, météorologie, hydrologie) et biotiques. La finalité de cette étude est de définir des espèces ou groupes d'espèces indicateurs de changements environnementaux. Afin de répondre à cette problématique, différentes échelles temporelles d'observation¹ ont été choisies visant à caractériser la variabilité des populations phytoplanctoniques (**Fig. 4**).

1. La variabilité des communautés phytoplanctoniques à long terme a été étudiée selon une échelle saisonnière et une échelle interannuelle de 15 ans (Chapitre II).
2. La variabilité des communautés phytoplanctoniques à moyen terme, au cours du bloom printanier a été étudiée à une échelle intra-saisonnier au cours de trois années (Chapitre III).
3. La variabilité des communautés phytoplanctoniques à plus court terme a été étudiée à une échelle hebdomadaire à journalière (Chapitre IV).

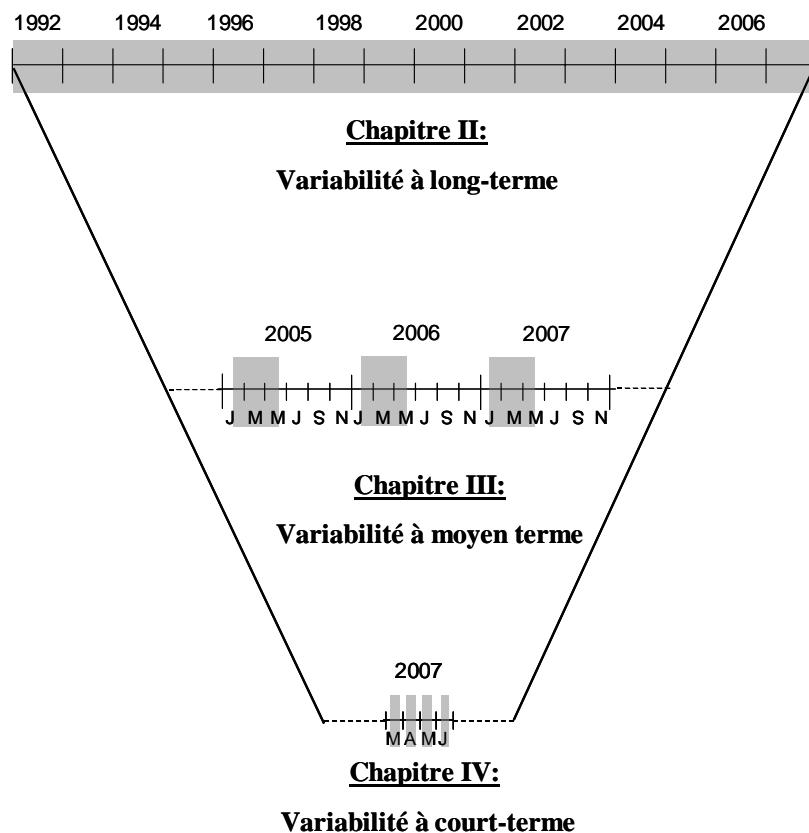


Figure 5 : Présentation des différentes échelles temporelles d'observation associées aux études traitées dans les Chapitres du manuscrit.

¹ La dénomination des échelles d'observation correspond à la durée d'observation et non pas à la fréquence d'échantillonnage.

Le **Chapitre I (Matériel et Méthodes)** concerne la méthodologie et la stratégie d'échantillonnage utilisée au cours des différentes études. Il présente également les résultats de la mise au point du protocole de cytométrie en flux, utilisée pour évaluer les abondances des espèces phytoplanctoniques.

Le **Chapitre II** présente la caractérisation de la variabilité temporelle des communautés phytoplanctoniques lors d'un suivi à long terme. Il s'agit plus particulièrement, (i) d'identifier les principales communautés phytoplanctoniques apparaissant chaque année, (ii) d'étudier leur structure et leur dynamique et (iii) d'appréhender leur relation avec un des facteurs de contrôle principaux (*e.g.* sels nutritifs). Cette étude permettra sinon de définir une année type, au moins d'observer la variabilité interannuelle et des changements des peuplements éventuellement liés aux changements anthropiques et/ou climatiques globaux.

Le **Chapitre III** vise à expliquer la variabilité du développement des populations phytoplanctoniques au printemps, saison la plus productive de l'année. L'étude comparée porte sur trois années consécutives bien différentes, tant d'un point de vue phytoplanctonique qu'environnemental. Ainsi, il s'agira (i) d'étudier les changements d'assemblage au cours du printemps, (ii) de connaître les paramètres susceptibles d'influencer ces changements et (iii) plus particulièrement d'appréhender les mécanismes régissant le développement de *Phaeocystis globosa*. Cette étude permettra de cibler les moments clés du bloom.

Le **Chapitre IV**, sur la base des observations effectuées au Chapitre III, est ciblé sur les variations à plus courte échelle (hebdomadaire à journalière) des communautés phytoplanctoniques. Une nouvelle méthodologie d'observation des espèces phytoplanctoniques (la cytométrie en flux) est proposée. Il s'agit d'une première étude permettant d'appréhender la rapidité de réponse des espèces ou groupes d'espèces définis à partir des caractéristiques optiques, pendant une succession printanière de communautés.

Nous discuterons des résultats de ces différentes approches multi-échelles et à partir de deux outils d'observation et nous effectuerons des recommandations pour un suivi plus fin de la dynamique des communautés phytoplanctoniques en zone côtière, comme préalable à la meilleure définition d'assemblages ou espèces indicatrices de conditions environnementales.

CHAPITRE I

Matériel et méthodes

I. Site d'étude et stratégie d'échantillonnage

I.1. Présentation du site d'étude

La zone côtière de la Manche orientale a constitué le site atelier de nos travaux (**Fig. I.1**). La Manche est une mer épicontinentale du nord-ouest de l'Europe. Sa partie orientale s'étend du Cap Gris-Nez au nord au Cap de la Hague au sud. La profondeur de la Manche orientale n'excède pas 50 m et le fond est essentiellement constitué de substrat sableux et de graviers. Le régime marégraphique est de type mégalidal (Anonyme, 1988), avec un marnage (différence de hauteur entre la pleine mer et la basse mer) supérieur à 5 m. La Manche orientale est par ailleurs soumise à un important hydrodynamisme lié à de forts courants de marée. Sa forme d'entonnoir crée un goulot d'étranglement au niveau du détroit du Pas-de-Calais, qui génère une accélération des masses d'eau provenant de l'Océan Atlantique vers la Mer du Nord. Les courants instantanés peuvent atteindre jusqu'à $1,5 \text{ m.s}^{-1}$ en vives eaux. Le régime tidal en Manche orientale est de type semi-diurne, caractérisé par deux basses mers et deux pleines mers par jour selon une fréquence moyenne de 12h et 24min. Le courant de flot porté vers le nord-est et le courant de jusant porté vers le sud-ouest sont parallèles à la côte (Brylinski, 1993). Il en résulte une dérive résiduelle de vitesse 2,7 milles par jour (Salomon et Breton, 1993).

Ce contexte marégraphique favorise la création d'une masse d'eau côtière individualisée, appelée « le fleuve côtier » (Brylinski et al., 1991). Plusieurs fleuves et cours d'eau du bassin hydrographique allant de la Baie de Seine jusqu'au détroit du Pas-de-Calais alimentent et entretiennent par leurs apports la masse d'eau côtière. Ces apports sont maintenus en zone côtière par un front qui freine leur dispersion vers les eaux du large (Brylinski et al., 1991). La circulation de ce fleuve côtier est régie principalement par la dérive résiduelle vers la Mer du Nord. Cependant, elle est soumise également au forçage du vent préférentiellement de secteur sud-ouest (Salomon et Breton, 1991).

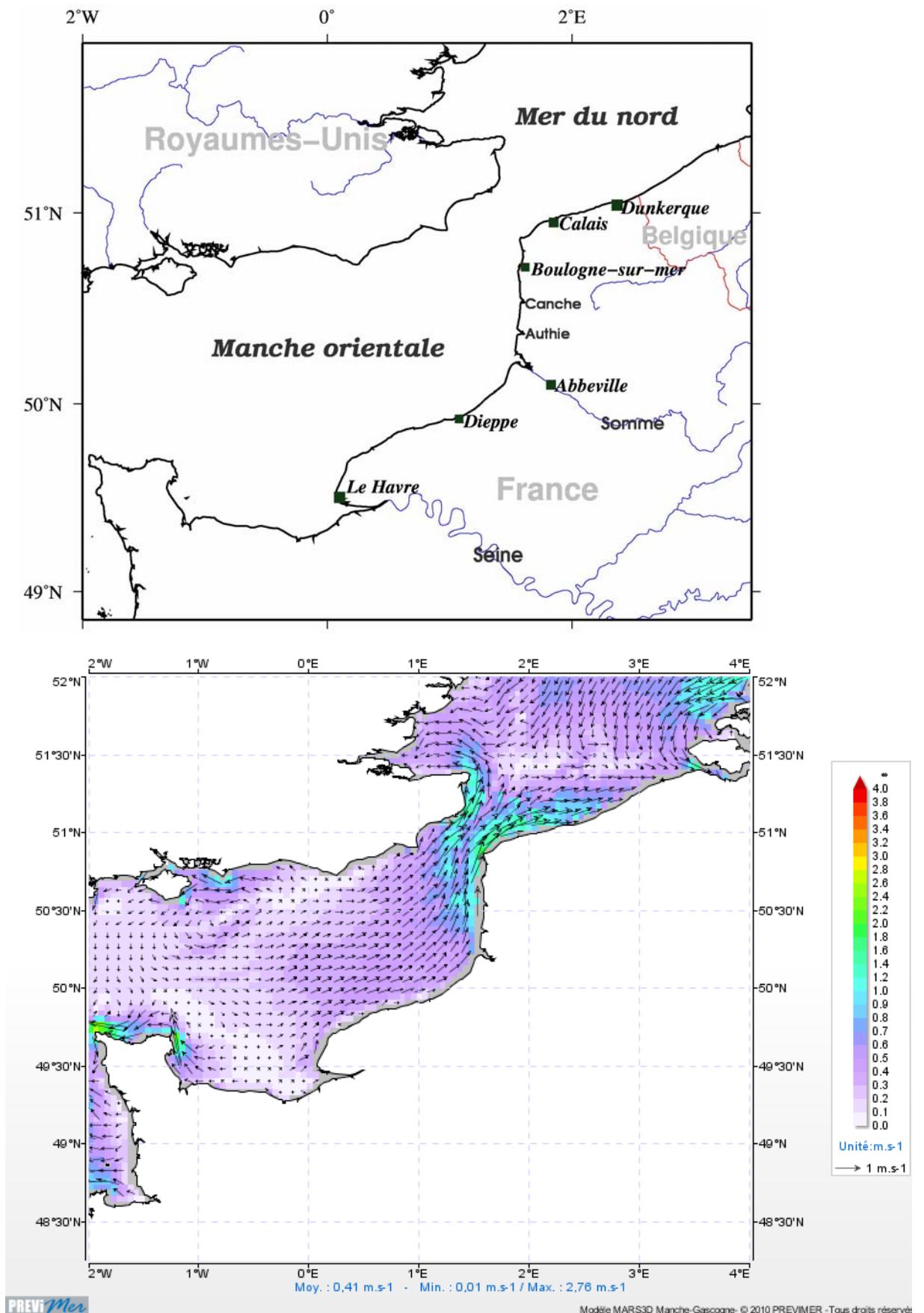


Figure I-1 : Zone d'étude : localisation et courants de surface (à pleine mer ; source : www.previmer.org).

En raison de ses forts débits ($> 400 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$), la Seine constitue la source principale en sels nutritifs (surtout les nitrates et les phosphates) et en Matières en Suspension (MES) du fleuve côtier, contribuant à plus de 90% des apports totaux (Prygiel et al., 2000). La Somme représente la seconde source d'apports continentaux en phosphore (380 t), en silicium (5400 t), en azote (9000 t) et en MES (67800 t ; Loquet et al., 2000). La baie de Somme serait l'initiatrice d'une production phytoplanctonique qui dérive progressivement vers le nord jusqu'au détroit du Pas-de-Calais (Brylinski et al., 1996 ; Hoch et Garreau, 1998 ; Breton et al., 2000 ; Vantrepotte, 2003). La Seine et les autres cours d'eau alimentent significativement en sels nutritifs la masse d'eau de la Baie Sud de la Mer du Nord (Lacroix et al., 2007). La Manche orientale constitue ainsi une zone de transfert d'apports non négligeables vers la Mer du Nord.

I.2. Stratégie d'échantillonnage

Deux sites en zone côtière de la Manche Orientale ont été choisis au cours des différentes études et selon les collaborations. Ces sites ont principalement été choisis de par leur facilité d'accès et leur proximité géographique, de manière à obtenir des résultats comparables tout au long du travail de thèse. Les stations échantillonnées dans la zone côtière des deux sites se caractérisent par une profondeur de $\sim 20 \text{ m}$ et sont distantes de la côte d'environ 3 km.

1. La première **station SRN1** est située dans la zone côtière du site de Boulogne-sur-mer ($50^{\circ}45' \text{N}-1^{\circ}33' \text{E}$; **Fig. I.2**). Cette station fait partie d'un réseau de surveillance mis en place par l'Ifremer²-Boulogne sur Mer depuis 1992 : le Suivi Régional des Nutriments (SRN).
2. La seconde **station R1** est située dans la zone côtière du site d'Ambleteuse ($50^{\circ}47' \text{N}-1^{\circ}34' \text{N}$; **Fig. I.2**). Elle est localisée à 6 km au nord du site de Boulogne-sur-mer. Cette station fait partie d'une radiale d'échantillonnage historiquement échantillonnée par les laboratoires Wimereusiens et récemment constituante un des sites ateliers des programmes de recherche CPER³ « Ecosystèmes perturbés du littoral : bloom de *Phaeocystis* » et PNEC⁴ Chantier « Manche orientale et Baie Sud de la Mer du Nord ».

² Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer.

³ Contrat Plan Etat Région.

⁴ Programme National Environnement Côtier.

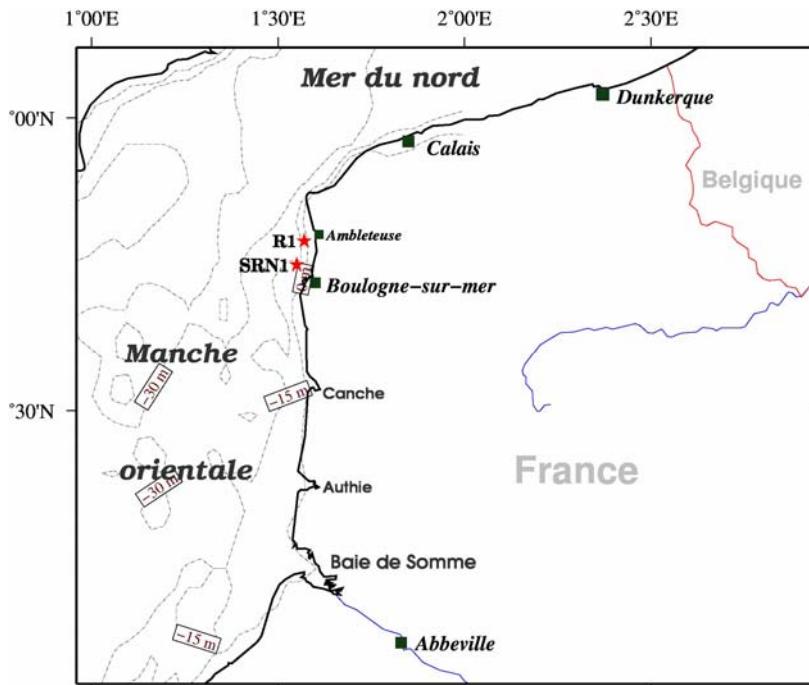


Figure I-2 : Localisation des stations de prélèvement en Manche orientale et bathymétrie.

I.2.1. Etude réalisée à la station SRN1

Une analyse descriptive des communautés phytoplanctoniques (abondance et composition taxonomique) en relation avec les sels nutritifs aux échelles saisonnière et pluriannuelle a été réalisée entre 1992 et 2007. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Alain Lefebvre (Directeur du laboratoire LER⁵ de l’Ifremer-Boulogne-sur-mer) dans le cadre d’une valorisation à long terme des données hydrobiologiques du réseau de surveillance SRN. La fréquence d’échantillonnage pratiquée correspondait à deux prélèvements par mois au printemps (de mars à juin) et à un prélèvement par mois, le reste de l’année. Les comptages ont été réalisés par les techniciens de l’Ifremer LER/BL dont Pascale Hébert et Camille Blondel.

Dans ce contexte, il sera possible de répondre à plusieurs questions : (i) quels sont les principaux groupes et espèces phytoplanctoniques rencontrées dans la zone d’étude, (ii) quelles sont leurs variations à l’échelle saisonnière, pour cibler les périodes caractéristiques de des poussées phytoplanctonique, (iii) quelles sont les tendances observées à l’échelle pluriannuelle pour situer le contexte du travail de thèse et (iv) quel est l’impact des apports en

⁵ Laboratoire Environnement Ressources.

sels nutritifs sur la variabilité phytoplanctonique? Les résultats sont présentés dans le Chapitre II et font en partie, l'objet d'un article (Lefebvre et al., en préparation.).

I.2.2. Etudes réalisées à la station R1

Les campagnes de prélèvements réalisées au cours du travail de thèse ont été effectuées essentiellement en période printanière, à la station côtière R1.

a. Une analyse descriptive des communautés phytoplanctoniques (abondance, biomasse, composition et diversité) a été réalisée entre février et juillet, de 2005 à 2007 (**Tableau I.1**). Les prélèvements ont été effectués à une fréquence hebdomadaire au cours du printemps, période productive du phytoplancton. Les variations interannuelles des communautés phytoplanctoniques ainsi que la structure écologique au cours de la période productive printanière sont présentées en Chapitre II.

b. Des mesures à plus court terme ont été réalisées parallèlement à l'échantillonnage mené en 2007. Une méthodologie plus adaptée à cette fréquence d'observation, la cytométrie en flux, a été testée et appliquée. Des échantillonnages de plusieurs jours consécutifs ont été réalisés suivant les différentes phases clés du développement phytoplanctonique printanier (Tableau I-1). Un suivi lagrangien de plusieurs heures au cours d'une journée a été réalisé, grâce à un système dérivant conçu par Alexeï Sentchev (M.C.F. ULCO), couplé à une bouée de type ARGOS. Le suivi a été effectué entre le 15 et le 16 mai 2007. Les résultats des variations phytoplanctoniques au cours de ces différents suivis à court terme sont rapportés en Chapitre IV.

Tableau I-1 : Calendrier et conditions de marée des campagnes de prélèvements suivies à la station côtière R1 du site d'Ambleteuse entre février 2005 et juillet 2007. (A) Campagnes réalisées en 2005 et 2006 ; (B) Campagnes réalisées en 2007. Les zones en gris indiquent les campagnes à cour terme et l'encadré en trait épais indique le suivi journalier. F : flot ; J : jusant ; MM : marée moyenne ; ME : mortes eaux ; VE : vives eaux (d'après les données du SHOM⁶).

A.

	Dates	F/J	Marée
2005	25/02/05	F	VE
	14/03/05	F	VE
	22/03/05	F	MM
	01/04/05	F	MM
	11/04/05	F	VE
	18/04/05	J	ME
	25/04/05	F	VE
	02/05/05	F	MM
	09/05/05	F	VE
	26/05/05	F	VE
2006	06/06/05	F	MM
	12/07/05	F	MM
	02/03/06	F	VE
	09/03/06	J	ME
	16/03/06	F	VE
	29/03/06	F	VE
	04/04/06	J	MM
	14/04/06	F	VE
	20/04/06	J	ME
	26/04/06	F	VE
2007	03/05/06	J	MM
	15/05/06	F	MM
	29/05/06	F	MM
	13/06/06	F	MM
	26/06/06	F	MM
	12/07/06	F	VE

B.

	Dates	F/J	Marée
Campagne 1	19/02/07	F	VE
	13/03/07	J	ME
	26/03/07	J	ME
	27/03/07	J	ME
	28/03/07	J	ME
	29/03/07	F	ME
	30/03/07	F	MM
	31/03/07	F	MM
	02/04/07	F	VE
	03/04/07	F	VE
Campagne 2	04/04/07	F	VE
	11/04/07	J	VE
	12/04/07	J	ME
	13/04/07	J	MM
	14/04/07	F	MM
	16/04/07	F	VE
	17/04/07	F	VE
	23/04/07	J	MM
	02/05/07	F	MM
Campagne 3	09/05/07	J	ME
	13/05/07	F	MM
	15/05/07	F	VE
	16/05/07	J	VE
	21/05/07	J	MM
	22/05/07	J	MM
	23/05/07	J	ME
	24/05/07	J	ME
	25/05/07	J	ME
	31/05/07	F	MM
Campagne 4	06/06/07	J	MM
	18/06/07	F	MM
	19/06/07	J	MM
	20/06/07	J	MM
	21/06/07	J	MM
	11/07/07	F	MM

⁶ Service Hydrographique et Océanographique de la Marine.

II. Acquisition des données

II.1. Paramètres environnementaux

II.1.1. Paramètres physiques

Des profils verticaux de température (T ; °C), de salinité (S ; p.s.u.), et de luminosité (PAR ; $W.h.m^{-2}.j^{-1}$) ont été réalisés *in situ* à l'aide d'une sonde CTD Seabird 25. Le profil a été réalisé à une vitesse de descente uniformisée à $0,5\text{ m.s}^{-1}$.

Les données correspondant aux prélèvements de surface telles que la température et la salinité ont été moyennées sur le premier mètre de la colonne d'eau.

Le coefficient d'atténuation K a été déterminé à partir de la relation entre la luminosité (E_z), la luminosité de surface (E_0) et la profondeur z (m) en utilisant les données de PAR :

$$E_z = E_0 \times e^{-Kz}$$

K est la pente de régression linéaire entre $\ln E_z$ et la profondeur z .

L'intensité moyenne de la lumière (E_m) dans la colonne d'eau a été calculée selon l'équation :

$$E_m = E_0 (1 - e^{-Kz}) (Kz)^{-1}$$

La densité a été calculée à partir des profils de température et de salinité. Le gradient vertical de densité (cD ; $g.m^{-4}$) correspond à la différence entre la surface et le fond de la densité divisée par la profondeur. Ce gradient a été utilisé comme indice de stabilité de la colonne d'eau.

II.1.2 Paramètres chimiques

II.1.2.1 Sels nutritifs

Les prélèvements d'eau de mer ont été réalisés à l'aide d'une bouteille Niskin (8L) en subsurface (1 m de profondeur). Pour chaque prélèvement, des échantillons d'eau ont été filtrés au préalable sur un tamis de $10\text{ }\mu\text{m}$ pour éliminer un maximum de matière organique particulière susceptible d'être dégradée immédiatement après le prélèvement. Ces échantillons ont été conservés en triplicat :

- dans des flacons en verre brun (125 mL) pour le dosage des ions ammonium (NH_4^+), puis stockés à l'obscurité après ajout de réactifs (Aminot et Kérouel, 2004).

- dans des flacons en polyéthylène (PE, Nalgène ; 100 mL), stockés à -20°C dans l'attente de l'analyse des ions nitrites (NO_2^-), nitrates (NO_3^-) et phosphates (PO_4^{3-}) et à 4°C pour les ions silicates $[\text{Si}(\text{OH})_4]^{7-8}$ (Aminot et Chaussepied, 1983).

Azote ammoniacal (NH_4^+)

La méthode utilisée est celle de Koroleff (1979). Les protocoles de prélèvement, de mesure et d'étalonnage de référence sont ceux exposés en détail dans Aminot et Kérouel (2004). Le dosage a été réalisé manuellement en raison de la grande instabilité de cet ion en solution et consiste en une réaction colorimétrique au bleu d'indophénol. Immédiatement après le prélèvement, deux réactifs ont été ajoutés à l'échantillon et les flacons ont été placés à l'obscurité pendant 24 h pour que la réaction colorimétrique se produise. Le principe de la méthode réside dans la formation, en milieu alcalin, d'un composé de type indophénol par réaction des ions ammonium avec du phénol et de l'hypochlorite de sodium, en présence d'un catalyseur, le nitroprussiate (Bertho, 1998). Les lectures optiques ont été réalisées après 24 h, à 630 nm à l'aide d'un spectrophomètre visible (Unicam helios). Les cellules de mesure utilisées sont des cuves en quartz de 5 cm de trajet optique ($\pm 0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Nitrites, nitrates, silicates et phosphates⁹

Le dosage des autres sels nutritifs a été réalisé à l'aide d'une chaîne de dosage semi-automatique Alliance® Integral Futura, selon les protocoles de Tréguer et Le Corre (1975). Les fluides circulent en continu à travers le système analytique par pompage. Le principe du dosage repose également sur des réactions colorimétriques avec lecture par spectrophotométrie d'absorption (Aminot et Chaussepied, 1983).

Les méthodes analytiques de référence sont respectivement :

- Pour les ions nitrites (NO_2^-), la méthode de Bendshneider et Robinson (1962) fondée sur la réaction de Griess. Les ions nitrites forment un précipité avec la sulfanilamide en milieu acide et puis un colorant rose est formé avec le N-naphtyl-éthylènediamine. La mesure s'effectue à 543 nm à l'aide d'un spectrophotomètre intégré à l'appareil Alliance.

⁷ Le terme « silicate » est employé ici pour désigner les formes dissoutes, majoritairement (95%) sous forme d'acide orthosilicique $[\text{Si}(\text{OH})_4]$, de l'ion orthosilicate SiO_4^{4-} .

⁸ Lors de la congélation, les ions silicates se complexent en polymères diminuant les concentrations de silicium réactif.

⁹ Le dosage des sels nutritifs par chaîne semi-automatique a été réalisé par N. Degros (AI-CNRS) de l'équipe « Ecologie planctonique » du LOG-UMR 8187 à la station marine de Wimereux.

- Pour les ions nitrates (NO_3^-), la méthode de Woods et al. (1967). La mesure de concentration s'effectue par réduction quantitative des nitrates en nitrites sur une colonne de cadmium traité au cuivre et par soustraction de la concentration propre en nitrites.
- Pour les ions silicates $[\text{Si}(\text{OH})_4]$, la méthode de Mullin et Riley (1955). Les silicates sont complexés en acide silicomolybdique puis réduits pour former une coloration bleue. Le précipité bleu ainsi obtenu est mesuré à 810 nm.
- Pour les ions phosphates (PO_4^{3-}), la méthode de Murphy et Riley (1962). Les ions phosphates sont complexés puis réduits à l'aide d'acide ascorbique, le précipité bleu ainsi obtenu est mesuré à 885 nm.

II.1.2.2 Carbone organique dissous (COD)¹⁰

Des échantillons de 300 mL d'eau de mer ont été prélevés à l'aide de matériel en verre préalablement décontaminé par des lavages successifs à l'acide chlorhydrique (HCl, 10%) et à l'eau ultrapure. Ces échantillons ont ensuite été filtrés sur des membranes en fibre de verre (GF/F Whatman) précalcinées (4-5h à 450°C). Les premiers 100 mL du filtrat sont éliminés et le reste (soit 3 X 50 mL) est récupéré et congelé pour empêcher toute dégradation de la MOD par les bactéries.

Avant analyse du carbone organique dissout (COD), le carbone inorganique dissout (CID) est éliminé de chaque échantillon par acidification (HCl 6N) et décarbonatation par bullage sous flux d'oxygène. Le COD de l'échantillon traité (100 µL) est ensuite mesuré à l'aide d'un analyseur de carbone organique total (TOC 5000 A, Shimadzu), fonctionnant selon le principe de l'oxydation catalytique à haute température (HTCO, Sugimura et Suzuki, 1988 ; revu par Cauwet, 1994). Le principe de l'analyse repose sur la combustion de l'échantillon, catalysée par de l'alumine (Al_2O_3).

¹⁰ Les mesures du COD ont été réalisées par différents stagiaires de Master 2 (V. Kowalski, S. Kathrepti, A-C. Marc) sous la coordination de Luis Felipe Artigas, au NOC de Southampton et au LOG-UMR 8187 à la MREN ULCO de Wimereux.

II.2. Abondance et biomasse phytoplanctonique

II.2.1. Chlorophylle a

Deux méthodes de dosage en chlorophylle *a* ont été utilisées, selon la station et le type de suivi considéré.

Dans le cadre du Chapitre II, les données de concentrations en chlorophylle *a* (Chl *a*, $\mu\text{g.L}^{-1}$) utilisées dans cette étude sont celles issues du réseau de surveillance SRN de l’Ifremer. Les concentrations sont estimées par spectrophotométrie, selon la méthode trichromatique, après filtration au travers de filtres en fibre de verre et extraction dans l’acétone à 90% (Scor-Unesco, 1966 ; Strickland et Parsons, 1972 *in* Aminot et Kérouel, 2004).

Dans les Chapitres III et IV, la méthode employée est celle de l'estimation fluorimétrique par acidification (Yentsch et Menzel, 1973). Les concentrations en Chl *a*¹¹ ($\mu\text{g.L}^{-1}$) sont déterminées d'après les équations de Lorenzen (1966). Des échantillons de 0,5 à 1 L d'eau de mer sont filtrés sur des filtres en fibre de verre (0,7 μm ; Whatman GF/F). En attendant l'analyse, les filtres sont placés à l'obscurité, au congélateur à -20°C. L'extraction des pigments photosynthétiques a lieu dans l’acétone à 90% (8 mL, 4°C pendant 12h) après lacération des filtres. Les broyats de filtre sont ensuite centrifugés (3000 tours/min, à 4°C pendant 15 min) et le surnageant est récupéré pour lecture de la fluorescence au fluorimètre (Turner Designs model 10-AU). La lecture des extraits chlorophylliens s'effectue avant et après acidification à l'acide chlorhydrique (1%) pour évaluer la fraction des phéopigments.

II.2.2. Analyses microscopiques

Des échantillons de 250 mL ont été fixés sur le terrain avec une solution comprenant 50 : 50 d'une solution de Lugol acide (Throndsen, 1978) et de glutaraldéhyde (Baker, 37%) à une concentration finale de 2% (v/v ; Chrétiennot-Dinet comm. pers.). Ces échantillons ont été préservés à l'obscurité et au froid (4°C) dans l'attente de leur comptage. Un délai maximal d'un mois, entre le moment du prélèvement et l'analyse, a été respecté.

¹¹ La mesure des concentrations de Chl *a* a été réalisée par Vincent Cornille (AT-ULCO) et par des stagiaires d'IUT génie de l'Environnement, et sous la coordination de Luis Felipe Artigas au sein du LOG-UMR 8187 à la MREN ULCO de Wimereux.

II.2.2.1 Identification et analyses au Microscope Electronique à Balayage (MEB)

Pour optimiser et confirmer les observations réalisées au cours des comptages microscopiques, des expertises d'échantillon de phytoplancton (5 à 50 mL) ont été réalisées au Microscope Electronique à Balayage (MEB).

Dans le cas particulier de *Phaeocystis globosa* qui se caractérise par un cycle de vie polymorphique, les différents stades de vie observables chez cette Prymnesiophycée ont été distingués dans les comptages depuis 2006. L'identification précise du nombre de morphotypes et la description des caractéristiques morphologiques des cellules au MEB ont fait l'objet d'une étude préliminaire en collaboration avec Lucie Courcot (I.E. ULCO). Le protocole de préparation au MEB et les caractéristiques des morphotypes font partie d'un article (Guiselin et al., 2009) présenté en **Annexe 1**.

Par ailleurs lors du comptage au microscope inversé, le nombre de cellules des colonies a été évalué à partir de la taille de chaque colonie (longueur et largeur ; μm). La taille permet de calculer le volume de la colonie (V ; mm^3) et le nombre de cellules par colonie (N) est déduit à partir de l'équation suivante (**Fig. I-3**):

$$\text{Log } N = 0,51 (\text{Log } V) + 2,95$$

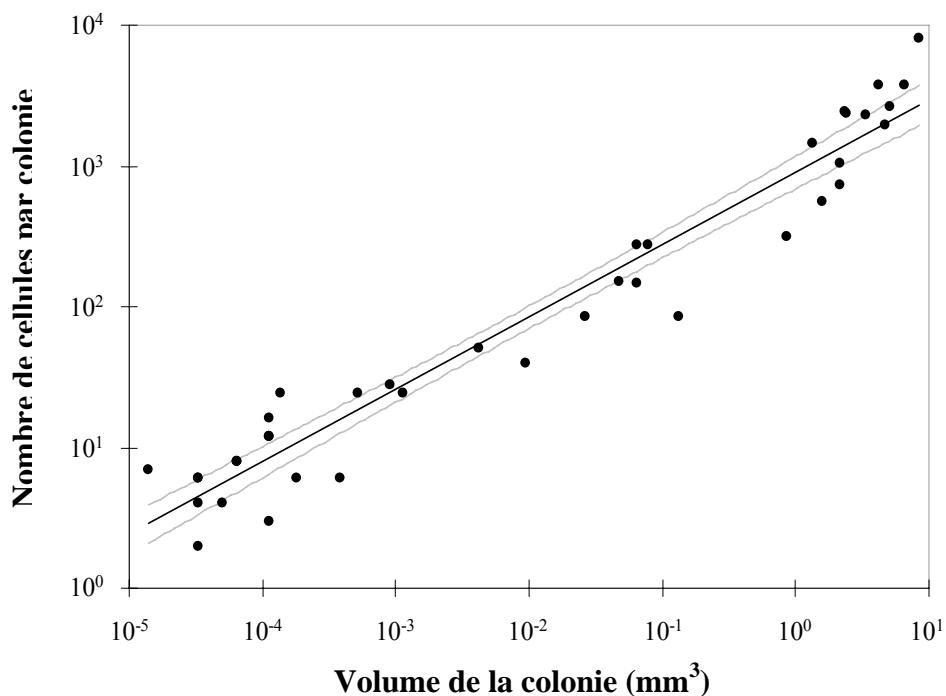


Figure I-3: Relation entre le nombre de cellules dans les colonies et le volume de la colonie (mm^3). La droite de régression est figurée en trait épais et correspond à l'équation : Log nombre de cellules par

colonie = 0,51 (Log volume colonie (mm³) + 2,95, $r^2 = 0,95$, $P < 0,0001$, $n = 41$). Les lignes en trait fin représentent l'intervalle de confiance à 95% de la régression linéaire.

Ce modèle de régression a été établi au préalable par comptage direct du nombre de cellules par colonie sur des micrographies MEB (de grossissement x80 à x500) à partir de colonies collectées dans le milieu. L'évaluation du nombre de cellules des grandes colonies (> 250µm) est fastidieuse et problématique (Verity et al., 2007a). La préparation au MEB permet un aplatissement sur un plan à deux dimensions des colonies de *P. globosa* à l'origine de forme sphérique, facilitant l'énumération des cellules. La surface des colonies a été estimée à l'aide d'un planimètre (Gebruder HAFF GMBH, Allemagne). Le biovolume des colonies (mm³) a été calculé à partir du diamètre équivalent sphérique extrait de la surface, supposant une forme sphérique des colonies.

D'autres espèces ont nécessité des expertises au MEB. En particulier, certaines espèces de diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* sont connues pour leur caractère potentiellement toxique (Bates et al., 1998) et leur identification précise est par conséquent indispensable dans le cadre d'études écologiques (**Fig. I-4**). A l'issue de ces observations, trois espèces de *Pseudo-nitzschia* ont été identifiées dont *Pseudo-nitzschia seriata* considérée comme potentiellement toxique (Fehling et al., 2004).

Pour leur observation au MEB¹², les frustules des cellules de diatomées ont été préalablement nettoyés dans une solution d'acide chlorhydrique (36% v/v ; Baker PA) à chaud (100°C) pendant une heure, et filtrés sur une membrane de polycarbonate (2 µm ; Millipore).

Avant les observations au MEB, les spécimens déposés sur des filtres sont préalablement séchés et métallisés avec de l'or-palladium (Polaron SC7620). Toutes les micrographies¹³ ont été prises à l'aide d'un microscope électronique à balayage LEO 438VP (filament de tungsten). Le microscope est équipé d'un détecteur secondaire d'électrons (Everhart-Thornley type). Les images sont acquises en accélérant le voltage de 30 keV avec un faisceau de courant 10 pA.

¹² L'élaboration de ce protocole a fait partie d'un travail d'Ingénieur de 2^e année de Aude Le Jéloux, étudiante en deuxième année de l'Ecole des Métiers de L'Environnement, Rennes.

¹³ Les micrographies MEB ont été réalisées par Lucie Courcot (IE-ULCO) de l'équipe « Ecologie planctonique » du LOG-UMR 8187 à la MREN de Wimereux.

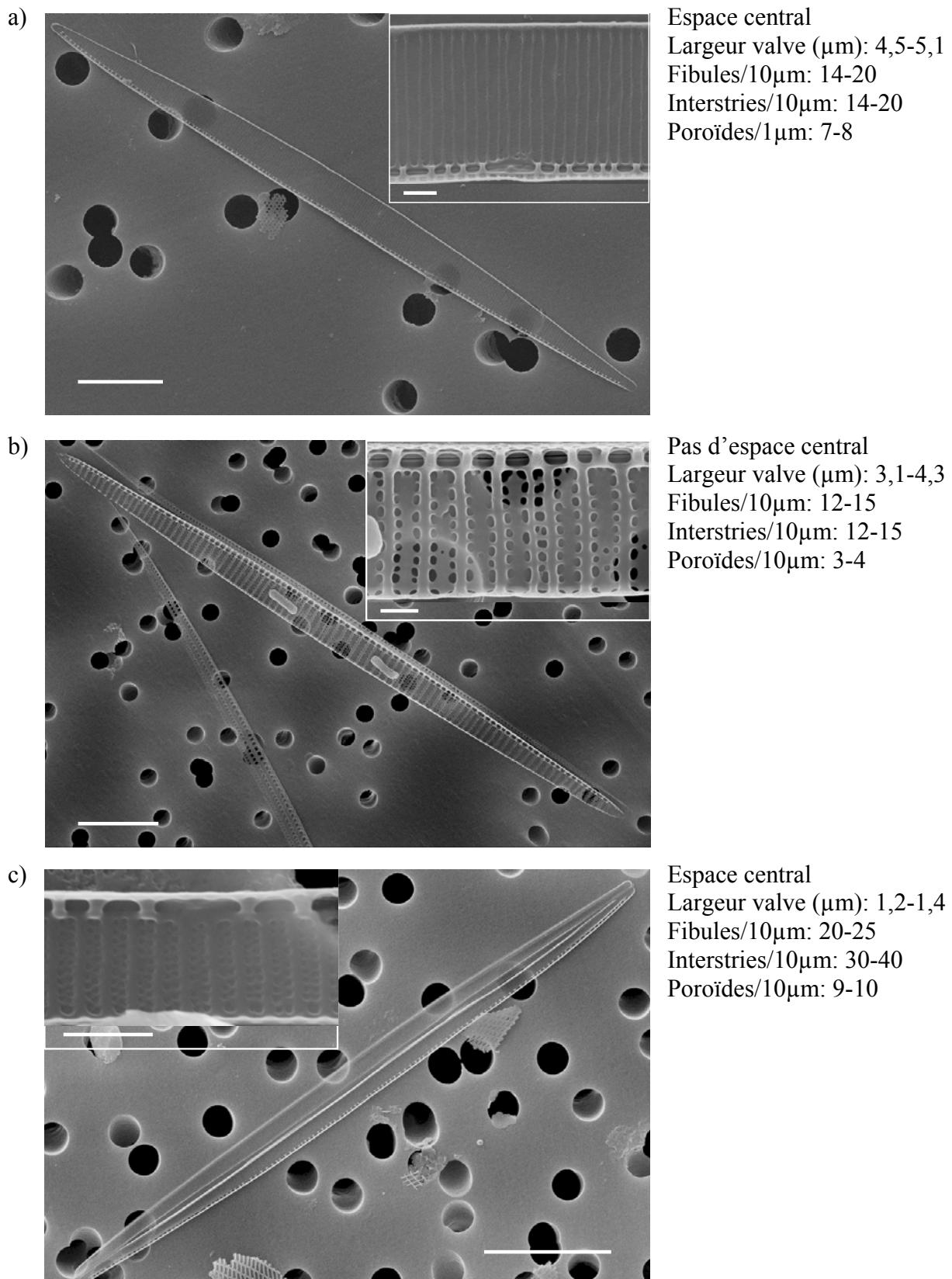


Figure I-4: Microographies MEB des espèces de *Pseudo-nitzschia* rencontrées au cours des campagnes à la station R1: a) *Pseudo-nitzschia seriata*, b) *Pseudo-nitzschia pungens* et c) *Pseudo-nitzschia delicatissima* (échelle = 10 μm). L'encadré montre un agrandissement de la partie médiane de l'intérieur d'une valve (échelle = 1 μm).

1.2.2.2. Comptages par microscopie à inversion

La détermination de l'abondance phytoplanctonique a été réalisée par microscopie inversée selon la méthode Utermöhl (1958). Pour cela, un aliquote de l'échantillon (10 à 25 mL) est mis à sédimenter (12-24h) dans une chambre de sédimentation puis analysé au microscope inversé (Nikon TE-2000 ; grossissements X100, X200, X400 et X600). Chaque comptage consiste en la détermination (i) de la population phytoplanctonique totale et (ii) des assemblages spécifiques selon Hasle et al. (1997) et Paulmier et al. (1997). Plus de 400 cellules par échantillon ont été comptées, résultant en une erreur de comptage d'environ 10% (Lund et al., 1958).

La taille de chaque cellule a été mesurée à l'aide d'un micromètre oculaire gradué et d'un système d'analyse d'image (caméra Nikon DS5M et logiciel d'analyse d'image Nikon NIS Element). La forme de chaque cellule a été assimilée à des formes géométriques de volume connu (Sun et al., 2003). Les biovolumes ainsi calculés (V en $\mu\text{m}^3 \cdot \text{cell}^{-1}$) sont convertis en biomasses carbonées selon les équations définies ci-après par Menden-Deuer et Lessard (2000) :

Groupes phytoplanctoniques	Log 10 (pgC.cell ⁻¹)
Dinoflagellés	-0,353 + 0,864 Log 10 (V)
Diatomées < 3000 μm^3	-0,541 + 0,811 Log 10 (V)
Diatomées > 3000 μm^3	-0,933 + 0,881 Log 10 (V)
Chlorophycées	-1,026 + 1,088 Log 10 (V)
Chrysophycées	-1,694 + 1,218 Log 10 (V)
Prasinophycées	-0,545 + 0,886 Log 10 (V)
Prymnésiophycées	-0,642 + 0,899 Log 10 (V)

Trois morphotypes majeurs de cellules de *P. globosa* ont été distingués lors des comptages microscopiques au grossissement X600 et sur la base des observations au MEB (**Tableau I-2**) : (i) des cellules coloniales (4-7 μm) présentes soit sous forme libre, soit en colonie mucilagineuse (ii) des flagellés haploïdes (2-4 μm) et (ii) des flagellés diploïdes (4-7 μm).

Pour l'estimation des biomasses des cellules de *P. globosa*, les facteurs de conversion carbonés établis par Rousseau *et al.* (1990) ont été utilisés pour les cellules flagellées et coloniales libres (10,8 et 14,15 pgC.cell⁻¹ respectivement). La biomasse des colonies a été calculée à partir du nombre de cellules et du facteur de conversion de 89,5 pgC.cell⁻¹. Il correspond à la moyenne de deux facteurs établis par Van Rijssel *et al.* (1997). Les auteurs estiment la biomasse carbonée des colonies par la somme des cellules coloniales et d'un taux constant de mucus entourant les cellules.

Tableau I-2 : Caractéristiques des différents stades de vie de *Phaeocystis globosa* identifiables par microscopie optique (échelle sur les photos = 5µm)

Type cellulaire	Taille	Facteur de conversion carboné (pgC.cell^{-1})
Cellule coloniale libre	4-7 µm	$14,15 \pm 5,34$ (Rousseau <i>et al.</i> , 1990)
Cellules coloniales	25-2000 µm (taille des colonies)	89,5 (moyenne de 15-122 ; Van Rijssel <i>et al.</i> , 1997)
Flagellé haploïde	2-4 µm	$10,8 \pm 3,47$ (Rousseau <i>et al.</i> , 1990)
Cellules flagellées	4-7 µm	$10,8 \pm 3,47$ (Rousseau <i>et al.</i> , 1990)

III. Mise au point et application du cytomètre en flux, CytoSense

III.1. Principe des mesures avec le cytomètre en flux CytoSense

La cytométrie en flux est une technique développée pour l'analyse individuelle des particules (cellules) en suspension dans un milieu liquide. Les particules en suspension doivent être séparées les unes des autres pour être analysées individuellement. Pour cela, un flux laminaire est créé au moyen de l'accélération d'un liquide porteur ou « gaine » autour de l'échantillon, sans qu'il n'y ait d'échange entre les deux. Chaque particule ainsi individualisée, passe devant un faisceau laser. Il en résulte une diffusion de lumière accompagnée éventuellement d'une émission de fluorescence suite à l'excitation d'un pigment photosynthétique ou d'un marqueur fluorescent. L'instrument utilisé au cours de cette thèse est un cytomètre en flux dédié à l'analyse des cellules phytoplanctoniques (Dubelaar et al., 1999; Dubelaar et Gerritzen, 2000). L'instrument effectue des analyses automatisées et est facilement transportable par rapport aux instruments traditionnels. L'échantillon est alors prélevé en milieu naturel sans subir les procédés de conservation et l'automatisation permet de réaliser des analyses à haute fréquence.

III.2. Caractéristiques techniques du CytoSense

L'instrument CytoSense Benchtop (CytoBuoy BV, Pays-Bas) se décompose en trois compartiments : une composante fluidique, une composante optique et une composante électronique (**Fig. I-5**).

III.2.1. Le système fluidique

L'une des principales particularités du CytoSense par rapport aux cytomètres en flux classiques, réside dans la taille des particules qui peuvent être prélevées. Un tube de diamètre intérieur 800 μm est relié à une pompe péristaltique qui amène l'échantillon dans une chambre appelée « injecteur » (**Fig. I-6**). La vitesse de prélèvement est contrôlable et varie entre 0,49 et 9,7 $\mu\text{L.s}^{-1}$. Cette vitesse doit être préalablement calibrée selon le type de particules à analyser pour obtenir un comptage le plus précis possible (cf ci-après ; Dubelaar et al., 1999). Dans l'injecteur, un liquide gaine est injecté à une vitesse supérieure à celle de l'échantillon (2 m.s^{-1}), garantissant la création d'un flux laminaire et une séparation des deux types de fluides.

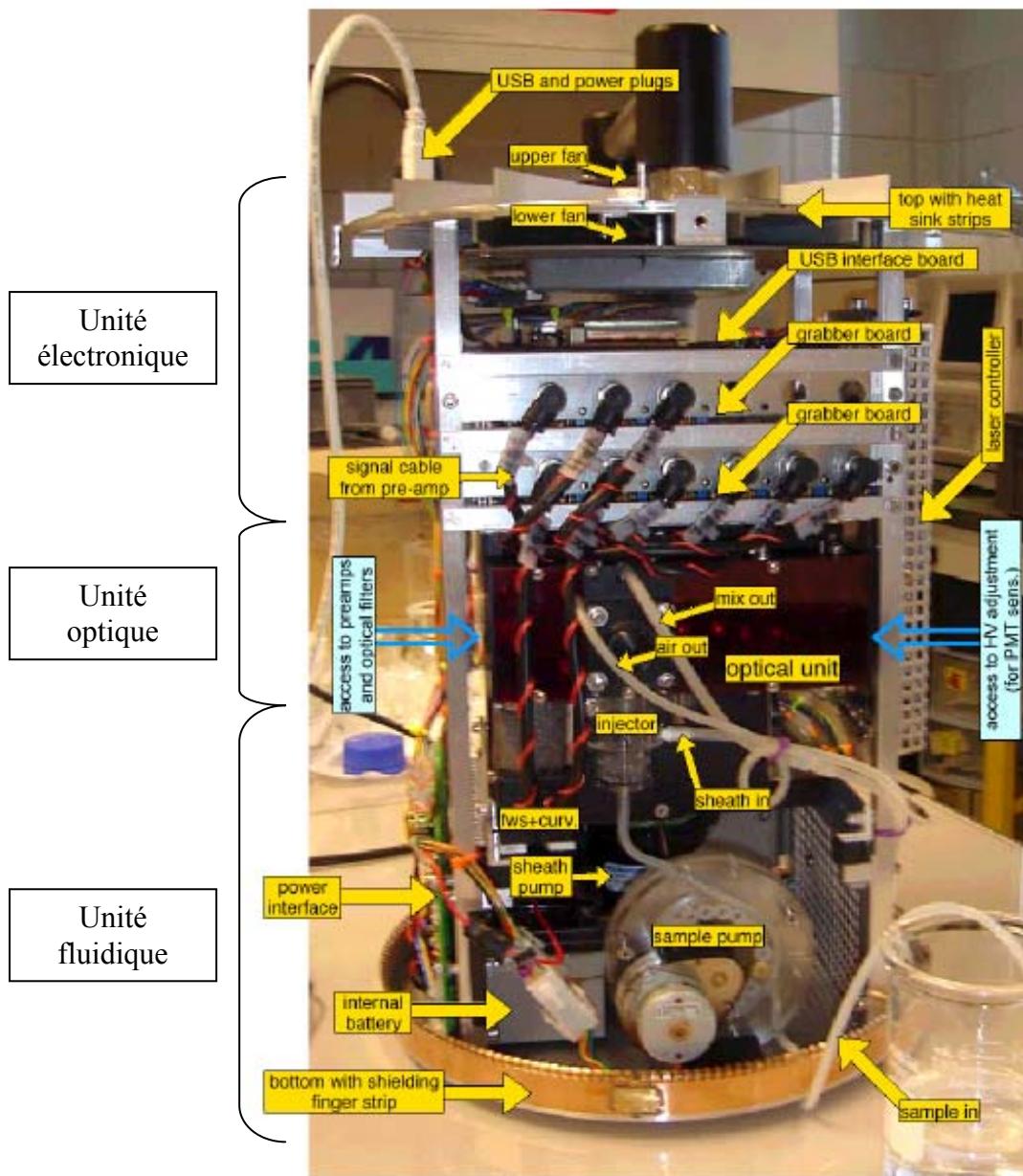


Figure I-5 : Intérieur du CytoSense (vue de face, sans sa coque de protection). Une connection informatique à l'instrument se fait par port USB (en haut) pour le pilotage et le stockage des données.

L'étirement de l'échantillon induit une séparation des particules qui circulent en file indienne au travers d'une cuve en quartz d'1 mm de diamètre où a lieu l'analyse optique. Ainsi toute particule pouvant entrer dans le tube de 800 μm peut passer à travers le système.

La nature du liquide gaine dépend de celle de l'échantillon à analyser pour ne pas modifier l'indice de réfraction. Dans le cadre de cette étude, il s'agit d'un mélange d'eau salée filtrée et d'un décontaminant (Operion CB-10 ; 1%v/v). L'autre particularité de l'instrument est le recyclage du liquide gaine (**Fig. I-6**). A la sortie de la cuve de quartz, le liquide gaine et l'échantillon se mélangent et passent à travers deux cartouches successives de filtres (Polycap AS Nucleopore ; 0,45 μm et 0,1 μm), au travers desquels les particules de l'échantillon sont piégées. Une partie du filtrat est récupérée et réinjectée dans le circuit fluidique étant que nouveau liquide gaine.

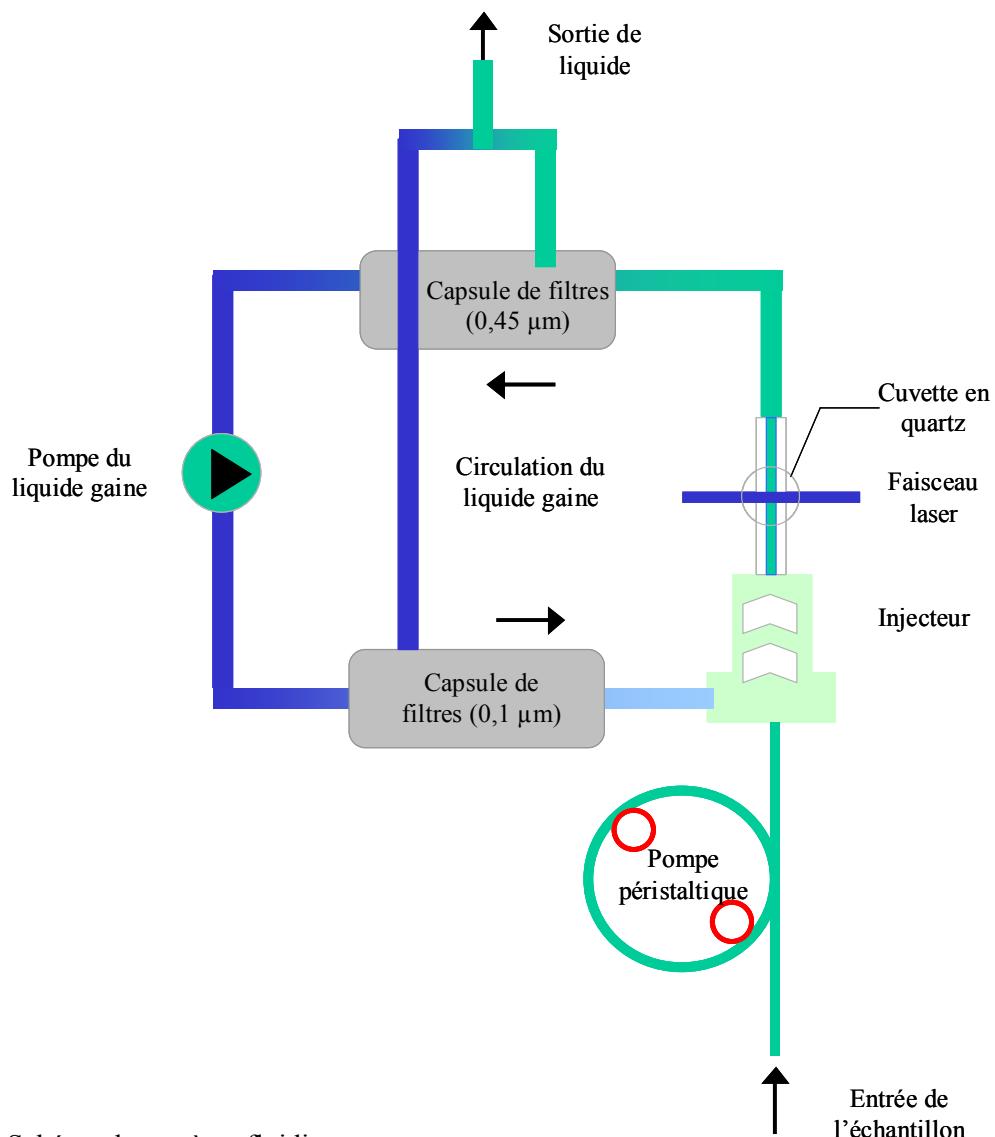


Figure I-6 : Schéma du système fluidique.

III.2.2. Le système optique

Avant d'atteindre la chambre d'analyse en quartz, un faisceau laser de couleur bleue (Coherent solid-state sapphire, 488 nm, 20mW) prend une forme aplatie, de longueur 300 µm et de largeur 5 µm. Les particules pénétrant dans le faisceau laser, diffusent la lumière et dans le cas de phytoplancton, émettent de la fluorescence dont l'intensité et la longueur d'onde d'émission dépendront du type de pigments photosynthétiques. Tout d'abord, dans la même direction que celle du faisceau laser, la diffusion vers l'avant (Forward Scatter ; FWS) est détectée par une photodiode (positive intrinsic negative diode ; PIN). La diffusion à 90° (Sideward Scatter ; SWS) et la fluorescence sont collectées orthogonalement à l'aide de photomultiplicateurs (PMT).

La photodiode est un composant semi-conducteur qui permet de transformer le signal lumineux en courant électrique, elle est beaucoup moins sensible que le photomultiplicateur (**Fig. I-7**). Une autre partie de la lumière diffusée est collectée par un miroir placé de l'autre côté de la cuvette, permettant son amplification. Un réseau holographique concave permet de séparer les différentes longueurs d'onde (avec un pas de 33 nm) et le reste de la lumière est collecté par une fibre optique représentant le SWS. Les différents secteurs de lumière sont amplifiés dans un photomultiplicateur.

5 propriétés optiques sont alors détectées pour chaque particule :

- La **diffusion vers l'avant** ou aux petits angles (0-15°; FWS) permet de détecter la taille de la particule.
- La **diffusion à 90°** ou aux grands angles (45-135°; SWS) révèle la structure interne et externe des particules (forme et constituants cellulaires).
- La **fluorescence rouge** (668-734 nm ; FLR) est la principale bande d'émission de la chlorophylle *a*.
- La **fluorescence orange** (601-668 nm ; FLO) permet de distinguer les particules contenant des pigments accessoires tels que les phycobilines (phycocyanines) contenus dans les cyanobactéries et les cryptophytes.
- La **fluorescence jaune/verte** (536-601 nm ; FLY) permet de distinguer les particules contenant des phycoérythrines également contenues dans les cyanobactéries et les cryptophytes. La fluorescence jaune est également typique de certains ciliés, de cystes et parfois de cellules lysées (après ingestion par le zooplancton). Ce type de fluorescence est utile pour le marquage artificiel des composants cellulaires (ADN).

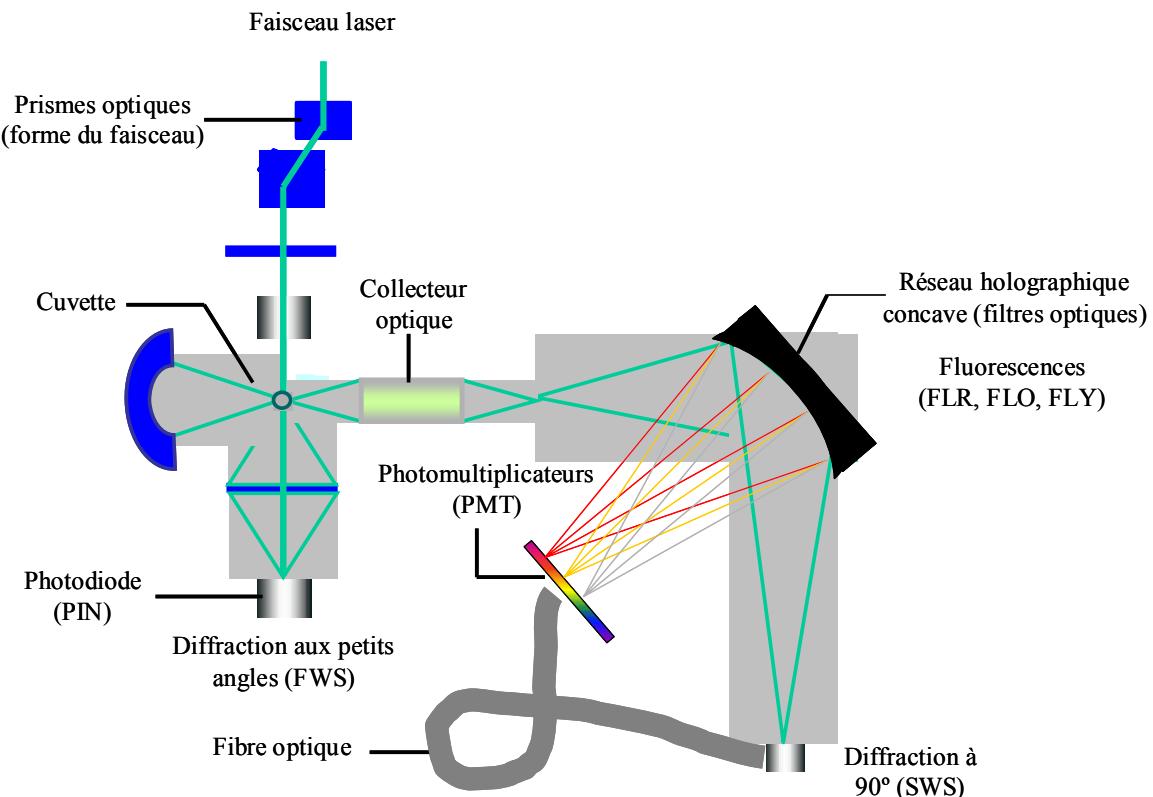


Figure I-7 : Schéma représentant les différents composants du système optique miniaturisé (vue de dessus) et la décomposition de la lumière du laser après interception d'une particule (d'après Thyssen, 2008).

L'instrument est également équipé de deux modules supplémentaires :

- Un module de détection de la courbure des particules (**Curvature**) consiste en un polariseur disposé sur l'unité FWS et permet de détecter les cellules à forme spiralée, courbée et les colonies.
- Un set de petits détecteurs de faible sensibilité (Low sensitivity, **LS**) est prévu pour la détection des grosses particules et un set de détecteurs plus gros est utilisé à haute sensibilité (High Sensitivity, **HS**) pour la détection de particules plus petites (picoplancton). Ce module de détection HS du picoplancton ne comprend que les détecteurs de SWS et de fluorescence FLR et FLY.

III.2.3. Le système électronique

Chaque variable collectée est transmise vers un disque dur associé placé au dessus de la chambre optique (**Fig. I-5**). Cette interface électronique convertit les signaux électriques bruts en données numériques. Chaque disque dur peut contenir 64 kb de données (équivalent à l'enregistrement d'une particule de 30 mm de long). La largeur du faisceau laser à 50% du

maximum de son intensité est de $3 \mu\text{m}$; on peut considérer que les particules plus larges que $6 \mu\text{m}$ auront des informations valides sur leur organisation interne et leur forme. Contrairement aux cytomètres en flux conventionnels, le pulse obtenu n'est pas intégré, mais décomposé en plusieurs données à une vitesse de 4 MHz (4 données par μs , soit 1 donnée par $0,5 \mu\text{m}$) lorsque la particule passe à travers le faisceau laser à une vitesse de 2 m.s^{-1} (**Fig. I-8**). Le flux de photons émis par le passage d'une particule devant le laser est converti en impulsions électriques, à leur tour converties en signaux numériques stockés sur des disques durs.

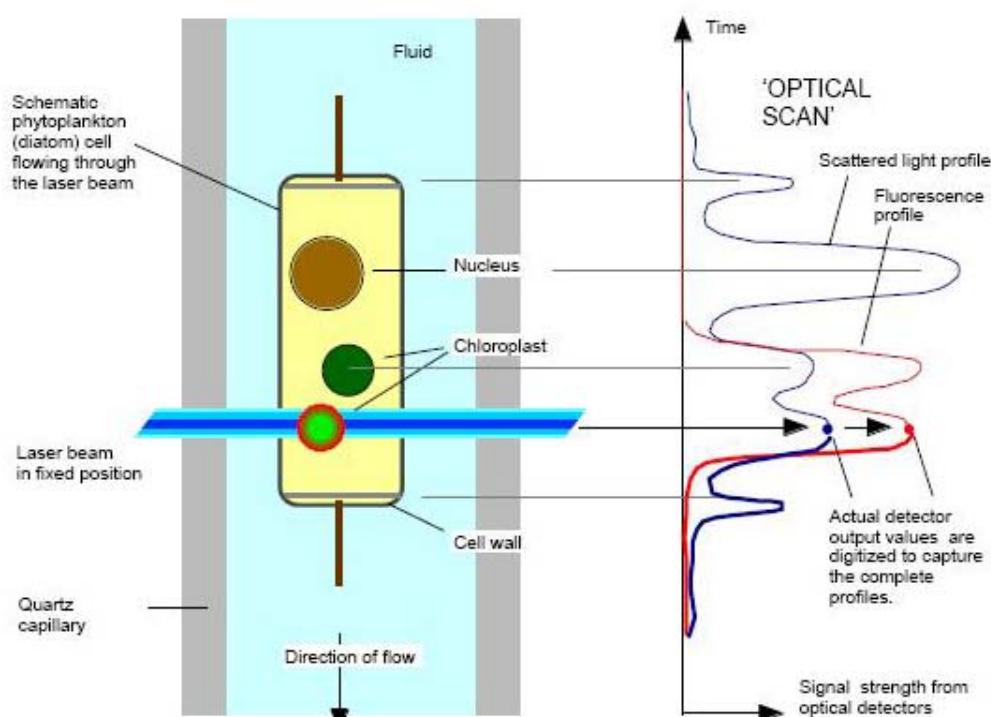


Figure I-8 : Principe du scanning optique du Cytosense, lors du passage d'une particule devant le faisceau laser. Le profil optique (optical scan) est composé d'un exemple de profil de lumière diffusée (ici le SWS en bleu) et d'un exemple de profil de fluorescence (ici FLR en rouge).

Le seuil de déclenchement de l'enregistrement des signaux est fixé par l'opérateur en fonction du type de particule recherché (cf ci-après les paramètres d'acquisition). Il s'agit d'éviter de saturer la mémoire avec du bruit électronique et des particules parasites inertes. Pour cela, le seuil requis est basé sur des signaux qui ont le meilleur rapport signal/bruit. De même, comme la taille des particules est proportionnelle à son temps de passage devant le laser, il convient de choisir une vitesse appropriée à la taille des particules à étudier. Par exemple, l'opérateur choisira une vitesse faible pour l'énumération des particules de petite taille. Une vitesse faible permet de bien séparer les particules au moment de la création du flux laminaire, limitant

ainsi les phénomènes de coïncidence rencontrés lorsque les concentrations cellulaires sont élevées. Le contrôle des paramètres de vitesse et de seuil de déclenchement se fait au moyen d'un logiciel informatique CytoUSB® installé dans un ordinateur externe, relié au CytoSense par port USB. Plusieurs modes d'opération de l'instrument sont possibles via le CytoUSB® : automatique, interactif ou programmé.

III.3. Analyses cytométriques

III.3.1. Calibration et entretien de routine

III.3.1.1. Calibration

Régulièrement, des billes fluorescentes et non fluorescentes de taille comprise entre 2 et 10 µm et de concentration connue ont été ajoutées aux échantillons à analyser pour s'assurer que les paramètres de détection n'avaient pas dévié. Dans le cadre d'un stage de Master 2 sur l'étude de cellules picoplanctoniques à l'aide du Cytosense (Ricquier, 2008), une détermination des limites de détection en fonction de la taille et de la concentration a été réalisée. Cette étude a confirmé que les cellules pouvaient être détectées jusqu'à une concentration de $10.10^6 \text{ cell.L}^{-1}$. Cependant, il a été décelé un manque de précision dans l'estimation de la taille des particules $< 5 \mu\text{m}$ car leur taille se situe en dessous de la largeur du faisceau laser, entraînant une surestimation de la taille de ces particules.

III.3.1.2. Entretien de l'appareil

Le Cytosense est construit pour nécessiter le moins de maintenance possible. L'aire de filtration contenue dans les capsules de filtres du liquide gaine est de 5500 cm^2 , ce qui est suffisant pour filtrer environ 3000 h d'échantillon (en usage normal, équivalent à une année d'analyse). Cependant, certaines opérations de maintenance ont été effectuées régulièrement pour assurer la pérennité et le bon fonctionnement de l'appareil.

Au fur et à mesure des analyses, le liquide gaine se contamine et devient de plus en plus salé. Des dépôts et des cristaux de sel peuvent alors encrasser les tuyaux. Par conséquent, une fois par mois, le liquide gaine est entièrement remplacé. L'opération consiste en l'infiltration de 2 litres d'eau distillée en faisant fonctionner uniquement la pompe du liquide gaine. Ce nouveau

liquide est resalé progressivement par passage normal, pendant une heure d'eau de mer filtrée ($0,2\text{ }\mu\text{m}$). Pendant cette opération, il est impératif de se débarrasser des bulles d'air s'étant introduites dans l'injecteur.

Si nécessaire, la cuvette de quartz est également nettoyée à l'aide d'une brosse (45 mm de diamètre) imbibée d'alcool. Les tuyaux de silicone de la pompe péristaltique sont changés en raison de l'affaiblissement de leur résistance dû au frottement des disques tournant et par conséquent de la modification du diamètre des tubes. Cette usure peut modifier de manière drastique le débit de pompage et il est impératif de les changer régulièrement (Thyssen, 2008). Dans ce cas, un contrôle de débit est effectué par pesée d'échantillon avant et après analyse.

III.3.2. Protocole de mesure

Des échantillons d'eau de mer entre 50 et 100 mL ont été prélevés et placés à 4°C pour être analysés au CytoSense le plus rapidement possible au laboratoire ou à bord du bateau. Si les échantillons ne peuvent pas être analysés au retour de mission, nous préconisons une fixation à la glutaraldéhyde (0,1% v/v) et une conservation au surgélateur (-80°C). L'autofluorescence et l'intégrité des cellules sont conservées ainsi pour 3 semaines (Burkhard et al., 2008).

III.3.2.1. Acquisition

Le mode de fluorescence rouge a été préférentiellement utilisé pour les comptages phytoplanctoniques avec le CytoSense. Ce mode permet de compter uniquement les particules fluorescéant en rouge (donc, contenant de la chlorophylle *a*) passant devant le laser. L'application d'un seuil de fluorescence peut s'avérer nécessaire lorsque l'échantillon est chargé en matière autofluorescente (autre que phytoplanctonique). Dans ce cas, des seuils de fluorescence rouge compris entre 50 et 100 mV ont été appliqués.

Deux types d'acquisition ont été réalisés en fonction de la taille et de la concentration des particules :

- 1) Vitesse de pompe rapide (de $3,6$ à $5,0\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$) et détection à haute sensibilité pour les grosses particules généralement faiblement concentrées.
- 2) Vitesse de pompe lente (de $0,8$ à $1,2\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$) et détection à faible sensibilité pour les petites particules généralement plus concentrées que les grosses particules

Pour chacune de ces acquisitions, 12000 à 15000 particules ont été enregistrées, résultant en des analyses de 2 à 15 min selon la concentration.

III.3.2.2. *Cultures*

46 espèces de diatomées ont été isolées à partir du milieu et cultivées par Elsa Breton (IR-ULCO). Les espèces ont été cultivées en utilisant du milieu F/2 enrichi en Si (Guillard, 1975) dans un incubateur entre 15 et 20°C avec un cycle jour/nuit de 12h : 12h. Neuf autres cultures de groupes taxonomiques différents sont issues de la collection de Plymouth et une souche de *Phaeocystis globosa* BCZ 99 a été fournie par le laboratoire d'Ecologie des Systèmes Aquatiques de l'Université Libre de Bruxelles.

III.4. Traitement des données cytométriques

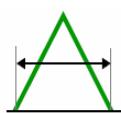
III.4.1. Méthode de classification manuelle

Le logiciel Cytoclus® réalise une série de calculs mathématiques sur les profils optiques des particules et permet de représenter l'ensemble des particules sur des graphiques appelés **cytogrammes**. Il s'agit de graphiques de nuage de points dont les axes représentent deux paramètres élémentaires calculés sur les profils optiques.

Les formes des profils contiennent en elles mêmes beaucoup d'informations, et il devient alors difficile d'analyser une grande quantité de particules. Pour cette raison, un nombre de paramètres appelés **attributs** ont été définis pour capturer les caractéristiques les plus importantes des formes de pulses de particule. Le Cytoclus® permet ainsi de sélectionner rapidement une série de particules avec des caractéristiques similaires.

Les attributs calculés par le CytoClus® sont les suivants:

Longueur



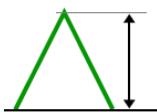
La longueur est déterminée à partir du temps de passage de la particule au travers du laser, corrigé d'un seuil de 13% (déterminé à partir de considérations physiques du laser).

Total



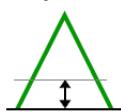
Le total est l'intégration du pulse, représentant l'aire du signal.

Maximum



Le maximum correspond à la valeur maximale détectée le long de la particule.

Moyenne



La moyenne est égale à la somme des données divisée par le nombre de données. La moyenne élimine l'effet de taille et de la fluorescence totale.

Inertie



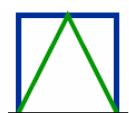
L'inertie est définie comme le second moment de la forme du pulse.

Centre de gravité



Le centre de gravité est calculé en divisant le premier moment de la forme du pulse par le total.

Facteur de remplissage



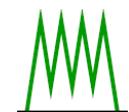
Le facteur de remplissage donne une indication sur la solidité de la forme du pulse.

Asymétrie



L'asymétrie donne une indication sur la distribution du signal le long de la particule.

Nombre de cellules



Le nombre de cellules est calculé à partir d'un algorithme qui identifie le nombre de pics le long de la particule.

TOF

Le TOF ou Time Of Flight correspond au temps de passage de la particule devant le laser.

Ces attributs sont calculés pour chaque signal, à l'exception du TOF qui est identique pour tous les signaux. Pour chaque analyse des données cytométriques, 14 cytogrammes sont disponibles, prédéfinis par le Cytoclus®. De plus, l'opérateur peut définir lui-même plus de 146 combinaisons de paramètres: [(9 attributs x 8 signaux) + 1 TOF] x 2. Chaque paramètre peut être utilisé seul ou en rapport.

Cependant pour une discrimination optimale de ces groupes, il faut représenter une multitude de combinaisons graphiques, ce qui rend difficile l'interprétation. D'après le travail de Master 2 de Wacquet (2008), 4 attributs permettent d'interpréter facilement et de représenter l'essentiel de l'information contenue dans le nuage de points. Il s'agit de la longueur, du maximum, du total du signal ainsi que du nombre de cellules.

III.4.2. Méthode de classification automatique

III.4.2.1. *Présentation de la base de données cytométriques*

Une base de données cytométriques a été réalisée par Xavier Mériaux (I.E. ULCO) à l'aide du logiciel PostgreSQL®. Elle permet de combiner différentes informations indépendamment de l'échantillon par l'intermédiaire de classes (**Fig. I-9**). La gestion et l'utilisation des données répertoriées dans cette base se fait via Python® et le module PyGreSQL® qui permet d'interfacer entre Python et PostgreSQL.

Ce dispositif a été mis en place pour pouvoir stocker, gérer et échanger plus facilement les informations du cytomètre. Il a notamment été utilisé dans l'identification des classes de cellules phytoplanctoniques à partir de cellules isolées en culture. Il permet de définir de manière plus robuste les limites des différentes classes à partir d'un nombre illimité d'attributs. Le logiciel CytoClus® ne permet de définir les limites qu'à partir de deux attributs, figurant les axes des cytogrammes. De plus, Python a permis de créer des représentations artificielles de cellules isolées en culture et des les superposer aux particules analysées en milieu naturel.

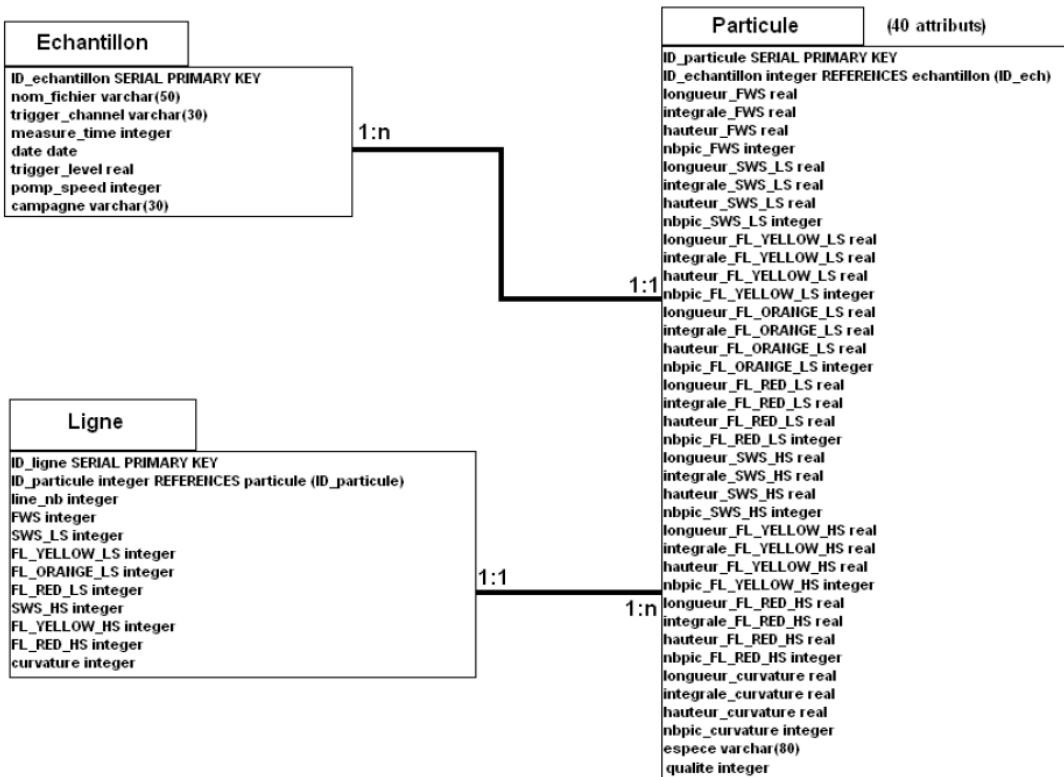


Figure I-9 : Modélisation de la base de données grâce au diagramme de classes. La classe « échantillon » regroupe entre eux les enregistrements réalisés par échantillon. La classe « particule » regroupe les attributs des signaux par particule. La classe « ligne » regroupe les données acquises le long de chaque profil optique.

III.4.2.2 Présentation du dispositif de classification automatique

L'objectif à long terme de l'utilisation de la méthode cytométrique est d'automatiser l'énumération et la reconnaissance des espèces phytoplanctoniques. Au cours de la présente étude, les données cytométriques acquises en milieu naturel et en culture ont servi de base à différents tests de classification mathématique, réalisés par le Laboratoire LASL¹⁴.

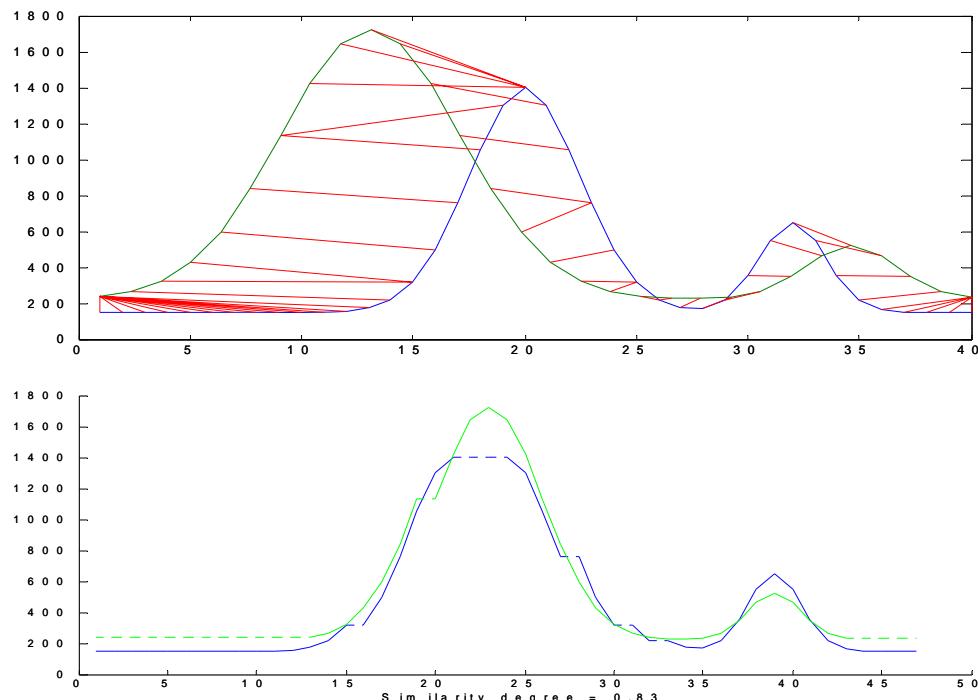
Les principaux tests utilisés ont été développés dans le cadre de différents travaux:

- **Les méthodes basées sur les attributs** ont été effectuées au cours du stage de Master INS3I et de la thèse de doctorat ULCO de Guillaume Wacquet.
- **Les méthodes basées sur les profils cytométriques** ont été réalisées par Emilie Caillault (MC-ULCO) et Pierre Alexandre Hébert (MC-ULCO), sous la direction de Denis Hamad (Pr-ULCO).

¹⁴ Laboratoire d'Analyse des Systèmes du Littoral de l'Université du Littoral Côte-d'Opale, équipe EIA-Extraction de l'Information et Apprentissage

Ces méthodes ont principalement été testées en classification dite « supervisée ». Autrement dit, elles ont nécessité l’application d’algorithmes définis à partir de profils optiques et d’attributs issus d’espèces isolées du milieu et mises en culture. Pour cela, une base d’apprentissage constituée de 100 à 300 particules issues de 4 à 9 cultures a été élaborée. Celle-ci a notamment été utilisée dans le cadre de l’apprentissage d’une méthode basée sur les profils optiques. Il s’agit d’une méthode d’appariement élastique (DTW ; Dynamic Time Warping), développée à partir d’un algorithme de Sakoe et Chiba (1978). Cette méthode repose sur des mesures de similarité entre les profils cytométriques (**Fig. I-10**). Les résultats préliminaires de cette approche ont fait l’objet d’une valorisation sous la forme d’une présentation orale lors du colloque international STIC et Environnement-Calais 2009 et d’un article (**Cf Annexe 2**; Caillault et al., 2009).

A.



B.

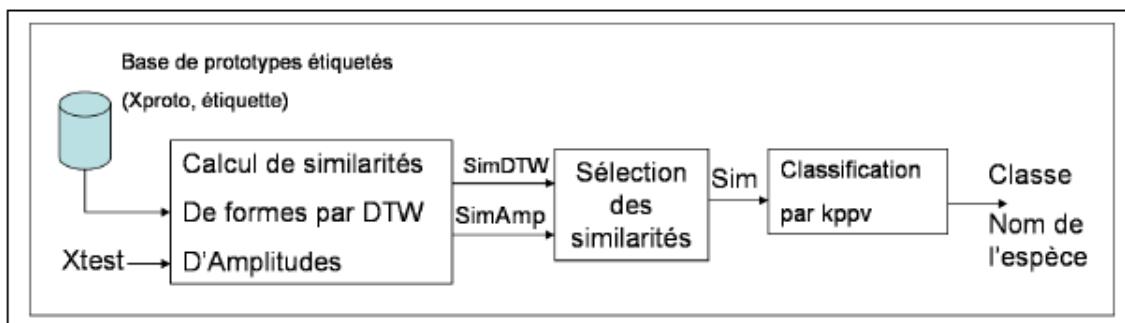


Figure I-10 : (A) Principe de la méthode d’appariement élastique et (B) schéma du système de reconnaissance (d’après Caillault et al., 2009).

III.5. Développements méthodologiques

III.5.1. Comparaison des méthodes de comptage : cytométrie vs microscopie

Une comparaison entre les comptages réalisés au microscope inversé et les comptages réalisés à l'aide du CytoSense présente une bonne corrélation, dont 80% de la variance serait expliquée par ce modèle (**Fig. I.11**). De manière générale, on observe une sous-estimation des comptages microscopiques par rapport aux comptages cytométriques pour de faibles concentrations, et une surestimation pour de fortes concentrations. Ces différences d'estimations sont en partie dues à la méthode de comptage par microscopie pour laquelle seul un certain nombre de cellules est dénombré et non l'intégralité.

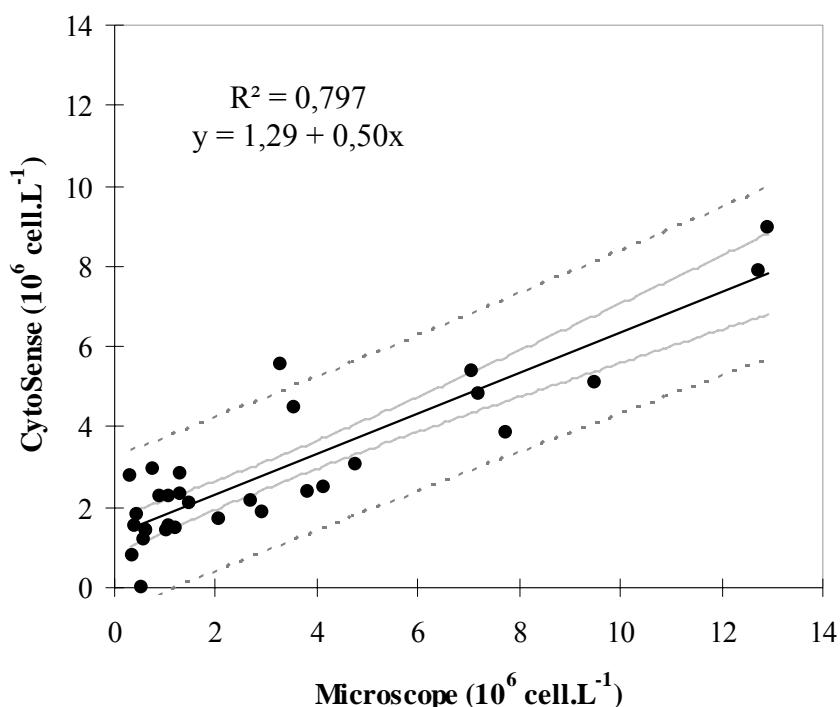


Figure I-11 : Régression linéaire entre les comptages manuels réalisés au microscope inversé et les comptages automatisés réalisés au CytoSense, en milieu naturel à la station côtière R1 ($n = 31$; $R^2 = 0,797$; $p < 0,0001$).

L'appareil présente une plus grande capacité de stockage de données que les modèles antérieurs ou submersibles (i.e. 10 fois supérieure à celle du CytoSub utilisé par Thyssen (2008)). De plus, l'instrument donne la possibilité de paramétriser le seuil de détection du canal déclencheur (e.g. Fluorescence, FWS et SWS) qui initie le départ/fin du « Time of Flight » d'une particule à travers le système. Cette fonction est particulièrement efficace pour pallier à

l’acquisition d’événements non souhaités (bruits électroniques et bulles d’air) remplissant la mémoire avant qu’un volume suffisant d’échantillon ne soit analysé.

Cependant, les niveaux de détection proposés par le constructeur et le volume de mémoire restent limités pour la détection d’événements rares tels que les grosses particules. Une comparaison entre une acquisition cytométrique sans seuil de détection appliqué et une acquisition avec seuil n’a pas révélé de différence significative dans le comptage des grosses cellules (Wilcoxon-Mann-Whitney ; $n = 21$; $p > 0,05$).

Le nombre moyen de cellules $> 20 \mu\text{m}$ par comptage était de 233 ± 307 cellules, résultant en un coefficient de variance de Poisson ($\text{CV}_P = 100/\sqrt{n}$; n = nombre de particules comptées) de $10,1 \pm 5,6 \%$. En comparaison, le nombre moyen de cellules $< 20 \mu\text{m}$ par comptage était de 7172 ± 3986 cellules, résultant en un CV_P de $1,5 \pm 1,3 \%$. Le comptage des grosses cellules reste insuffisant sachant que l’erreur moyenne admise pour une estimation correcte de la concentration est de 3% (Thyssen et al., 2008).

III.5.2. Caractéristiques cytométriques des cellules isolées en culture

Les profils optiques de certaines espèces isolées à partir du milieu et cultivées sont présentés en **Annexe 3**.

La **Figure I-12** représente des cytogrammes créés à partir du logiciel post GresQL regroupant des signaux acquis dans quelques unes de ces cultures. Elle illustre la difficulté de discriminer les différentes espèces les unes des autres. Certaines espèces apparaissent clairement séparées sur certains cytogrammes, telles que les cellules de *Phaeocystis globosa* et de *Rhodomonas sp.* (**Fig. I-12A et B**). Elles se distinguent principalement au niveau de leurs propriétés de fluorescence, comme figurées sur les cytogrammes par les rapports FLR/FLY. En effet, elles appartiennent à des groupes taxonomiques différents (Prymnesiophyceae et Cryptophyceae, respectivement) et possèdent des cortèges pigmentaires spécifiques. De même, les cellules libres de *Phaeocystis globosa* apparaissent bien séparées des colonies. Les colonies sont considérées par le cytomètre en flux comme des entités à part entière et par conséquent, se distinguent des cellules libres par leur taille.

En revanche, cette méthode de classification permet difficilement d’individualiser les espèces de diatomées et ce en dépit de leur grande diversité de forme. Cependant, il est possible de différencier trois groupes d’espèces de diatomées différentes sur la base de leur contenu pigmentaire (groupes 1, 2 et 3 ; **Fig. I-12C et D**) :

1. Un groupe (**1**) se caractérise par des niveaux de fluorescence faibles, à la fois de fluorescence rouge et de fluorescence jaune résultant en un rapport FLR/FLY faible. Il se compose principalement d'espèces de Nitzschiaceae telles que *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia* ou *Cylindrotheca* et de *Leptocylindrus minimus*.
2. Un autre groupe (**2**) se caractérise par des niveaux de fluorescence élevés, à la fois de fluorescence rouge et de fluorescence jaune résultant en un rapport FLR/FLY faible. Il est composé des espèces solitaires de grande taille telles que des espèces des genres *Coscinodiscus* et *Odontella*.
3. Un dernier groupe (**3**) se caractérise par des niveaux de fluorescence rouge plus élevés que ceux de fluorescence jaune résultant en un fort rapport FLR/FLY. Il se compose entre autre des espèces des genres *Chaetoceros*, *Thalassiosira* et *Rhizosolenia*, de *Asterionellopsis glacialis* et *Skeletonema costatum*.

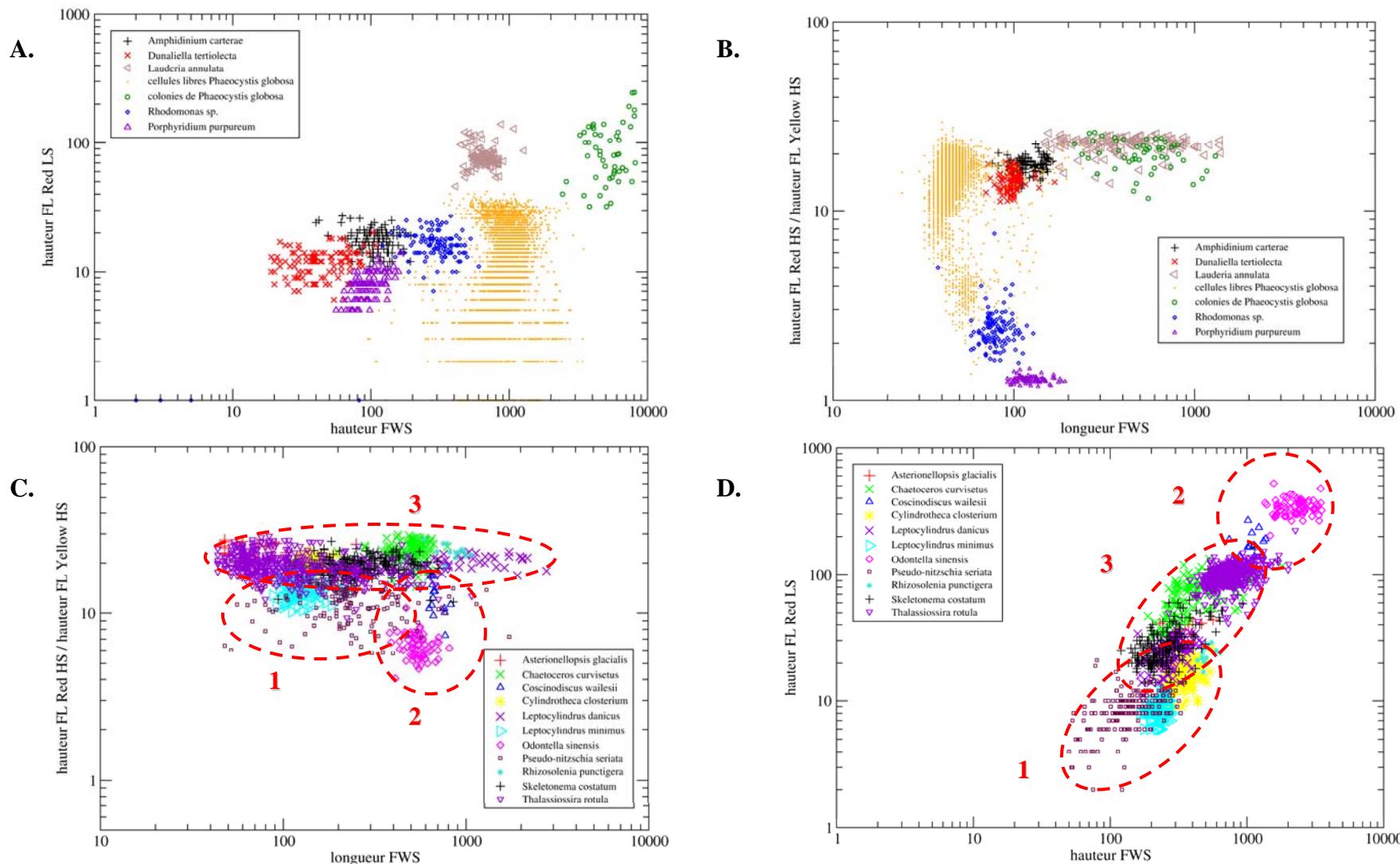


Figure I-12 : Cytogrammes de deux échantillons artificiels composés d'un mélange de cellules provenant de cultures monospécifiques. (A et B) espèces de groupes taxonomiques différents (*Lauderia annulata* = Diatomées ; *Amphidinium carterae* = Dinoflagellés ; *Rhodomonas* sp. = Cryptophyceae ; *Phaeocystis globosa* = Prymnesiophyceae ; *Porphyridium purpureum* = Rhodophyceae; *Dunaliella tertiolecta* = Chlorophyceae). (C et D) espèces de diatomées. Les cercles en pointillés représentent trois classes d'espèces de diatomées (1, 2 et 3).

Une étude mathématique a été conduite sur les attributs de 9 espèces de ces cultures, en utilisant des méthodes de classification plus robustes (e.g. K-means d'après Wacquet (2008) et Spectral Clustering d'après Wacquet com. pers.). Les résultats de ces méthodes mettent en évidence une confusion de 40% dans la reconnaissance des espèces (**Fig. I-13**). Cela signifie que beaucoup de confusions sont possibles sur la base des attributs des signaux. Par exemple (**Fig. I-13**), les cellules de *Thalassiosira rotula* peuvent être confondues à 16% avec celles de *Lauderia annulata* ; ou encore les cellules de *Amphidinium carterae* peuvent être confondues à 65% avec celles de *Emiliania huxleyi* et de *Phaeocystis globosa*.

```

WEKA 3.5.7 - Clustering -
Schema : Cluster - SimpleKMeans
Options : Classes to clusters evaluation : Classe
Number of clusters : 9
Relation : donnees
Instances : 2700

==== Nombre d'itérations : 11 ===

Répartition des Instances
    0      195      (7%)
    1      319      (12%)
    2      275      (10%)
    3      133      (5%)
    4      237      (9%)
    5      296      (11%)
    6      300      (11%)
    7      851      (32%)
    8      134      (5%)

==== Matrice de Confusion ===
    0   1   2   3   4   5   6   7   8   <-- assignées au cluster
0   0   0   0   0   0   300   0   | Amphidinium_carterae
176 42   65   0   0   0   0   17   | Chaetoceros_socialis
0   0   4   0   0   7   0   288   1   | Emiliania_huxleyi
3   165   0   133   39   0   0   0   0   | Lauderia_annulata
0   0   16   0   0   282   0   1   1   | Leptocylindrus_minimus
0   0   0   0   0   300   0   0   0   | Odontella_sinensis
2   0   2   0   0   1   0   262   33   | Phaeocystis_globosa
14  10  188   0   0   6   0   0   82   | Skeletonema_costatum
0   102   0   0   198   0   0   0   0   | Thalassiosira_rotula

Cluster 0 <-- Chaetoceros_socialis
Cluster 1 <-- Lauderia_annulata
Cluster 2 <-- Skeletonema_costatum
Cluster 3 <-- No class
Cluster 4 <-- Thalassiosira_rotula
Cluster 5 <-- Leptocylindrus_minimus
Cluster 6 <-- Odontella_sinensis
Cluster 7 <-- Amphidinium_carterae
Cluster 8 <-- Phaeocystis_globosa

Instances incorrectement classifiées : 1058.0
                                         39.1852 %

```

Figure I-13 : Résultats de la méthode de classification K-means, issus de Wacquet (2008) et réalisés sur des données acquises dans 9 cultures.

IV. Traitement statistique et analyse des données

IV.1. Analyses graphiques

IV.1.1. Boîtes de dispersion

Une représentation graphique au moyen de diagramme Box-plot (ou boîtes de dispersion de Tukey, 1977) permet de résumer la variabilité d'un jeu de données (**Fig. I-14**). Elle apporte une bonne représentation de la valeur centrale et de la dispersion de la distribution des données. Une boîte de dispersion représente le minimum, le 1^{er} quartile (25%), la médiane (50%), le 3^{ème} quartile (75%) et le maximum. Les valeurs à chaque extrémité de la boîte définissent l'intervalle interquartile et correspondent à 50% de la distribution des données. Les valeurs frontières de part et d'autre des limites supérieure et inférieure de la boîte de dispersion sont calculées à partir de l'intervalle interquartile ($1,5 \times \text{intervalle interquartile}$). Les valeurs extrêmes ou outliers sont figurées au-delà des valeurs frontières par un trait horizontal. Des diagrammes de box-plots ont été utilisés pour intégrer les données hydrobiologiques à l'échelle saisonnière (Chapitre II).

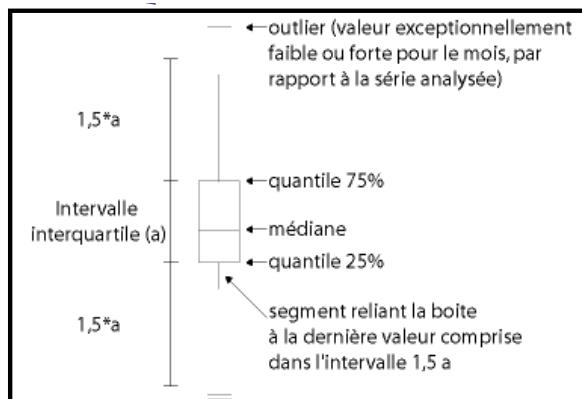


Figure I-14 : Représentation schématique d'une boîte de dispersion ou Box-plot.

IV.1.2. Courbe des sommes cumulées

Les tendances des séries chronologiques (Chapitre II) ont été appréhendées avec la méthode des « Sommes Cumulées » ou « tendance locale ». Il s'agit d'une méthode graphique développée par Ibanez et al. (1993) permettant de détecter les changements de tendance d'une série de données. Cette méthode consiste dans un premier temps à soustraire de la série une

valeur de référence (ici la moyenne) et de cumuler dans un second temps les résidus. Les changements de tendances dans la série peuvent être identifiés à partir de la courbe cumulée obtenue. Les ruptures de pente de la courbe correspondent à des discontinuités dans l'évolution temporelle du paramètre. Les pentes positives indiquent que les valeurs successives sont supérieures à la moyenne de la série tandis que les pentes négatives correspondent à des valeurs inférieures.

IV.1.2. Modèle de lissage

Les données météorologiques présentées au Chapitre IV ont été lissées avec la procédure loess d'ordre 1 du logiciel SigmaPlot (2001 ; 7.0) pour générer des séries sans variations journalières. Une procédure Loess d'ordre 1 a été utilisée pour contre-balancer les valeurs extrêmes mais également couvrir d'éventuelles périodes de valeurs manquantes.

IV.2. Analyses univariées

IV.2.1. Analyse de la biodiversité

Les espèces phytoplanctoniques les plus caractéristiques ont été définies à l'aide de l'Indice d'Importance Relative (IIR) développé par Pinkas et al. (1971). L'IIR permet de révéler des espèces qui ne sont pas obligatoirement caractéristiques par leur abondance mais également par leur biomasse et leur persistance.

Cet indice est défini en fonction des fréquences relatives (%) en abondance (N) et en biomasse (B) ainsi que de la fréquence d'occurrence (FO) de la manière suivante :

$$IIR = (N\% + B\%) \times FO\%$$

L'analyse de la biodiversité a été réalisée au moyen de trois indices complémentaires pour définir la complexité des assemblages phytoplanctoniques.

(1) L'indice de Shannon-Wiener (H') (Shannon et Weaver, 1949) :

$$H' = - \sum_{i=1}^S f_i \times \log_2 f_i ,$$

où f_i est la fréquence de l'espèce i.

(2) Le nombre d'espèces (S)

(3) Les diagrammes rang-fréquence (DRF) ont été construits pour décrire certains échantillons (Frontier, 1976). Ils donnent une représentation globale plus détaillée

qu'une simple valeur numérique. Les espèces sont ordonnées par abondance décroissante le long de l'axe x et par fréquence relative le long de l'axe y. Pour améliorer la discrimination des DRF, les deux axes sont représentés en échelle log10. Les DRF montrent le gradient écologique qui lie la communauté pionnière à l'état d'équilibre final. Les stades ont été empiriquement définis par rapport à la tendance des courbes DRF. Dans les cas extrêmes, la courbe de tendance a été analysée mathématiquement en utilisant un modèle polynomial de second ordre. Les diagrammes rang-fréquence ont été interprétés comme décrit par Frontier (1976) :

- Au cours du **stade 1** (commencement de la succession), la courbe est concave à l'extrémité gauche, indiquant qu'un petit nombre d'espèces domine.
- Au cours du **stade 2** (maturité de la communauté), la courbe est entièrement convexe et représente une diversité maximale.
- Au cours du **stade 3** (fin de la succession), la courbe devient relativement droite due à l'abondance décroissante des espèces les plus abondantes.

IV.2.2. Régression linéaire simple

La méthode de régression linéaire a été appliquée pour comparer deux méthodes d'analyse (Chapitre IV). L'objectif de cette méthode est de décrire le lien linéaire entre une variable contrôlée (ou dépendante) et une variable de réponse (ou indépendante). L'équation de la droite s'ajustant le mieux est calculée et le coefficient de corrélation R^2 fournit une mesure d'intensité de lien entre les deux variables.

IV.3. Analyses multivariées

IV.3.1. Analyses factorielles

Des analyses factorielles de correspondances (AFC) ont été appliquées aux données d'abondance des principales espèces phytoplanctoniques (Chapitres I et II) et ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT (7.5.3). L'AFC permet de décrire de manière synthétique un tableau de contingence composé des individus en lignes (espèces) et des objets en colonnes (échantillons). Le principe de cette méthode est de résumer les variations des individus et des objets au moyen d'un nombre plus faible de variables, appelés facteurs. Ces facteurs sont

calculés à partir de la distance (distance du χ^2) des variables originales. Cette distance constitue la différence entre la distribution observée (tableau de contingence) et une distribution théorique (hypothèse d'indépendance).

IV.3.2. Analyse des redondances

Les variations dans la composition en espèces phytoplanctoniques en relation avec les paramètres environnementaux ont été analysées en détails par une analyse de redondance (Analyse Canonique de Redondance ; ACR). L'ACR est une méthode d'ordination comme l'analyse en composantes principales (ACP) mais correspond à une forme contrainte. Elle permet de relier directement les données phytoplanctoniques contenues dans un tableau de contingence aux variables environnementales en contrignant l'ordination des espèces au moyen d'une régression multiple (Ter Braak, 1986). L'ACR trouve les axes d'ordination des nuages de points qui sont les plus fortement linéairement reliés à l'ensemble des variables explicatives. Une analyse préliminaire des correspondances détendues a révélé que la longueur de gradient pour les premiers axes était inférieure à 3 unités d'écart-type, indiquant une prédominance de réponse non-unimodale. L'analyse a été réalisée au moyen du logiciel CANOCO (4.5 ; Ter Braak et Smilauer, 1998). Les analyses de permutation de Monte Carlo ont été utilisées pour tester la significativité de la contribution de chaque variable à chaque axe. Les données d'abondances phytoplanctoniques ont été préalablement transformées en log ($x + 1$) pour réduire l'influence des espèces les plus abondantes et les espèces rares ont été allégées pour réduire leur effet.

IV.3.3. Matrice de corrélation de Spearman

Afin de déterminer de manière fine les covariations entre les espèces phytoplanctoniques avec les paramètres environnementaux, une matrice de corrélation a été calculée pour les données relatives aux Chapitres III et IV au moyen du logiciel XLSTAT (7.5.3). Le coefficient non paramétrique de Spearman (ρ) a été choisi. L'application de ce coefficient ne demande pas de conditions de normalité préalable (Legendre et Legendre, 1998).

CHAPITRE II

Variabilité à long terme (1992-2007) des communautés phytoplanctoniques en Manche orientale

Introduction

Le compartiment phytoplanctonique est un indicateur de la dynamique des masses d'eau côtières, de part sa très large diversité, ses taux de croissance variables et une réponse rapide à la présence de nutriments, au broutage par le zooplancton, aux conditions de luminosité, de température, de turbulence et aux polluants (Cloern, 2001). Il constitue donc un des paramètres biologiques retenus pour la classification de l'état écologique des masses d'eau dans la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000).

La variabilité naturelle du phytoplancton est dirigée principalement par le climat qui influence la température, la luminosité, le vent et les précipitations. Ces événements naturels déterminent l'environnement physico-chimique (température, salinité, lumière, nutriments) du phytoplancton. Cependant la dynamique des blooms phytoplanctoniques en zone côtière est issue de sources additionnelles de variabilité. En plus des changements issus des conditions naturelles, les modifications potentielles des conditions nutritives en relation avec les activités humaines gouvernent les changements observés des communautés phytoplanctoniques.

L'eutrophisation d'un milieu correspond à un état d'enrichissement à un point tel qu'il entraîne des effets nuisibles sur l'écosystème et les activités humaines (Ménesguen et al., 2001). L'augmentation de la biomasse algale et les changements de composition en espèces phytoplanctoniques ont été attribués à l'eutrophisation, dans de nombreux milieux côtiers à travers le monde (Smayda, 1990 ; Vollenweider, 1992 ; Smayda, 2004). Le rôle de l'eutrophisation a été également avéré dans la production de substances allélopathiques³⁰ par certaines espèces (Granéli et al., 2008). Parmi les espèces proliférant massivement, les blooms de la Prymnésiophycée, *Phaeocystis* constituent un phénomène remarquable, annuellement enregistré depuis 1974 en Mer du Nord, le long des côtes eutrophisées de la Belgique, des Pays-Bas et de l'Allemagne et depuis 1992 en Manche orientale, le long des côtes françaises (Bulletins SRN de l'Ifremer au site de Boulogne-sur-Mer). Les concentrations des nutriments

³⁰ Emission de substances antagonistes ou toxiques dans le milieu ambiant par des végétaux (morts ou vivants) et empêchant l'implantation ou le développement d'autres espèces.

phosphates et nitrates contrôleraient largement le développement de la biomasse dans les régions tempérées (Lancelot et Mathot, 1987 ; Verity et al., 1988 ; Veldhuis et al., 1991).

De nombreux programmes d'observation et de surveillance réalisés en zone côtière du Nord de l'Europe, ont déjà permis d'observer des changements au sein des communautés phytoplanctoniques sur de longues périodes (Philippart et al., 2000 ; Cadée et Hegeman, 2002 ; Breton et al., 2006 ; Gieskes et al., 2007 ; Gomez et Souissi, 2008 ; Baretta-Becker et al., 2009). De telles études ont été encouragées par la mise en place de la DCE.

En Manche orientale, des programmes de surveillance (SRN³¹ de l'Ifremer et de l'Agence de l'Eau et REPHY³² de l'Ifremer) et d'observation (SOMLIT³³ de l'INSU) ont été mis en place au cours des années 90. En particulier, le Suivi Régional des Nutriments (SRN) possède une importante base d'observations le long des côtes françaises entre la Manche orientale et la Baie Sud de la Mer du Nord depuis 1992, permettant d'évaluer l'impact des apports continentaux en nutriments sur l'écosystème et leurs conséquences sur les processus d'eutrophisation. Le SRN fait actuellement l'objet d'une valorisation (Lefebvre et al., en préparation), dont sont extraits dans le cadre de cette étude, les résultats relatifs à la station côtière du site de Boulogne-sur-Mer (SRN1). Cette station a été choisie en raison de sa proximité avec la station échantillonnée³⁴ au cours du travail de thèse.

Dans ce chapitre, l'objectif est de dresser un état des lieux des communautés phytoplanctoniques présentes dans la zone d'étude et d'étudier leur dynamique à long terme. Dans un premier temps, nous caractériserons les variations saisonnières globales des conditions nutritives et des communautés phytoplanctoniques. Dans ce contexte, il sera possible de cibler les périodes caractéristiques d'un fonctionnement particulier (période de forte production de biomasse phytoplanctonique par exemple). Dans un second temps, nous étudierons les tendances sur plusieurs années de la composition des communautés phytoplanctoniques et nous définirons les relations possibles avec les apports en sels nutritifs.

³¹ Suivi Régional des Nutriments

³² Réseau de surveillance du PHYtoplankton et des phytotoxines

³³ Service d'Observation en Milieu LITToral

³⁴ La station côtière R1 du site d'Ambleteuse est distante de 6 km de la station côtière SRN1 du site de Boulogne-sur-Mer (Cf Chapitre I ; § I.2.).

I. Evolution saisonnière des conditions chimiques et biologiques

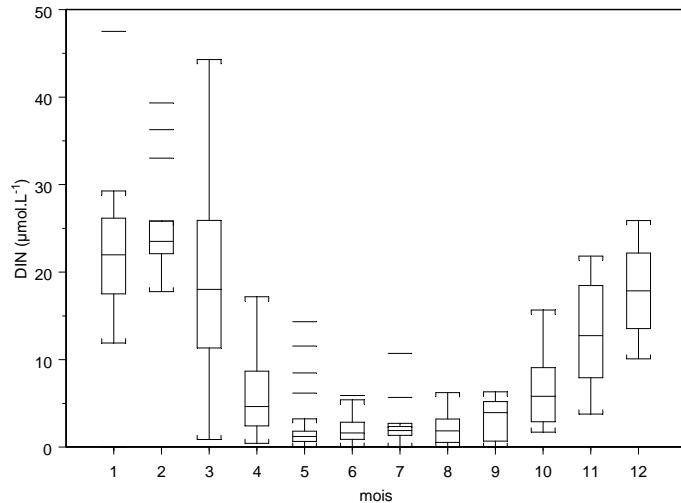
I.1. Sels nutritifs

Le cycle saisonnier des concentrations en sels nutritifs a été mis en évidence en regroupant par mois les données récoltées sur l'ensemble de la période 1992-2007, à la station côtière du site de Boulogne-sur-Mer (**Fig. II.1**). Les concentrations saisonnières maximales en sels nutritifs étaient observées au cours de l'hiver, entre janvier et février avec l'essentiel des concentrations comprises entre 17 et 26 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour l'azote inorganique dissous³⁵ (DIN ; **Fig. II.1-A**), entre 4 et 11 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour les silicates (**Fig. II.1-B**) et entre 0,7 et 1,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour les phosphates (**Fig. II.1-C**). Les concentrations en silicates et en phosphates étaient rapidement épuisées au cours du mois de mars et atteignaient des valeurs minimales, voire proches de la limite de détection dès le mois d'avril (**Fig. II.1-B et C**). En revanche, la diminution des concentrations en DIN avait lieu progressivement entre mars et mai (**Fig. II.1-A**). Les stocks de phosphates et de silicates commençaient à se reconstituer dès les mois de juin et de juillet, respectivement tandis que la reconstitution des stocks de DIN avait lieu plutôt à partir du mois d'août.

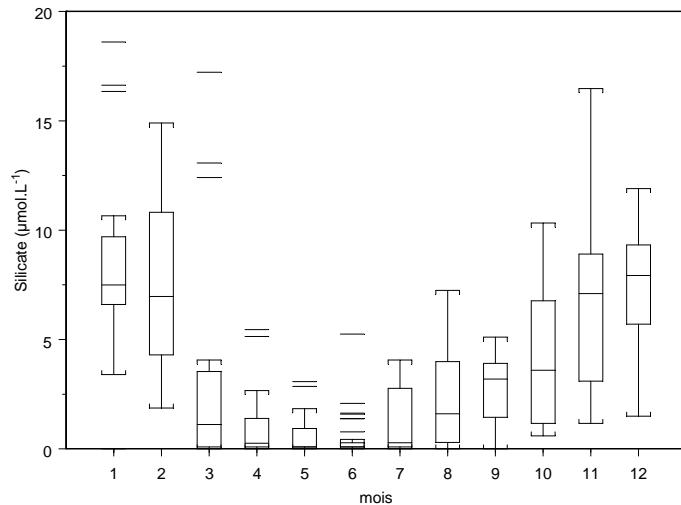
Concernant les limitations potentielles en sels nutritifs (**Fig. II.2**), la majorité des échantillons collectés au cours de la période d'étude sont caractérisés par des rapports molaires Si : N et Si : P inférieurs aux rapports de Redfield ($\text{Si : N} < 1$ et $\text{Si : P} < 16$; Redfield et al., 1963 ; Brezinski et al., 1985). Cela indique que la silice était le principal élément pouvant limiter la croissance phytoplanctonique à la station côtière du site de Boulogne-sur-Mer durant la période d'étude. En revanche, les rapports molaires N : P étaient généralement supérieurs au rapport de Redfield (16 : 1) au cours de l'hiver et inférieurs au cours de l'été (Alain Lefebvre, com. pers.). Il en résultait une limitation potentielle de la croissance phytoplanctonique (i) par le phosphore d'octobre à avril et (ii) par l'azote de mai à septembre.

³⁵ L'azote inorganique dissous correspond dans ce chapitre, à la totalité des concentrations en nitrate, en nitrite et en ammonium et sera intitulé DIN (Dissolved Inorganic Nitrogen).

A.



B.



C.

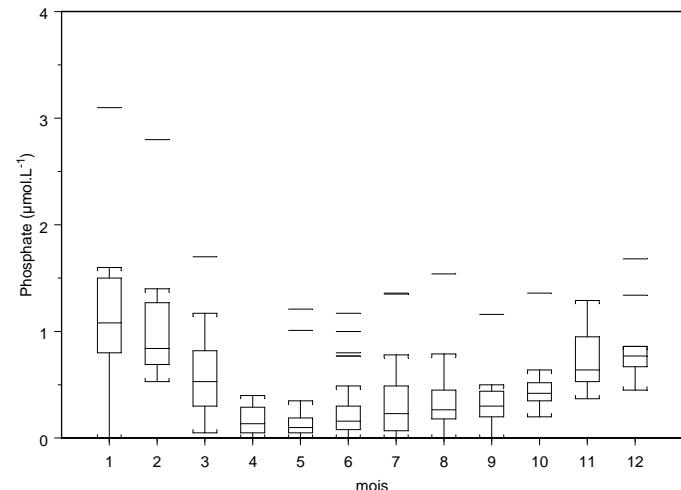


Figure II.1: Boîtes de dispersion représentant les données mensuelles des concentrations en sels nutritifs ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) à la station côtière du site de Boulogne-sur-Mer : (A) DIN (nitrate + nitrite + ammonium) ; (B) silicate et (C) phosphate. Résultats issus de Lefebvre et al. (en préparation).

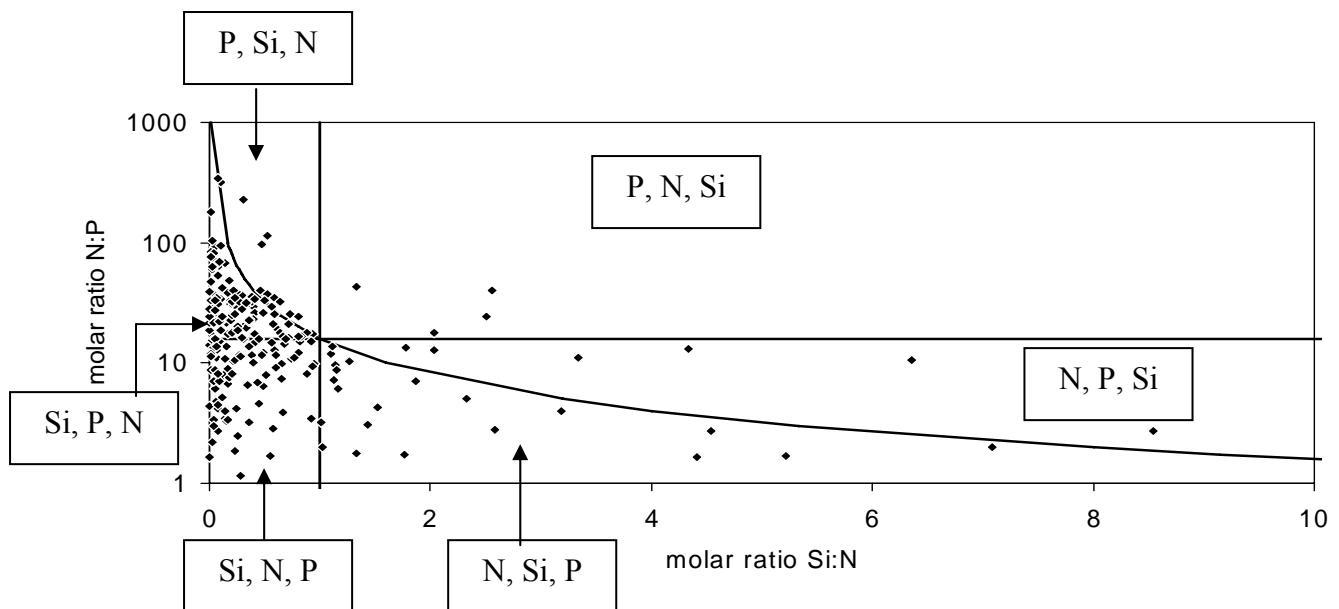


Figure II.2 : Rapports stoechiométriques Si:N:P des échantillons collectés entre 1992 et 2007 à la station côtière du site de Boulogne-sur-Mer ($n = 224$). Dans chaque aire délimitée par les rapports de Redfield et al. (1963) et de Brzezinski (1985) ($\text{Si:N:P} = 16:16:1$), les nutriments potentiellement limitant sont reportés par ordre décroissant de limitation. Résultats issus de Lefebvre et al. (en préparation).

I.2. Chlorophylle a

Le cycle annuel de la concentration en chlorophylle *a* (Chl *a*) est représenté en **Fig. II.3**, sous forme de boîtes de dispersion des données regroupées par mois, toutes années confondues. Les concentrations étaient typiques des régions côtières tempérées avec de faibles concentrations observées d'octobre à février ($< 5 \mu\text{g.L}^{-1}$), atteignant des concentrations plus élevées entre mars et juillet. Les concentrations maximales de Chl *a* étaient généralement observées en avril. L'essentiel de la dispersion³⁶ de ces concentrations se situait entre 4 et 16 $\mu\text{g.L}^{-1}$ avec une valeur médiane de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et les concentrations pouvaient atteindre jusqu'à 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Une seconde élévation des concentrations en Chl *a* pouvait être observée en septembre mais n'excédait pas 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

³⁶ Il s'agit de l'écart interquartile (EIQ = Q3 – Q1), correspondant à 50% des effectifs situés dans la partie centrale de la distribution. L'EIQ est symbolisé par la boîte de dispersion.

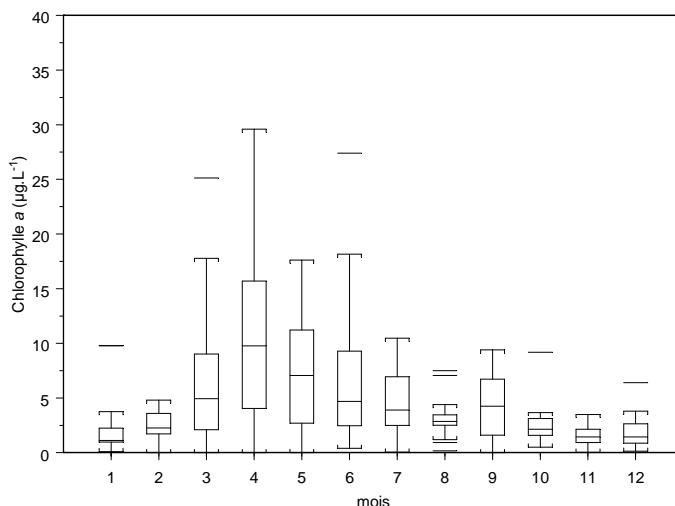


Figure II.3 : Boîtes de dispersion des concentrations en chlorophylle *a*. Données regroupées par mois toutes années confondues (1992-2007) et acquises à la station côtière de Boulogne-sur-Mer. Résultats issus de Lefebvre et al. (en préparation).

II. Evolution interannuelle des conditions chimiques et biologiques

II.1. Sels nutritifs

Les concentrations annuelles maximales atteintes en hiver au cours de la période 1992-2007, s'étendaient de 19 à 47 µmol.L⁻¹ pour le DIN, de 3,3 à 19 µmol.L⁻¹ pour les silicates et de 0,6 à 3,1 µmol.L⁻¹ pour les phosphates. Des concentrations en DIN relativement élevées ($> 40 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) ont été observées au cours des hivers 1993/94 et 2001/02 (Fig. II.4-A). D'importants stocks de silicates ($> 15 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) ont été également observés au cours de l'hiver 1993/94 ainsi qu'au cours des hivers 2002/03, 2005/06 et 2006/07 (Fig. II.4-B). Pour les phosphates, des concentrations élevées ($\sim 3 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) n'ont été relevées qu'au cours de l'hiver 1992/93 (Fig. II.4-C). Les autres valeurs maximales étaient proches de 1,5 µmol.L⁻¹. Par conséquent, les rapports stoechiométriques N :P, Si :P et Si :N (données non représentées) enregistrés en hiver étaient fréquemment plus importants depuis 2000.

D'après l'analyse de la courbe de somme cumulée, les concentrations de DIN se caractérisaient par plusieurs tendances (Fig. II.4-A) : (i) les concentrations en DIN ont été proches de la valeur moyenne de 1992 à 1998, (ii) puis régulièrement supérieures à la moyenne de la série de 1998 à 2002, se traduisant par une courbe de somme cumulée de pente positive et enfin (iii) régulièrement inférieures à la moyenne depuis 2002, caractérisées par une courbe de pente négative. Les concentrations en silicate se sont caractérisées par une diminution suivie d'une augmentation, comme l'attestent les deux tendances principales de la

courbe de somme cumulée (**Fig. II.4-B**) : (i) une tendance négative entre 1992 et 2001 suivie (ii) d'une tendance positive de 2001 jusqu'en 2007. Les concentrations en phosphate ont diminué au cours de la période 1992-2007 (**Fig. II.4-C**), se caractérisant par une courbe de somme cumulée à pente négative depuis les années 2000.

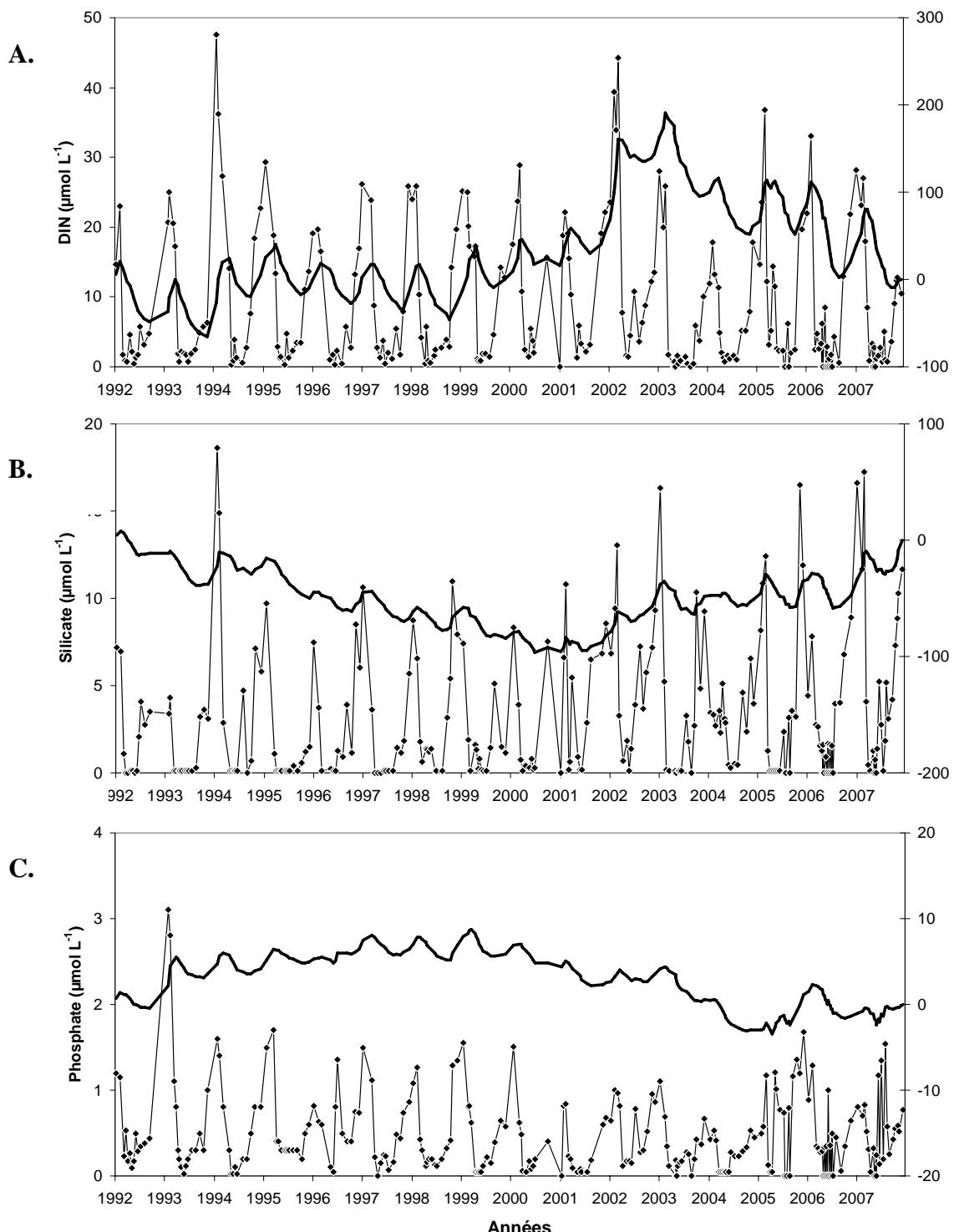


Figure II.4 : Evolution temporelle des concentrations en sels nutritifs ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) à la station côtière du site de Boulogne-sur-Mer entre 1992 et 2007: (A) DIN ; (B) silicate et (C) phosphate. La somme cumulée est représentée en trait épais. Résultats issus de Lefebvre et al. (en préparation).

II.2. Chlorophylle a

Sur la base des concentrations en Chl *a* maximales rencontrées au printemps, les années individuelles pouvaient être séparées en deux catégories (**Fig. II.5**). Le premier groupe comprenait les années 1994-1995 et 1998-2007 dont les concentrations maximales se situaient entre 14 et 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Des concentrations particulièrement élevées ($> 20 \mu\text{g.L}^{-1}$) ont été observées au cours des années 1994, 2000 et 2003. Le second groupe était constitué des années 1992-1993 et 1996-1997 avec des concentrations maximales plus faibles, allant de 3 à 8 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Cependant, deux tendances principales de la courbe de sommes cumulées ont été observées (**Fig. II.5**): (i) une tendance négative observée de 1992 à 1998 indiquait que les concentrations en Chl *a* étaient régulièrement inférieures à la moyenne, (ii) puis la tendance positive observée de 1998 à 2007 indiquait des concentrations en Chl *a* régulièrement supérieures à la moyenne.

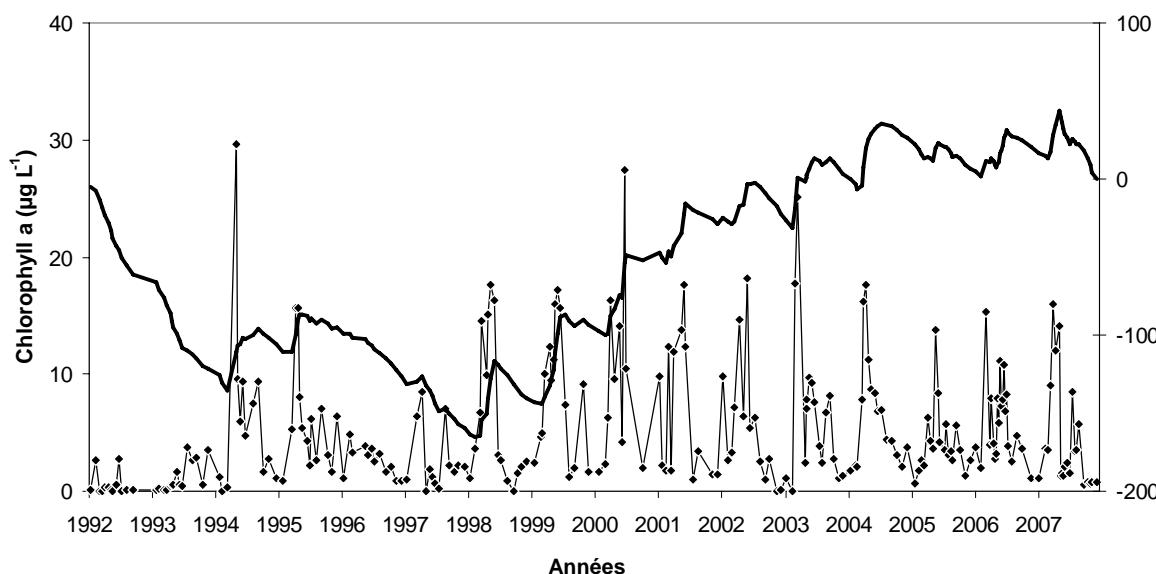


Figure II.5 : Evolution temporelle de la concentration en chlorophylle a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) à la station côtière de Boulogne-sur-Mer de 1992 à 2007. La courbe de somme cumulée est représentée en trait épais. Résultats issus de Lefebvre et al. (en préparation).

III. Structure des communautés phytoplanctoniques

III.1. Composition des communautés phytoplanctoniques

Un total de 112 espèces phytoplanctoniques, appartenant à 9 groupes taxonomiques différents, a été collecté au cours de la période 1992-2007, au site de Boulogne-sur-Mer : Bacillariophytes, Prymnesiophycées, Dinophytes, Chlorophycées, Chrysophycées, Cryptophytes, Dictyochophycées, Raphidophycées et Prasinophycées. Le groupe taxonomique le plus représenté en nombre d'espèces a été celui des diatomées (Bacillariophytes ; 97 espèces).

Le calcul de l'indice d'importance relative (Importance Relative Index ; IRI) a permis de sélectionner 32 espèces, en tenant compte de leur contribution à l'abondance et à la biomasse totales ainsi que de leur fréquence d'occurrence (**Tableau II.1**). L'espèce présentant l'indice le plus élevé a été la Prymnesiophycée *Phaeocystis globosa* dont l'abondance et la biomasse moyennes représentaient $2,5 \cdot 10^6$ cell.L⁻¹ et 222 µgC.L⁻¹, respectivement sur l'ensemble de la période 1992-2007.

D'autres espèces, appartenant au groupe des diatomées, ont contribué majoritairement à l'abondance totale. Toutefois, l'abondance moyenne des espèces a été beaucoup moins importante que celle de *P. globosa* (moyenne maximale de $0,4 \cdot 10^6$ cell.L⁻¹; **Tableau II .1**). Il s'agissait principalement d'espèces coloniales de petite taille (< 50µm) telles que *Chaetoceros socialis*, *Chaetoceros* sp., *Pseudo-nitzschia delicatissima* et *Leptocylindrus* sp. (abondance moyenne : $60-340 \cdot 10^3$ cell.L⁻¹). D'autres espèces ont fortement contribué à la biomasse totale avec néanmoins des contributions par espèce inférieures à celle de *P.globosa* (moyenne maximale de 69,6 µgC.L⁻¹; **Tableau II.1**). Ces espèces étaient généralement solitaires et de grande taille (> 50 µm), telles que *Guinardia flaccida* et *Coscinodiscus wailesii* (biomasse moyenne : 30-70 µgC.L⁻¹). Enfin, d'autres espèces ont été particulièrement présentes tout au long de la période 1992-2007, telles que *Guinardia delicatula*, *Raphoneis amphiceros*, *Paralia sulcata*, *Rhizosolenia imbricata* et *Chaetoceros* sp. (fréquence d'occurrence > 60%). *Raphoneis amphiceros* et *Paralia sulcata* sont des espèces tychopélagiques, se retrouvant dans la colonne d'eau après remise en suspension. D'autres groupes étaient représentés par des espèces dominantes, tels que les Dinophytes (dinoflagellés), les Cryptophytes et les Chrysophycées. En particulier, le dinoflagellé du genre *Gymnodinium* sp. a été caractérisé par un IRI élevé dû à une importante contribution en terme de biomasse (20 µgC.L⁻¹) et de fréquence d'occurrence (47%).

Tableau II.1 : Liste des taxons indicateurs déterminées par l'Indice d'Importance Relative (IRI > 10%), avec leur abondance moyenne (10^3 cell.L^{-1}), leur biomasse moyenne ($\mu\text{gC.L}^{-1}$) et leur fréquence d'occurrence (%) au cours de la période 1992-2007.

Taxons	Code	Taille (μm)	Indice d'Importance Relative (%)	Abondance moyenne (10^3 cell.L^{-1})	Biomasse moyenne ($\mu\text{gC.L}^{-1}$)	Fréquence d'occurrence (%)
Prymnesiophyceae						
<i>Phaeocystis globosa</i>	Phae	5	3102,8	2482,5	222,2	29,5
Cryptophyta						
<i>Plagioselmis prolonga</i>	Cryp	7	29,0	24,4	0,9	32,5
Dinophyta						
<i>Gymnodinium sp.</i>	Gymn	25	219,5	4,9	16,6	47,0
<i>Prorocentrum micans</i>	Pror		10,1	1,4	2,1	27,4
Chrysophyceae						
<i>Dictyocha speculum</i>	Dict	30	15,4	3,6	11,4	15,0
Bacillariophyta						
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	Agla	30	43,1	18,4	2,9	35,9
<i>Cerataulina pelagica</i>	Cera	40	91,9	26,6	12,9	30,8
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	Ccur	20	103,4	47,7	5,4	37,2
<i>Chaetoceros socialis</i>	Csoc	10	91,7	336,2	21,6	14,5
<i>Chaetoceros sp.</i>	Chae	10	210,3	62,7	0,4	59,0
<i>Coscinodiscus wailesii</i>	Cosc	150	181,6	1,4	31,5	31,6
<i>Cylindrotheca closterium</i>	Cyli	100	10,5	4,4	0,1	46,2
<i>Ditylum brightwellii</i>	Dity	130	44,1	4,7	3,8	41,5
<i>Eucampia zodiacus</i>	Euca	40	18,6	13,1	2,5	26,5
<i>Guinardia delicatula</i>	Gdel	40	471,3	45,8	7,2	75,2
<i>Guinardia flaccida</i>	Gfla	100	611,3	7,2	69,6	38,9
<i>Guinardia striata</i>	Gstr	140	286,0	41,5	12,4	51,3
<i>Lauderia annulata</i>	Laud	40	130,0	32,9	23,3	28,2
<i>Leptocylindrus sp.</i>	Lept	30	35,2	65,3	1,4	22,6
<i>Melosira nummuloides</i>	Melo	70	33,3	8,6	13,7	19,7
<i>Odontella sinensis</i>	Osin	100	17,0	2,9	21,9	11,5
<i>Paralia sulcata</i>	Para	15	74,5	15,5	0,9	61,5
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	Pdel	40	52,4	74,3	0,6	26,9
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i>	Pser	75	67,3	41,4	1,8	37,2
<i>Pseudo-nitzschia sp.</i>	Psnz	100	20,1	16,2	0,6	32,9
<i>Raphoneis amphiceros</i>	Rhap	50	151,8	3,2	4,5	72,6
<i>Rhizosolenia imbricata</i>	Rimb	350	340,9	26,0	12,9	59,0
<i>Rhizosolenia setigera</i>	Rset	150	24,7	8,2	1,4	39,7
<i>Skeletonema costatum</i>	Skel	20	47,6	30,7	1,0	37,2
<i>Thalassionema nitzschiooides</i>	Thaa	15	51,7	21,1	0,7	46,6
<i>Thalassiosira rotula</i>	Trot	50	115,7	16,6	11,3	38,0
<i>Thalassiosira sp.</i>	Thal	15	35,5	7,0	0,9	55,1

II.2. Variations et succession saisonnières

Au cours de la période 1992-2007, les valeurs d'abondance du phytoplancton ont varié de 700 cell.L⁻¹ à plus de 29.10⁶ cell.L⁻¹. En accord avec les concentrations en Chl *a* (**Fig. II.4**), les valeurs d'abondance les plus élevées (hormis quelques maxima estivaux) ont été enregistrées au printemps, entre mars et juin. L'espèce *Phaeocystis globosa* a été fréquemment responsable des fortes abondances entre mars et mai, avec des valeurs maximales (> 1.10⁶ cell.L⁻¹) souvent atteintes en avril (**Fig. II.6-A**). Les fortes concentrations en Chl *a* du mois de juin ont été principalement dues à l'abondance des diatomées (**Fig. II.6-B**). Les abondances de diatomées ont été souvent maximales au cours du mois de juin mais sont demeurées d'intensité plus modérée que celles de *P. globosa* (0,1-1.10⁶ cell.L⁻¹). Contrairement à *P. globosa* qui se développe rarement en dehors du printemps, les diatomées ont été présentes tout au long de l'année et leur période productive s'étend de février à octobre.

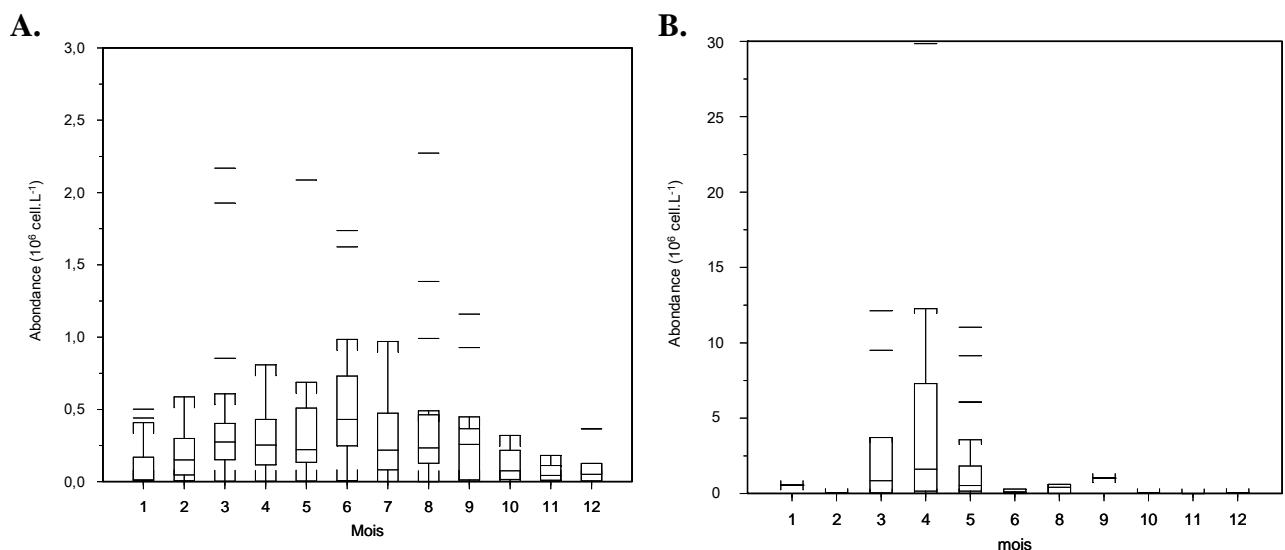


Figure II.6 : Boîtes de dispersion des valeurs d'abondance (10⁶ cell.L⁻¹) (A) des diatomées et (B) de *Phaeocystis globosa*. Données regroupées par mois toutes années confondues (1992-2007) et acquises à la station côtière de Boulogne-sur-Mer.

La succession saisonnière des communautés phytoplanctoniques a été examinée plus en détails à l'aide d'une analyse multivariée. La **Fig. II.7** montre les trois premiers axes d'une analyse factorielle réalisée sur les abondances moyennes par mois des espèces phytoplanctoniques dominantes (**Tableau II.1**). Ces trois axes expliquent 80% de la variance totale (le quatrième axe ne décrit que 8%).

Le plan d'ordination F1-F2 révèle une dispersion des observations dite en « fer à cheval » (**Fig. II.7-A**). Cette forme parabolique de la dispersion est liée à un effet de fortes contributions d'espèce le long des deux axes. L'axe F1 (42% de la variance totale) oppose très fortement deux espèces *Chaetoceros socialis* (Csoc ; 59% de la variance de l'axe F1) et *Phaeocystis globosa* (Phae ; 27%). *Chaetoceros socialis* est caractéristique du mois d'août, tandis que *Phaeocystis globosa* domine les mois de janvier à mai et de septembre (**Fig. II.7-C**).

L'axe F2 (24% de la variance totale) est également caractérisé par *Chaetoceros socialis* (Csoc ; 23% de la variance de l'axe F2) mais également par *Chaetoceros curvisetus* (Ccur ; 17%) et des Cryptophytes (Cryp ; 10%). La majorité des espèces sont répertoriées dans la partie négative de l'axe F2 et sont représentatives des mois d'été et d'automne-hiver. Cependant, les espèces les plus représentatives de cette période ne contribuent que faiblement à l'axe F2. Par exemple, *Odontella sinensis* (Osin) a été l'espèce principalement rencontrée au mois de novembre mais n'a contribué qu'à 1,3% de la variance de l'axe F2, en raison de sa faible abondance ($< 0,01 \cdot 10^6 \text{ cell.L}^{-1}$; **Tableau II.1**).

Le plan d'ordination F1-F3 met en évidence une dispersion des observations en trois groupes distincts (**Fig. II.7-B**). L'axe F3 (13 % de la variance totale) est caractérisé par *Paralia sulcata*, *Leptocylindrus sp.* et les Cryptophytes (16, 14 et 11% de contribution respective). L'axe F3 sépare alors les mois d'automne-hiver des mois de printemps-été (**Fig. II.7-D**).

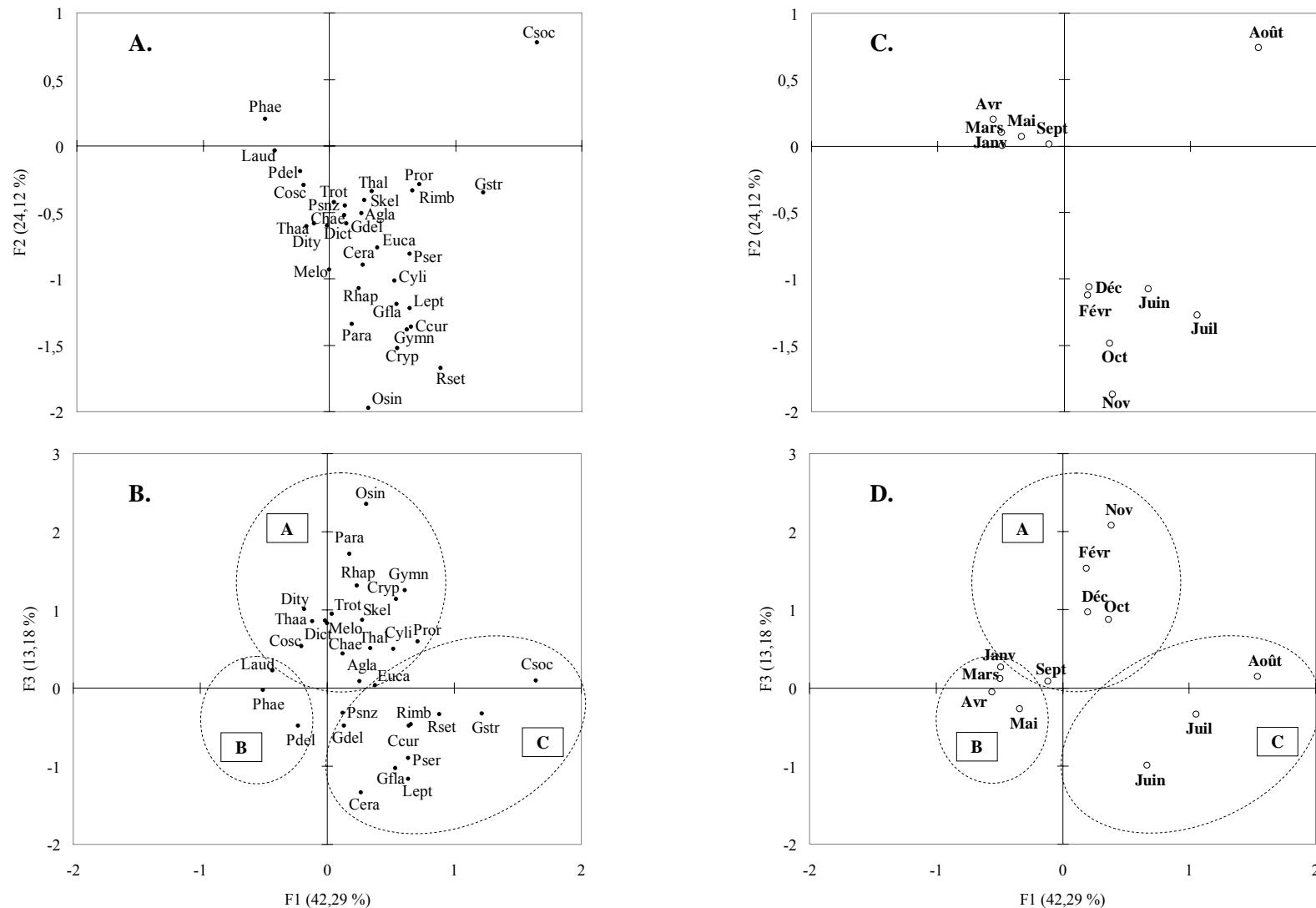
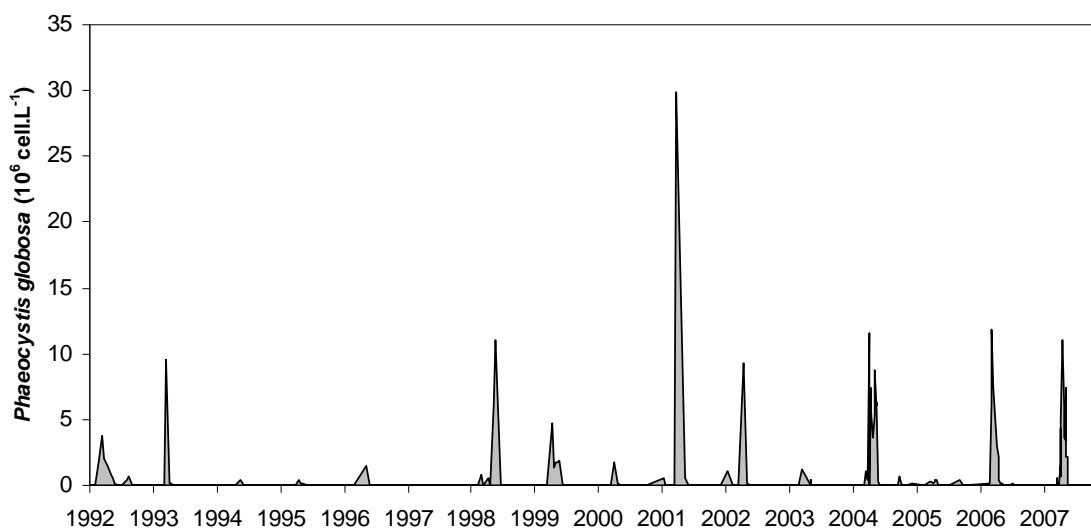


Figure II.7: Résultats de l'analyse factorielle des correspondances réalisée sur les abondances moyennes des espèces phytoplanctoniques principales (voir **Tableau II.1** pour les codes des espèces). Projections des observations (A) et des variables (C) dans le plan défini par les axes F1 et F2. Projections des observations (B) et des variables (D) dans le plan défini par les axes F1 et F3.

L'AFC met en évidence la succession saisonnière de trois assemblages phytoplanctoniques :

- **L'assemblage (A)** est caractéristique des mois de septembre à février. Il est composé essentiellement de diatomées avec (i) des espèces de grande taille ($> 100 \mu\text{m}$) telles que *Ditylum brightwellii*, *Odontella sinensis* et *Coscinodiscus wailesii*; (ii) des espèces tychopélagiques telles que *Rhaphoneis amphiceros*, *Paralia sulcata* et (iii) des espèces de petite taille ($< 100 \mu\text{m}$) telles que *Skeletonema costatum*, *Asterionellopsis glacialis*, *Thalassionema nitzschoides*, *Thalassiosira spp.*. Cet assemblage comprend également des espèces de flagellés tels que *Dictyocha speculum*, des Cryptophytes et des dinoflagellés (*Gymnodinium sp.* et *Prorocentrum sp.*).
- **L'assemblage (B)** est présent des mois de mars à mai et est composé de *Phaeocystis globosa* et des espèces de diatomées *Lauderia annulata* et *Pseudo-nitzschia delicatissima*.
- **L'assemblage (C)** est représentatif des mois de juin à août. Il est constitué d'espèces de diatomées des genres *Chaetoceros* (*Chaetoceros socialis* et *C. curisetus*), *Pseudo-nitzschia* (*Pseudo-nitzschia sp.* et *P. seriata*), *Guinardia* (*Guinardia delicatula*, *G. striata* et *G. flaccida*) et de genre associé (*Rhizosolenia imbricata* et *R. setigera*) ainsi que de *Eucampia zodiacus*, *Cerataulina pelagica* et *Leptocylindrus sp.*

A.



B.

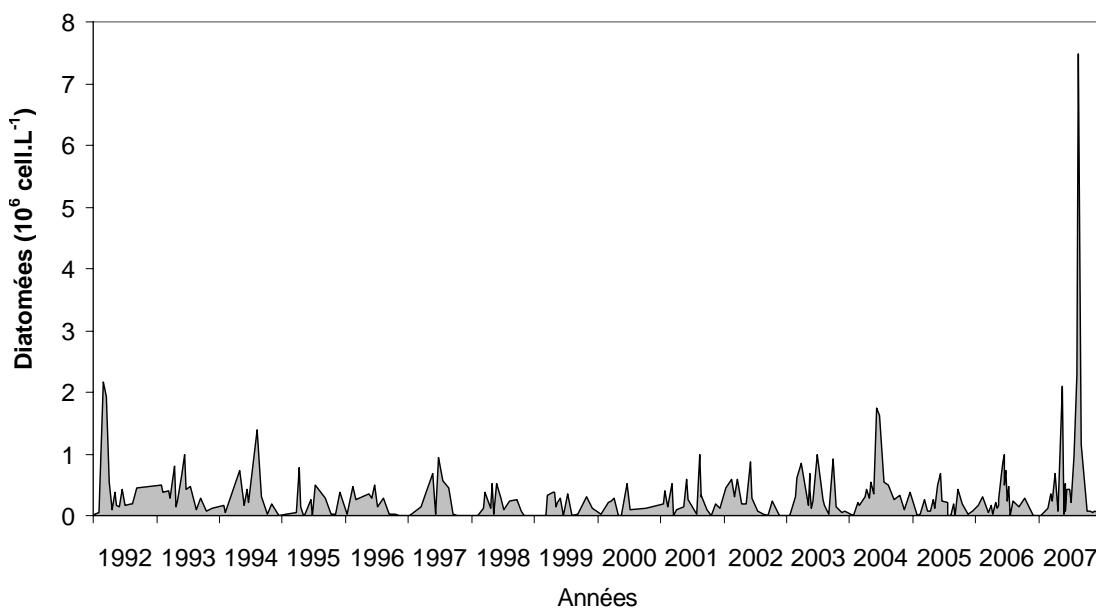


Figure II.8 : Evolution temporelle de l'abondance (10^6 cell.L^{-1}) de (A) *Phaeocystis globosa* et des (B) diatomées à la station côtière de Boulogne-sur-Mer de 1992 à 2007.

III.3. Variations et succession interannuelles

Depuis 1998, les abondances de *Phaeocystis globosa* ont été particulièrement élevées ($> 10.10^6$ cell.L $^{-1}$; **Fig. II.8-A**) mais elles sont caractérisées par une forte variabilité interannuelle. Les plus fortes abondances de diatomées ($> 1.10^6$ cell.L $^{-1}$) ont été observées en début de période (1992-1994) et en fin de période (2001-2007; **Fig. II.8-B**).

En terme de contribution à l'abondance phytoplanctonique totale, une succession marquée de dominance entre *Phaeocystis globosa* et les diatomées a eu lieu au cours des années 1990 (**Fig. II-9**): (i) les années 1992 et 1993 ont été caractérisées par une forte contribution de *Phaeocystis globosa* ($> 60\%$), (ii) la période 1994-1997 a été dominée par les abondances de diatomées et (iii) la période 1998-2002 a été de nouveau caractérisée par la dominance de *Phaeocystis globosa*. En revanche, la période 2003-2007 n'a pas présenté de dominance particulière et a été marquée par une forte alternance interannuelle entre *P. globosa* et les diatomées. Au cours de cette même période, une plus forte contribution de Cryptophytes a été observée, principalement depuis 2005.

Il faut noter que les plus fortes contributions de dinoflagellés ont été relevées au cours des années dominées par les diatomées.

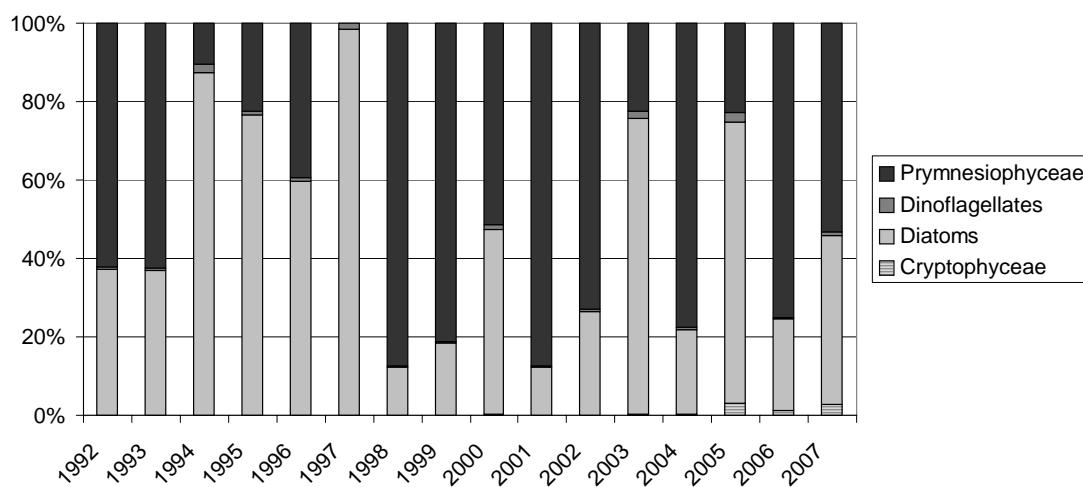


Figure II.9: Contributions des abondances moyennes annuelles des principaux groupes phylogénétiques à l'abondance du phytoplancton total: Prymnésiophycées, dinoflagellés, diatomées et Cryptophytes. Résultats issus de Lefebvre et al. (en préparation).

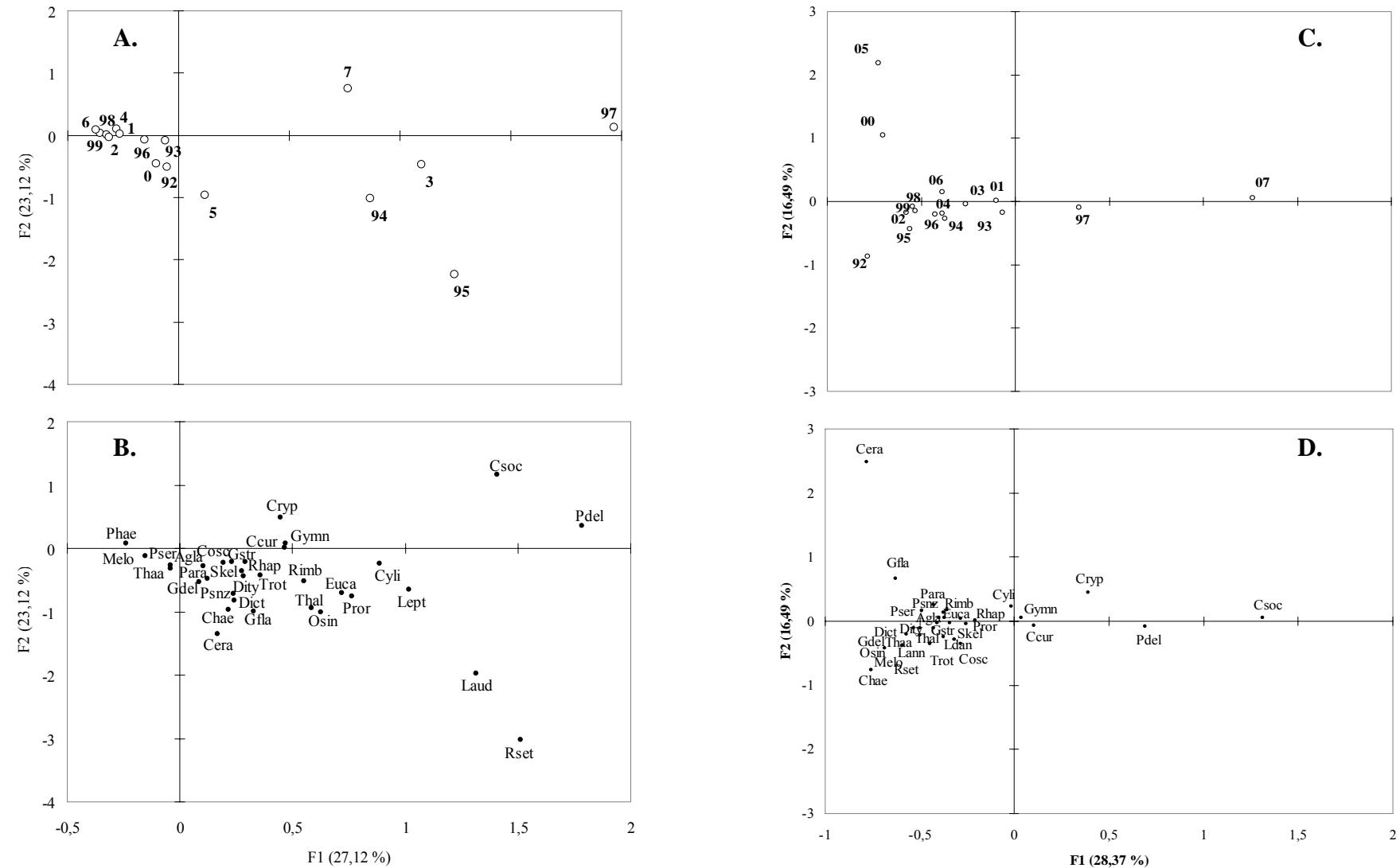


Figure II.10 : Résultats de deux analyses factorielles des correspondances réalisées sur les abondances annuelles moyennes des espèces phytoplanctoniques principales (voir **Tableau II.1** pour les codes des espèces). Projections des observations (A) et des variables (B) dans le plan défini par les axes F1 et F2, correspondant à l'AFC réalisée avec toutes les espèces. Projections des observations (C) et des variables (D) dans le plan défini par les axes F1 et F2, correspondant à l'AFC réalisée sans *Phaeocystis globosa*.

Afin d'étudier l'évolution interannuelle de la composition, une analyse factorielle a été réalisée à partir des moyennes annuelles des espèces dominantes (**Fig. II.10-A et B**). Le plan des deux premiers axes de l'AFC décrit 50% de l'inertie totale. La majorité des espèces est répartie dans la partie positive du premier axe (27% de la variance totale) qui oppose très fortement *Phaeocystis globosa* (16%) à *Chaetoceros socialis* (36%). Il est donc probable que l'axe F1 représente un gradient de dominance de *Phaeocystis globosa*. En effet, on retrouve les années à forte contribution de *Phaeocystis globosa* (Cf III.3.) du côté négatif de l'axe F1. Il est intéressant de constater que *Phaeocystis globosa* et *Pseudo-nitzschia delicatissima* appartenant au même assemblage saisonnier se retrouvent séparées le long de l'axe F1. L'axe F2 (23% de la variance totale) est structuré par l'opposition des diatomées *Chaetoceros socialis* (29%) et *Lauderia annulata* (21%), caractérisant les années 1997 et 1995, années à forte contribution de diatomées (Cf III.3.).

Une seconde analyse factorielle a été réalisée a posteriori en éliminant *Phaeocystis globosa* (**Fig. II.10-C et D**). En effet, les très fortes abondances de cette espèce masquent les tendances des autres composantes de la communauté. Les résultats de cette nouvelle analyse mettent en évidence une plus forte contribution de certaines espèces se développant préférentiellement en été au cours d'années particulières. : *Chaetoceros socialis* proche de 2007 (61% de la variance de l'axe F1) et *Cerataulina pelagica* proche de 2005 (75% de la variance de l'axe F2). (**Fig. II.10-C et II.10-D**).

Discussion

Les concentrations en sels nutritifs et en chlorophylle *a* enregistrées au site de Boulogne-sur-Mer, peuvent atteindre des valeurs proches de celles de sites eutrophisés tels que la zone côtière de la Baie Sud de la Mer du Nord (Lancelot et Billen, 1984 ; Rousseau et al., 2002 ; Tungaraza et al., 2003 ; Stelfox-Widdicombe et al, 2004). Cependant, le site de Boulogne-sur-Mer apparaît comme étant le moins riche au niveau nutritif et le moins productif en terme de biomasse phytoplanctonique en comparaison avec d'autres sites de la zone côtière française entre la Manche Orientale et la Mer du Nord (sites SRN de la Baie de Somme et de Dunkerque, Lefebvre et al., en préparation).

Les concentrations en sels nutritifs augmentent généralement le long des côtes à l'issue du mélange avec des eaux douces riches en sels nutritifs. En Mer du Nord, la zone côtière constitue la source principale en sels nutritifs, cependant l'Océan Atlantique peut également contribuer significativement aux apports en sels nutritifs (van Beusekom et Diel-Christiansen, 2009). Les concentrations en sels nutritifs régulièrement observées à Boulogne-sur-Mer se situent entre les valeurs observées en zone côtière de la Mer du Nord et celles de l'Océan Atlantique. La zone côtière de la Manche orientale apparaît comme un système intermédiaire, alimenté à la fois par le flux entrant d'eau provenant de l'Océan Atlantique et par les apports d'eau douce d'effluents importants (e.g. Seine et Somme).

Le cycle saisonnier des sels nutritifs et de la biomasse phytoplanctonique est caractéristique des milieux côtiers tempérés peu profonds et mélangés comme la Baie de Morlaix (Wafar et al, 1983) ou l'estuaire de l'Oosterschelde aux Pays-Bas (Vegter et De-Visscher, 1987). La consommation des stocks hivernaux de nitrates correspond au maximum de biomasse phytoplanctonique (Gentilhomme et Lizon, 1998), tandis que la consommation des phosphates et des silicates serait antérieure (**Fig. II.1**). En relation avec les rapports de Redfield et al. (1963) et de Brzezinski (1985), le site de Boulogne-sur-Mer apparaît principalement potentiellement limité en silice (**Fig. II.2**). Au printemps, une limitation potentielle par le phosphate est mise en évidence. Les mois d'été sont généralement caractérisés par de faibles rapports N : P indiquant une limitation potentielle de la croissance phytoplanctonique par l'azote (Pingree et al., 1977 ; Jordan et Joint, 1998).

Sur les 112 espèces répertoriées sur l'ensemble des 16 années d'échantillonnage, 32 espèces sont répertoriées comme dominantes en termes d'abondance, de biomasse et d'occurrence (**Tableau II.1**), toutes les autres espèces étant occasionnelles ou rares. Ces espèces dominantes sont majoritairement néritiques et appartiennent essentiellement au groupe des

diatomées. Elles ont déjà été répertoriées depuis un bon nombre d'années en zone côtière de la Manche orientale (Hédin-Bougard, 1980) ainsi que dans la Baie Sud de la Mer du Nord (Drebes, 1974). Certaines espèces sont tychopélagiques (*Paralia sulcata*, *Rhaphoneis amphiceros*) et sont indicatrices de la remise en suspension fréquente des espèces benthiques. Le bloom printanier a principalement lieu de mars à juillet (**Fig. II.3**) et correspond au développement de *Phaeocystis globosa* et des diatomées (**Fig. II.6**). Les dinoflagellés se développent préférentiellement en été.. Les résultats de l'analyse factorielle réalisée à l'échelle saisonnière (**Fig. II.7**) mettent en évidence la succession de trois assemblages. Le premier assemblage est composé d'un mélange d'espèces de diatomées tychopélagiques (i.e. *Paralia sulcata*), de diatomées de grande taille (i.e. *Odontella sinensis*) et de diatomées de petite taille (i.e. *Thalassiosira spp.*) et est présent en automne et en hiver. Le second assemblage correspond à *Phaeocystis globosa* accompagnée de la diatomée pennée de petite taille *Pseudo-nitzschia delicatissima* et apparaît au printemps. Le troisième assemblage dominé par des espèces de grande taille des genres *Rhizosolenia*, *Guinardia* et des espèces des genres *Pseudo-nitzschia* et de *Chaetoceros*. sont présentes au cours de l'été.

La plus forte influence sur les successions saisonnières phytoplanctonique est exercée par la disponibilité en sels nutritifs (Estrada et al., 1988). En particulier, la disponibilité en silice est reconnue pour influencer la succession des assemblages de diatomées (Del Amo et al., 1997 ; Rousseau et al., 2002). D'après Schapira et al. (2008), les blooms de *Phaeocystis globosa* induisent d'importants changements dans la structure des communautés phytoplanctoniques. L'épuisement des nitrates consécutif au bloom de *P. globosa* (Brunet et al., 1992 ; Gentilhomme et Lizon, 1998) favoriserait en particulier le développement d'espèces de petite taille telles que les espèces de *Pseudo-nitzschia* et de *Chaetoceros*.

Les résultats issus de la série de données du réseau de surveillance SRN révèlent des changements importants dans la biomasse (estimée à partir des concentrations en Chl *a*) et la composition phytoplanctonique. Deux périodes se distinguent par l'occurrence de blooms de forte biomasse : 1994-1995 et 1998-2007 étaient caractérisées par des concentrations maximales en Chlorophylle *a* comprises entre 14 et 30 µg.L⁻¹ (**Fig. II.5**). En dehors de ces périodes, la biomasse des blooms était considérablement réduite et n'excédait pas 10 µg.L⁻¹ de Chl *a*.

Les blooms enregistrés au cours de la période 1992-1997 étaient essentiellement dominés par des espèces de diatomées, tandis que *Phaeocystis globosa* était régulièrement responsable des blooms observés au cours de la période 1998-2002 (**Fig. II.9**). A partir de 2003, les blooms

étaient alternativement dominés par *P. globosa* et les diatomées. Au cours de cette étude à long terme, à l'issue de la fréquence d'échantillonnage utilisée, les blooms de *Phaeocystis globosa* n'ont pas constitué un phénomène récurrent chaque année. Il s'agirait de proliférations ponctuelles dont la fréquence semble avoir augmenté depuis la fin des années 90 (**Fig. II.8-A**). L'analyse factorielle réalisée à l'échelle interannuelle (**Fig. II.10**) met en évidence depuis la fin des années 90, des blooms d'espèces exceptionnelles telles que *Cerataulina pelagica* en 2005 et *Chaetoceros socialis* en 2007. Cette période est également caractérisée par une augmentation de l'abondance d'espèces potentiellement toxiques telles que *Pseudo-nitzschia seriata* et *Gymnodinium sp.*

Les sels nutritifs sont pré-requis pour le développement d'une forte biomasse phytoplanctonique. L'occurrence des blooms coïncide avec des concentrations hivernales relativement élevées en DIN et en silicates (**Fig. II.4-A et B**). Dans la zone d'étude, Gomez et Souissi (2008) ont fait état d'un lien entre l'intensité de l'eutrophisation et la fréquence des blooms. Les auteurs ont également observé une diminution progressive de l'intensité des blooms entre 1998 à 2005. Or les concentrations en Chl *a* enregistrées dans cette étude ont présenté une tendance à l'augmentation à partir de 1998 (Fig. II.5). Ces observations soulignent (i) le caractère local de la variabilité de la biomasse phytoplanctonique et (ii) l'importance de la stratégie d'échantillonnage, nécessitant non seulement un resserrement du pas d'échantillonnage au cours de l'année mais également un suivi à plus long terme.

Ce changement de régime coïncide avec une augmentation progressive des rapports stoechiométriques de sels nutritifs (e.g. N : P : Si) liée principalement à la diminution des concentrations en phosphates. En particulier, les fortes concentrations de *Phaeocystis globosa* coïncident avec une augmentation des rapports N : P (> 16). La relation entre l'intensité du bloom et les stocks hivernaux de nitrates est relativement connue (Lancelot et Mathot, 1987 ; Breton et al., 2000). Cependant, *Phaeocystis globosa* possède un avantage compétitif lorsque les conditions sont limitées en phosphore. *Phaeocystis* est capable de se développer sur des substrats riches en phosphore organique grâce à la production d'enzymes phosphatasées alcalines (Veldhuis et Admiraal, 1987).

La limitation en ressource altère l'échelle des taux métaboliques, résultant en une diminution de la taille des cellules phytoplanctoniques (Finkel, 2001 ; Finkel et al., 2004). La limitation en sels nutritifs provoque ainsi une modification importante dans la structure de taille des communautés évoluant vers la dominance de petites formes comme les flagellés (stratège « r » selon Margalef, 1978 ; ou « C » selon Reynolds et Smayda, 1998; Smayda et Reynolds, 2001) pour lesquelles un rapport surface/volume élevé, facilite l'absorption et l'assimilation

des sels nutritifs et réduit le temps de développement (Kiorboe, 1995 ; Agawin et al., 1998). De plus, les diatomées le plus souvent estivales des genres *Guinardia*, *Rhizosolenia* et *Pseudo-nitzschia* sont faiblement silicifiées (Rousseau et al., 2002) et présentent un rapport surface/volume élevé en raison de leur forme allongée. Ces espèces apparaissent particulièrement adaptées à de faibles concentrations en silicates et des forts blooms ont déjà été rapportés en particulier sous des conditions limitantes en silice (Del Amo et al., 1997 ; Fehling et al., 2004).

Des changements drastiques dans la structure des communautés phytoplanctoniques ont été observés en zone côtière allemande, à la fin des années 70 et 80 (Philippart et al., 2000). Ces périodes coïncidaient avec des changements dans les concentrations absolues et relatives en nitrates et en phosphates. D'après Tyrrell (1999), les nitrates constituaient des nutriments limitant de proximité (proximate limiting nutrient ; PLN) déterminant la croissance immédiate du phytoplancton, tandis que les phosphates seraient des nutriments limitant ultimes (ultimate limiting nutrient ; ULN) dont le taux d'apport forcerait la productivité totale du système sur le long terme.

En conséquence, les sels nutritifs sont souvent considérés comme le facteur clé contrôlant la succession phytoplanctonique et le succès des espèces (Rees et al., 1999). Cependant le statut nutritif n'est pas un facteur suffisant pour expliquer le changement de dominance au cours du bloom printanier. Le développement de *Phaeocystis globosa* requiert une augmentation de la stratification et de la lumière (Peperzak, 1993 ; Peperzak et al., 1998). Dans les zones côtières peu profondes du Nord de l'Europe, la croissance phytoplanctonique est contrôlée par une co-limitation entre la lumière et les sels nutritifs (Loebl et al., 2009). Dans de nombreux sites, la limitation par la lumière excéderait même celle des sels nutritifs (Colijn et Cadée, 2003) et influencerait significativement la phénologie³⁷ des blooms phytoplanctoniques (Iriarte et Purdie, 2004). La disponibilité en lumière et en sels nutritifs dans la colonne d'eau dépend directement des conditions hydrodynamiques et des changements climatiques. Drinkwater et al. (2003), la NAO influencerait la variabilité interannuelle du phytoplancton par l'intermédiaire des conditions hydrodynamiques (mélange/stratification). Dans la zone d'étude, l'importance du forçage climatique relatif à l'oscillation de la NAO sur la composition phytoplanctonique a déjà été démontré (Irigoin et al., 2000 ; Seuront et Souissi, 2002). Depuis les années 80, l'indice NAO hivernal est dans une phase positive caractérisée par des températures plus élevées. Cette augmentation de température stimule directement le

³⁷ La phénologie est l'étude de l'apparition d'événements périodiques (annuels le plus souvent) dans le monde vivant, déterminée par les variations saisonnières du climat.

développement des flagellés et aussi indirectement, en augmentant la stratification de la colonne d'eau en été (Edwards et Richardson, 2004). Ceci expliquerait en particulier le succès des espèces estivales au cours des dernières années du suivi. Cependant l'indice NAO révèle une importante variabilité interannuelle caractérisée par de brusques changements comme observés au cours des hivers 95-96 et 00-01.

La dynamique des blooms phytoplanctoniques en zone côtière est soumise à des sources variées de variabilité. L'environnement nutritif du phytoplancton en zone côtière est modifié à la fois quantitativement et qualitativement par les sources anthropiques de nutriments apportés par l'intermédiaire des rivières et/ou des dépôts anthropiques (e.g. Lancelot et al., 1991 ; Paerl, 1995). Cette altération constitue le principal facteur de contrôle après les changements naturels (Cadée, 1986 ; Hickel, 1998 ; Breton et al., 2006). Cependant, la distinction entre les effets des variations induites par l'homme, de ceux attribués à la variation naturelle est difficile d'accès (Colijn, 1998 ; Breton et al., 2006). Le changement observé dans le cadre de cette étude à la fin des années 90, soulignerait l'existence d'un cycle décennal de la composition phytoplanctonique (Philippart et al., 2000), concomitant au changement de biomasse contrôlé par le forçage hydroclimatique (Edwards et al., 2001). Deux changements majeurs dans la tendance de l'abondance du phytoplancton et du zooplancton sont connus en Mer du Nord et en Océan Atlantique à la fin des années 70 et 80 (Edwards et al., 2002 ; Reid, 2005). Ils coïncident avec deux événements extrêmes concernant les facteurs hydro-climatiques. A la fin des années 70 et au début des années 80, la Mer du Nord a été caractérisée par un flux entrant de l'Atlantique réduit, diminuant la salinité et la température et produisant une période de conditions boréales. A la fin des années 80, une augmentation du flux entrant d'eau chaude et plus salée a influencé la Mer du Nord. Van Beusekom et Diel-Christiansen (2009) ont mis en évidence que ces changements étaient observés dans de nombreuses séries de données biologique et physico-chimiques en Mer du Nord. Weijerman et al. (2005) ont également souligné l'existence d'un troisième changement hydroclimatique possible à la fin des années 1990. La série de 15 ans de données présentée ici peut paraître insuffisante pour appréhender une cyclicité dans les séries temporelles du phytoplancton. Cependant, les résultats de cette étude mettent en évidence la récurrence d'un schéma de succession à différentes échelles temporelles. Les cycles peuvent intervenir à différentes échelles temporelles au sein de données phytoplanctoniques (Smayda, 1998) et la continuité de cette série permettra de vérifier la récurrence des changements observés à cette échelle d'observation. Dans le cadre de cette étude, l'analyse de la variabilité interannuelle des

blooms phytoplanctoniques n'a pas été approfondie en raison d'un manque de résolution mis en évidence au cours de certaines années (conditions météorologiques ayant empêché le maintien du rythme bi-mensuel à mensuel surtout au printemps). Il serait alors intéressant d'analyser plus finement la variabilité des communautés phytoplanctoniques au cours de leur période productive en adoptant une stratégie d'analyse resserrant la fréquence de prélèvement.

CHAPITRE III

Succession saisonnière des communautés phytoplanctoniques, au cours du printemps, en zone côtière de la Manche orientale

Introduction

Le suivi régulier des communautés phytoplanctoniques en Manche orientale a démarré dans les années 1990 avec la mise en place de réseaux de surveillance opérés par l’Ifremer (SRN et REPHY; Cf Chapitre II) et d’observation (SOMLIT-INSU). L’analyse des données hydrobiologiques disponibles dans le cadre du réseau SRN a notamment démontré une importante variabilité spatiale, saisonnière et pluriannuelle (Cf Chapitre II et Lefebvre et al., en préparation.) et a confirmé certains résultats de travaux effectués antérieurement sur le site (Seuront et Souissi, 2002 ; Gomez et Souissi, 2008) ou en Mer du Nord (Breton et al., 2006). Une des observations majeures de ce travail souligne l’importance de la fréquence d’échantillonnage pour la caractérisation de la variabilité à l’échelle interannuelle. En effet, pour certaines communautés phytoplanctoniques, les taux de croissance peuvent être supérieurs à la journée comme *Phaeocystis globosa* (Veldhuis et al., 2005) et les échelles d’observation actuelles des réseaux de surveillance et d’observation (mensuelle à bi-hebdomadaire) ne permettent pas de rendre compte de cette variabilité (Dubelaar et al., 2004). De plus, les mécanismes forçant cette variabilité sont encore mal connus.

Comme évoqué dans le Chapitre II, les blooms d’algues potentiellement toxiques et nuisibles (e.g. *Pseudo-nitzschia seriata*, *Gymnodinium sp.*, *Phaeocystis globosa*) sont de plus en plus récurrents depuis cette dernière décennie et nécessitent l’identification des causes des changements observés afin de prédire les tendances futures. Les forçages météorologiques influencent la variabilité interannuelle des communautés phytoplanctoniques, en particulier sur le site d’étude (Irigoin et al., 2000 ; Seuront et Souissi, 2002 ; Gomez et Souissi, 2008). Dans les eaux côtières peu profondes et mélangées, l’impact des facteurs météorologiques s’opère sur les conditions de lumière et nutritives qui constituent les principaux paramètres régulant la croissance phytoplanctonique (Cloern, 1999 ; Colijn et Cadée, 2003).

Comprendre la dynamique globale d'un compartiment biologique passe par l'étude de la variabilité temporelle à des échelles d'observations plus pertinentes. Pour étudier plus précisément la structure et la dynamique des communautés phytoplanctoniques au cours des blooms printaniers en Manche Orientale, des échantillons ont été collectés en surface au niveau d'une station côtière localisée au large d'Ambleteuse (point R1 ; Cf Chapitre I § I.2.), sur une base hebdomadaire à journalière, au cours des printemps 2005, 2006 et 2007. Cette station est représentative de la masse d'eau côtière (Lamy, 2006) intégrant l'ensemble des apports fluviaires (e.g. Somme, Authie, Canche, Liane et Wimereux) et dérivant vers le détroit du Pas-de-Calais (Brylinski et al., 1991).

Notre objectif principal est de décrire la variabilité temporelle des communautés phytoplanctoniques au cours du bloom printanier, en relation avec les conditions physico-chimiques. Le travail s'inscrit au cours de trois années consécutives, dans le but de comprendre le déterminisme de ces changements et permettre d'éclairer les différences observées à l'échelle interannuelle à court (trois ans) et long terme (plus de 10 ans, Cf. Chapitre II). Cette problématique s'articulera en trois phases : (i) la caractérisation de la variabilité des communautés phytoplanctoniques et du contexte environnemental au cours du printemps, (ii) la détermination des facteurs responsables des blooms observés et (iii) la structure écologique des communautés phytoplanctoniques rencontrées au printemps.

I. Contexte environnemental

I.1. Conditions météorologiques et hydrographiques

Les températures atmosphériques moyennes mensuelles observées entre janvier et mars ont été caractéristiques des conditions hivernales (**Tableau III.1** ; 4-8°C en moyenne). Une augmentation significative des températures (+3-4°C) a été observée au cours du mois d'avril et s'est poursuivie progressivement jusqu'en été. L'année 2006 a été remarquable par rapport aux autres années en raison (i) de températures hivernales moyennes plus froides (4°C) et (ii) de températures estivales moyennes plus chaudes (20°C) (**Tableau III.1**).

Les vents influencent significativement la masse d'eau côtière selon leur direction et leur vitesse. Ainsi il est reconnu que les vents de secteur Nord-Est augmentent l'influence continentale sur la masse d'eau en Manche orientale, tandis que ceux de secteur Sud-Ouest augmentent le flux entrant des eaux Atlantiques dans le Détrict du Pas-de-Calais (Pingree et Griffiths, 1980 ; Salomon et Breton, 1991). Le régime des vents a montré une importante variabilité interannuelle au cours de la période d'échantillonnage (**Tableau III.1**). En 2006, le printemps a été majoritairement sous la dominance de vents de nord-est à l'exception des mois d'avril et de mai. A l'inverse, l'année 2007 s'est caractérisée par une dominance de vents de secteurs sud et ouest à l'exception des mois de février et d'avril, sous dominance de vents de nord-est. En revanche, le printemps 2005 a été marqué par une alternance de périodes dominées par les vents de nord-est (février et juin-juillet) et de périodes dominées par les vents de sud-ouest (janvier et mars-mai).

Les précipitations se sont réparties tout au long de la période considérée sans présenter d'évolution particulière (**Tableau III.1**). En terme de bilan hydrique, le printemps 2006 a été le plus pluvieux (319 mm), contrairement au printemps 2005 (135 mm). Les mois les plus humides ont été mai 2006 et juillet 2007. Aucune relation claire entre le régime de vent et les précipitations n'a pu être mis en évidence.

La Somme est l'un des principaux fleuves alimentant la masse d'eau côtière de la Manche orientale (Loquet et al. 2000). Au cours du printemps, l'évolution du débit de la Somme consistait en une dynamique saisonnière classique avec des débits maximaux enregistrés entre les mois de février et d'avril, suivis d'une diminution progressive jusqu'en été (**Tableau III.1**). Les débits de la Somme les plus forts enregistrés en avril 2005 ($29,4 \pm 1,6 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) et en mai 2006 ($30,4 \pm 2,0 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), ont été cependant plus faibles que les débits maximaux enregistrés en 2007.

Tableau III.1 : Paramètres hydrodynamiques et météorologiques. Moyennes mensuelles des débits de la Somme et de la Liane ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$), de la température de l'air ($^\circ\text{C}$), des précipitations (mm) et des rapports mensuels des vents sur le site d'Ambleteuse en 2005, 2006 et 2007. (Données issues de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie et de Météo France).

Période	Débit Somme ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$)	Débit Liane ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$)	Température air ($^\circ\text{C}$)	Précipitations (mm)	(N+E):(S+W)
2005					
Janvier	$27,8 \pm 1,2$	$2,4 \pm 0,8$	7 ± 3	16	0,7
Février	$29,0 \pm 2,1$	$2,5 \pm 1,4$	4 ± 3	6	5,5
Mars	$28,3 \pm 1,1$	$2,0 \pm 1,2$	7 ± 4	12	1,0
Avril	$29,4 \pm 1,6$	$2,1 \pm 1,8$	10 ± 3	36	0,9
Mai	$26,8 \pm 1,6$	$1,3 \pm 0,5$	12 ± 3	22	0,6
Juin	$22,3 \pm 1,8$	$0,8 \pm 0,2$	16 ± 4	9	1,7
Juillet	$24,2 \pm 4,4$	$0,7 \pm 0,3$	16 ± 2	34	1,3
2006					
Janvier	$24,8 \pm 0,7$	$2,0 \pm 1,0$	4 ± 3	28	3,7
Février	$27,5 \pm 4,6$	$2,7 \pm 2,0$	4 ± 2	68	3,2
Mars	$30,4 \pm 2,0$	$1,8 \pm 0,7$	5 ± 4	35	1,8
Avril	$28,2 \pm 1,5$	$1,3 \pm 0,4$	9 ± 2	23	0,7
Mai	$30,6 \pm 2,6$	$2,0 \pm 1,4$	12 ± 2	125	0,6
Juin	$26,3 \pm 2,6$	$1,0 \pm 0,3$	16 ± 4	24	2,6
Juillet	$21,1 \pm 2,0$	$0,7 \pm 0,1$	20 ± 3	16	1,2
2007					
Janvier	$30,6 \pm 1,7$	$3,5 \pm 1,2$	8 ± 3	20	0,3
Février	$37,0 \pm 5,7$	$2,9 \pm 1,6$	7 ± 2	22	1,3
Mars	$41,0 \pm 2,0$	$3,4 \pm 2,1$	8 ± 2	22	0,8
Avril	$35,8 \pm 3,0$	$1,2 \pm 0,1$	12 ± 2	0	2,5
Mai	$32,5 \pm 1,6$	$1,0 \pm 0,3$	13 ± 2	22	0,9
Juin	$34,2 \pm 2,3$	$1,3 \pm 1,2$	15 ± 2	79	0,6
Juillet	$33,6 \pm 2,2$	$2,7 \pm 2,3$	16 ± 1	123	0,2

Le débit de la Liane illustre plus particulièrement la dynamique du bassin hydrographique local. Le débit a diminué de manière générale au cours du printemps (**Tableau III.1**), mais a été caractérisé par des augmentations ponctuelles et rapides ($\pm 4\text{-}10 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$). La majorité de ces décharges étaient consécutives à d'importantes précipitations. Plusieurs événements ont été enregistrés chaque année entre février et mars et entre mai et juillet, pouvant réapprovisionner la masse d'eau côtière en apports fluviatiles.

I.2. Conditions hydrologiques de surface

I.2.1. Température et salinité

La période printanière coïncide avec le réchauffement de la masse d'eau, conduisant à une augmentation graduelle de la température de 1 à 3°C par mois (**Tableau III.2**). L'évolution des températures enregistrées au cours des années 2005 et 2006 a été similaire avec une augmentation de 5,1°C en mars à 17,0°C en juillet (**Fig III.1-A**). En 2007, la température a été régulièrement plus élevée pour une date donnée (+ 2°C), avec un écart maximal de température (+ 5°C) enregistré en fin de période hivernale (**Fig III.1-A**).

La salinité s'est caractérisée par une importante variabilité au cours de chaque période d'échantillonnage (**Tableau III.2**). Des diminutions ponctuelles ont été observées (**Fig III.1-B**) (i) du 11/04 au 25/04 en 2005 (-1,32 psu) ; (ii) du 04/04 eu 14/04 en 2006 (-0,84 psu) ; (iii) du 19/02 au 13/03 (-0,67 psu), du 26/03 au 03/04 (-0,89 psu), du 02/05 au 15/05 (-0,83) et du 18/06 au 11/07 (-0,70 psu) en 2007.

Certaines de ces diminutions étaient probablement liées à des événements de mélange avec des eaux de plus faible salinité, en particulier provenant des fleuves locaux (*e.g.* le Wimereux et la Liane). Les diminutions ont été en moyenne de 0,9 psu. Considérant une salinité moyenne de 34 psu pour la masse d'eau côtière et de 10 psu pour les eaux estuariennes, l'événement de mélange représente un apport d'eau douce de 3,75 L pour 100 L de masse d'eau.

Tableau III.2 : Moyennes mensuelles (écart-type) des paramètres environnementaux mesurés au cours des suivis printaniers de 2005 à 2007, à la station côtière R1 du site d'Ambleteuse.

(A) Conditions hydrologiques de surface (T, Température ; S, Salinité) ; (B) Conditions hydrologiques dans la colonne d'eau (PAR, luminosité moyenne ; cD, gradient vertical de densité ; K, coefficient d'atténuation) ; (C) Conditions biologiques (Chla, chlorophylle *a*; COD, carbone inorganique dissous) ; (D) Conditions chimiques (DIN, nitrate + nitrite ; NH4, ammonium ; PO4, phosphate, SiOH, silicate ; $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Années	Paramètres	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet
A.							
2005	T	4,1	x	8,40 (0,99)	11,55 (1,48)	13,80	x
	S	34,4	34,20	34,03 (0,28)	34,05 (0,07)	34,20	x
2006	T	x	5,87 (1,11)	9,21 (0,88)	12,96 (1,46)	14,69 (1,02)	17,40
	S	x	34,33 (0,18)	34,14 (0,36)	33,54 (1,10)	34,05 (0,38)	32,01
2007	T	8,47	8,97 (0,19)	10,05 (0,71)	13,39 (0,67)	15,72 (0,88)	16,96
	S	34,29	33,56 (0,37)	33,72 (0,33)	33,89 (0,49)	34,25 (0,21)	33,89
B.							
2005	PAR	238	206 (189)	308 (283)	196 (160)	x	x
	cD	9,24	0,85 (3,97)	0,08 (1,35)	0,03 (1,95)	x	x
	K	0,59	0,59 (0,45)	0,36 (0,13)	0,31 (0,08)	x	x
2006	PAR	x	39 (35)	69 (44)	322 (358)	124 (141)	437,00
	cD	x	9,38 (6,61)	5,44 (5,61)	6,50 (8,78)	0,24 (2,70)	16,59
	K	x	0,57 (0,14)	0,48 (0,12)	0,39 (0,22)	0,40 (0,01)	0,48
2007	PAR	x	91 (63)	193 (100)	99 (84)	x	x
	cD	0,76	4,68 (6,38)	6,36 (9,97)	1,73 (3,55)	x	x
	K	x	0,35 (0,05)	0,54 (0,14)	0,42 (0,17)	x	x
C.							
2005	Chla	0,73	3,74 (1,49)	3,37 (0,92)	3,10 (4,12)	4,88	x
	COD	397,15	147,96 (21,02)	130,67 (19,62)	144,74 (48,90)	x	x
2006	Chla	x	10,12 (4,88)	6,08 (1,78)	4,99 (3,78)	5,03 (0,53)	4,87
	COD	x	107,97 (19,50)	200,02 (79,83)	120,78 (16,51)	x	x
2007	Chla	1,04	6,93 (2,60)	9,29 (2,29)	5,38 (4,43)	2,25 (0,64)	1,66
	COD	174,25	181,67 (33,44)	214,27 (32,83)	369,49 (53,13)	x	x
D.							
2005	DIN	3,06	x	7,31 (6,95)	5,32 (0,01)	0,67	x
	PO4	0,4	x	0,46 (0,46)	0,32 (0,02)	0,06	x
	SiOH	1	x	2,33 (3,27)	0,57 (0,05)	0,06	x
2006	DIN	x	8,29 (13,09)	0,39 (0,22)	2,32 (2,16)	0,28 (0,32)	x
	PO4	x	0,49 (0,03)	1,48 (0,87)	0,92 (0,87)	0,28 (0,06)	x
	SiOH	x	6,50 (7,21)	2,71 (0,40)	1,46 (0,70)	1,30 (0,61)	x
2007	DIN	x	17,49 (5,43)	6,55 (4,07)	0,38 (0,29)	0,08 (0,01)	x
	NH4	x	0,60 (0,16)	1,25 (1,13)	0,60 (0,37)	0,33 (0,05)	x
	PO4	x	0,27 (0,22)	0,27 (0,33)	0,22 (0,11)	0,17 (0,03)	x
	SiOH	x	4,17 (3,31)	2,09 (0,29)	2,19 (0,28)	2,45 (0,59)	4,06

x pas de données

I.2.2. Conditions chimiques et biologiques

Les concentrations en sels nutritifs de la station R1 sont à prendre en considération avec précaution, en raison (i) d'un faible échantillonnage en période hivernale³⁸ (et plus précisément en période hivernale précédant les blooms phytoplanctoniques), (ii) d'une absence d'analyse de l'ammonium en 2005 et 2006 (**Fig. III.1-C et III.1-F**). Afin de combler certains manques d'informations à notre station R1, nous faisons également référence aux données d'une station côtière du réseau SOMLIT, située à 10 km au sud du site d'étude (Point C, 50°40'75N-1°31'17E; **Annexe 4**). Cette station a été choisie comme point de comparaison en raison de la périodicité de 15 jours des prélèvements, plus élevée que celle employée à la station SRN1. De plus, les concentrations en chlorophylle *a* et en sels nutritifs présentaient des dynamiques similaires. Cependant, les stocks hivernaux de sels nutritifs se sont révélés plus importants à la station R1 qu'à la station SOMLIT. Cette différence de concentrations pourrait s'expliquer par la différence de profondeur de la colonne d'eau entre les deux stations : ~ 20 m à la station R1 et >25 m à la station SOMLIT.

Au cours de la période d'échantillonnage, les teneurs les plus élevées en sels nutritifs enregistrées en fin de période hivernale ont coïncidé avec des valeurs faibles de biomasse phytoplanctonique (**Tableau III.2**). Inversement, les teneurs les plus faibles observées entre mars et avril correspondaient aux valeurs maximales de biomasse phytoplanctonique, traduisant l'épuisement du milieu par le bloom phytoplanctonique.

Dès le début de l'échantillonnage, certaines concentrations en sels nutritifs apparaissaient déjà en voie de diminution, voire étaient très faibles. Ceci concernait particulièrement les concentrations en phosphates de 2005 et 2006 (**Fig. III.1-F**; 0,5 µmol.L⁻¹), en silicates en 2005 et en ammonium de 2007 (**Fig. III.1-C**; 0,7 µmol.L⁻¹). Cette période a coïncidé notamment avec une augmentation des concentrations en Chl *a*, dès le mois de mars (**Fig. III.1-G**). A titre de comparaison, les teneurs enregistrées à la station SOMLIT entre janvier et février (**Annexe 4**) ont été relativement élevées en silicates (9,6-11,6 µmol.L⁻¹), en nitrates + nitrites (DIN³⁹; 11,4-17,3 µmol.L⁻¹), en ammonium (0,5-2,2 µmol.L⁻¹) et en phosphates (0,4-0,8 µmol.L⁻¹) indiquant que les conditions nutritives étaient propices chaque année au développement phytoplanctonique.

³⁸ Une seule campagne a pu être réalisée chaque année entre fin février et début mars, en raison de conditions météorologiques défavorables à la navigation.

³⁹ Le terme de DIN (Dissolved Inorganic Nitrogen) est utilisé ici pour qualifier les concentrations de nitrates et de nitrites. Il n'inclut pas l'ammonium car cet élément n'a été analysé qu'au cours de 2007.

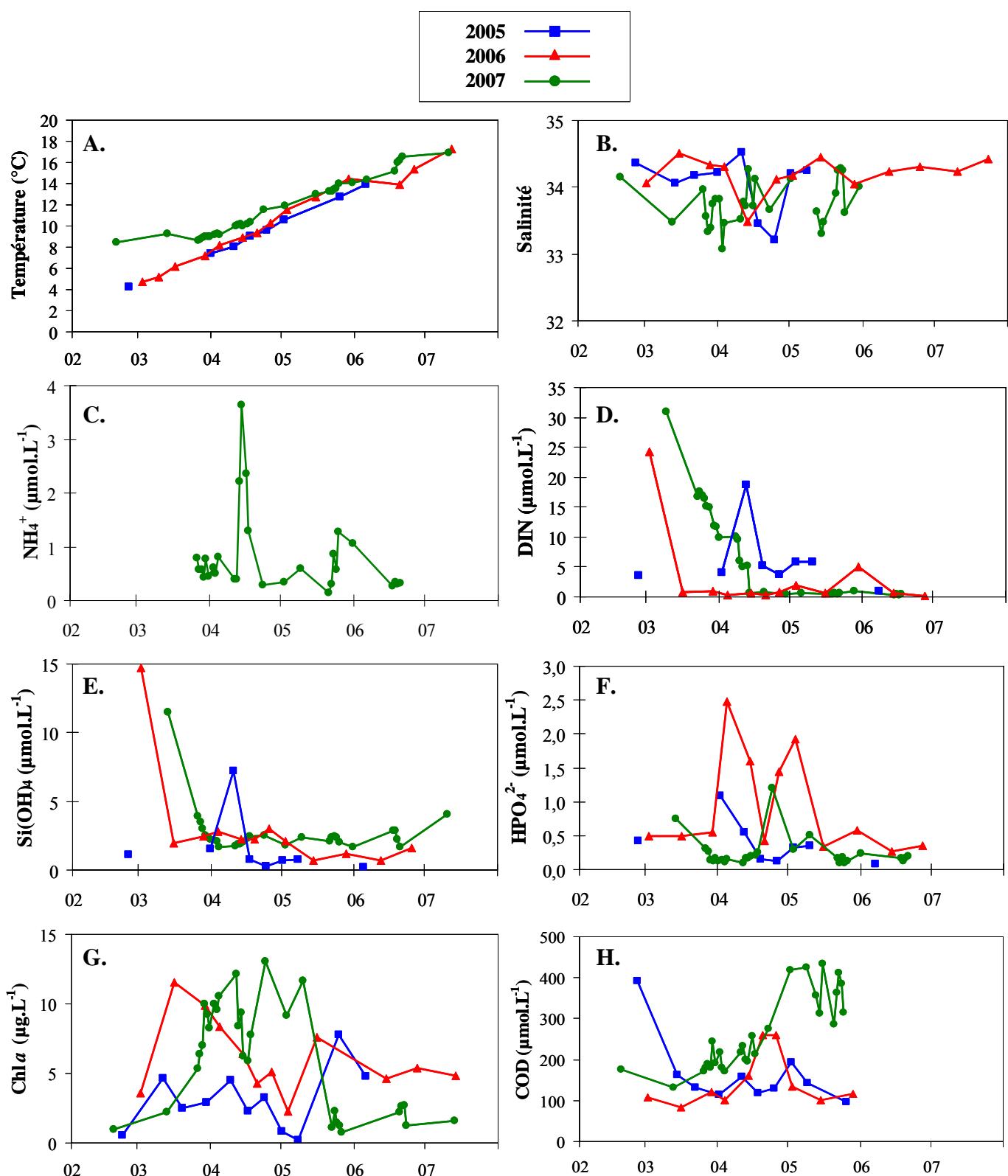


Figure III.1 : Variations temporelles entre Février et Juillet 2005-2007 de (A) la température ($^{\circ}\text{C}$) ; (B) la salinité (PSU) ; des concentrations en sels nutritifs ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) ; (C) ammonium (NH_4^+) ; (D) nitrate + nitrite (« DIN ») ; (E) silicate (Si(OH)_4) ; (F) phosphate (HPO_4^{2-}) ; (G) des concentrations en chlorophylle *a* (Chl *a* ; $\mu\text{g.L}^{-1}$) ; et (H) des concentrations en carbone organique dissous (COD ; $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Les données d'ammonium ne sont disponibles que pour l'année 2007.

Chaque année, les stocks de silicates n'ont pas été totalement épuisés ($> 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) contrairement à ceux des DIN et des phosphates. En général, la diminution des stocks d'ammonium, de phosphates et de silicates a eu lieu en premier, suivie par celle des DIN, à l'exception du printemps 2006 où la diminution des stocks de sels nutritifs a été simultanée et coïncidait avec l'augmentation précoce des teneurs en Chl *a* (**Fig. III.1-G**).

A la suite de la diminution des stocks de sels nutritifs, nous avons observé des augmentations importantes en ammonium (**Fig III.1-C** ; jusqu'à $2,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et en phosphates (**Fig. III.1-F** ; jusqu'à $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en 2006 et $1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en 2007). Ces augmentations coïncideraient avec une période d'importante activité bactérienne reliée au bloom phytoplanctonique (Artigas L. F., com. pers.), comme indiquée par la dynamique des concentrations de COD (**Fig III.1-H**).

D'autres augmentations ont été observées dans la dynamique des concentrations de DIN et d'ammonium, également présentes à la station SOMLIT. Ces augmentations correspondaient à certaines périodes de diminution de la salinité (**Fig III.1-B**), traduisant d'importants apports fluviaitiles consécutifs à de fortes précipitations. En effet, des débits relativement importants par rapport à la moyenne annuelle des cours d'eau locaux (*i.e.* Liane) ont été enregistrés (i) entre le 12 avril et le 5 mai 2005, (ii) entre le 5 mai et le 18 juin 2006 et (iii) du 23 juin jusqu'à la fin du suivi 2007. Par conséquent, des augmentations des concentrations en DIN et ammonium ont été observées (i) du 24 avril au 9 mai 2005, (ii) du 15 mai au 29 mai 2006 et (iii) du 21 mai au 25 mai 2007.

Les principaux changements de concentrations en sels nutritifs reflètent les développements de la biomasse phytoplanctonique. Au cours de chaque printemps, la dynamique saisonnière de la Chl *a* a consisté en deux pics successifs. Un premier pic était observé en général entre mars et avril tandis qu'un second pic avait lieu plus tard entre mai et juin (**Fig. III.1-G**). Les concentrations en Chl *a* ont varié de $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ en mai 2005 à $13,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ en avril 2007 (**Fig. III.1-G**).

En 2005, le premier pic a été caractérisé par des concentrations de Chl *a* plus faibles ($4,8 \mu\text{g.L}^{-1}$; **Fig. III.1-G**) que celles enregistrées au cours du second pic ($7,8 \mu\text{g.L}^{-1}$). Il s'agit également des concentrations en Chl *a* les plus faibles observées au cours des différents blooms.

En 2006, les concentrations en Chl *a* relevées au cours du premier pic ont été plus élevées ($11,6 \mu\text{g.L}^{-1}$; **Fig. III.1-G**) que celles du second pic ($7,7 \mu\text{g.L}^{-1}$).

En revanche en 2007, les deux pics ont été de même amplitude ($12-13 \mu\text{g.L}^{-1}$; **Fig. III.1-G**).

Comparé à 2005 et 2006, le premier pic a été observé plus tardivement début avril, rapidement suivi du second pic fin avril.

Les concentrations en carbone organique dissous (COD) d'origine phytoplanctonique influencent l'activité bactérienne (Lamy et al, 2006) et peuvent constituer une source alternative de nutriments pour certaines espèces phytoplanctoniques mixotrophes (Burkholder et al., 2008). La dynamique des concentrations en COD a été caractérisée par une augmentation au cours des printemps 2006 et 2007, et une diminution au cours du printemps 2005 (**Tableau III.2**). Au cours du printemps 2006, l'augmentation des concentrations en COD a eu lieu après le premier pic de la biomasse phytoplanctonique, tandis qu'en 2007, les concentrations en COD ont suivi la même dynamique que celle de la biomasse phytoplanctonique (**Fig. III.1-G et III.1-H**). En revanche en début de printemps 2005, d'importantes quantités de COD ont été relevées alors que les concentrations en Chl *a* étaient faibles.

I.3. Conditions hydrologiques de la colonne d'eau

Les données de luminosité moyenne dans la colonne d'eau enregistrées au cours du printemps 2005 ont été supérieures à celles des autres années (**Tableau III.2**; $>200 \text{ W.h.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$), en particulier au mois d'avril. A l'inverse, les valeurs de luminosité observées au cours des printemps 2006 et 2007 ont été relativement faibles (**Tableau III.2**; $<200 \text{ W.h.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$). La disponibilité de la lumière apparaît liée à la concentration en Chl *a*. Les fortes valeurs de PAR observées en 2005 ont coïncidé avec les faibles concentrations en Chl *a* observées au cours du premier pic (**Fig. III.2-A1**). A l'inverse, les faibles valeurs de PAR observées en 2006 et 2007 correspondaient à des concentrations élévées de Chl *a* (**Fig. III.2-A1**).

Il est reconnu que la disponibilité de la lumière dans la colonne d'eau est influencée par la turbidité de l'eau. Le coefficient d'atténuation K de la lumière est alors positivement corrélé à la concentration en matière en suspension composée essentiellement de sédiments et de phytoplancton (Labry et al. 2001). De manière générale, la dynamique de K suivait celle de la chlorophylle *a* (**Fig. III.2-B**). Cette relation n'a pas été mise en évidence en 2005 où de fortes valeurs de K étaient enregistrées entre février et mars, mois au cours desquels les concentrations en Chl *a* étaient relativement plus faibles que celles observées en 2006 pour la même période. Nous pouvons en déduire que l'hiver 2005 a été marqué par une remise en suspension d'importantes charges sédimentaires.

Le gradient vertical de densité (cD) a été utilisé dans le cadre de cette étude comme indice de stabilité de la colonne d'eau. Il a été particulièrement faible tout au long du printemps 2005, particulièrement en dehors de la période hivernale, indiquant une importante homogénéisation de la colonne d'eau (**Tableau III.2** ; $< 5 \text{ g.m}^{-4}$). En revanche en 2006, l'augmentation du gradient de densité au cours du mois de mars (**Fig III.2-C2** ; de $0,5$ à $1,2 \text{ g.m}^{-4}$) atteste l'établissement d'une stratification précoce. En 2007, les valeurs de gradient de densité étaient ponctuellement élevées jusqu'à atteindre $30,5 \text{ g.m}^{-4}$ au cours du mois d'avril (**Fig. III.2-C3**).

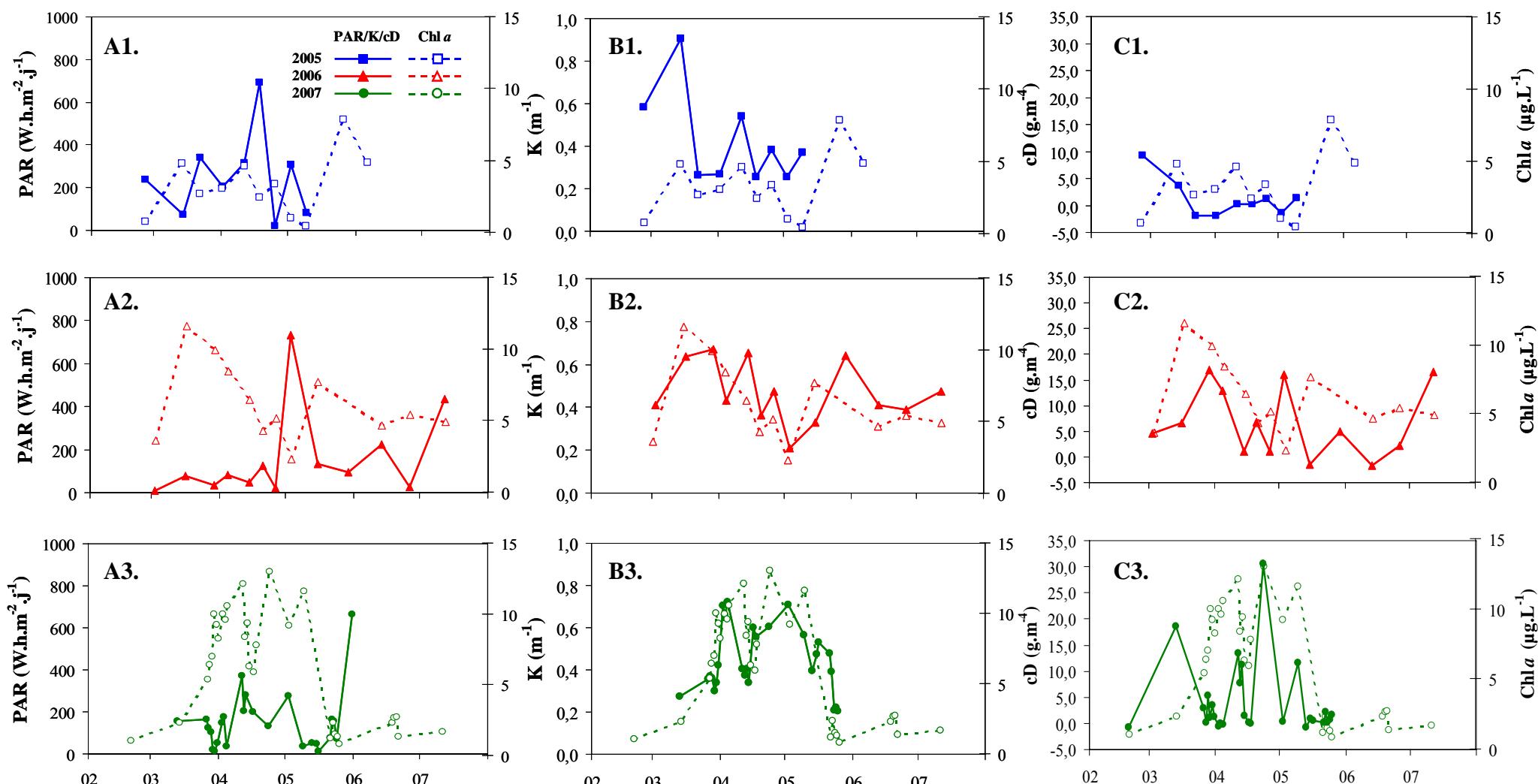


Figure III.2 : (A) Luminosité incidente de surface (PAR en W.h.m⁻².j⁻¹) ; (B) Coefficient d'atténuation (K en m⁻¹) ; (C) Gradient vertical de la densité (profondeur de 16 m ; cD en kg.m⁻⁴). Paramètres accompagnés des concentrations en chlorophylle *a* (Chl *a* en µg.L⁻¹) au cours des printemps (1) 2005, (2) 2006 et (3) 2007.

II. Communautés phytoplanctoniques

II.1. Composition en espèces et contribution aux communautés phytoplanctoniques

Au cours des printemps de 2005 à 2007, 66 espèces appartenant à sept groupes taxonomiques (e.g. Bacillariophytes, Prymnesiophycées, Dinophytes, Cryptophytes, Chlorophycées, Prasinophycées et Chrysophycées) ont été récoltées. Plus de 80% des espèces étaient des diatomées (Bacillariophytes) dont les genres les plus représentés étaient *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Guinardia* et *Pseudo-nitzschia*. Parmi les espèces répertoriées, seules 28 espèces appartenant aux groupes des Bacillariophytes, des Prymnesiophycées, des Dinophytes et des Cryptophytes ont prédominé par leur abondance ($>0,1\%$ de l'abondance totale) et/ou fréquence d'occurrence (**Tableau III.3**).

Le groupe des Prymnesiophycées, principalement représenté par l'espèce *Phaeocystis globosa*, a contribué majoritairement en termes d'abondance (**Tableau III.3**). *P. globosa* était présent sous différentes formes cellulaires ou morphotypes. Les morphotypes de *P. globosa* les plus représentés ont été les cellules coloniales libres (34%), les flagellés haploïdes (24%) et les cellules coloniales en colonie (16%). *P. globosa* a été particulièrement abondant et majoritaire au cours des printemps 2006 et 2007 (moyennes de 4467 et 2953.10^3 cell.L $^{-1}$, respectivement).

Le groupe des diatomées a constitué le second groupe à contribuer significativement à l'abondance totale (21%) avec des espèces telles que *Chaetoceros socialis*, *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Pseudo-nitzschia seriata*, *Rhizosolenia imbricata* et *Cerataulina pelagica* (abondance $>1\%$). Ce groupe proliférait généralement au mois de mars ainsi qu'entre mai et juillet. Au cours du printemps 2005, les Bacillariophyceae ont constitué le principal groupe algal (**Tableau III.3** ; moyenne de 447.10^3 cell.L $^{-1}$). Le maximum du printemps 2005 était alors attribué à la prolifération de *Cerataulina pelagica* (**Tableau III.3**). Cependant, les abondances les plus fortes de Bacillariophyceae ont été relevées en 2006 et 2007 (moyennes de 1101 et 718.10^3 cell.L $^{-1}$, respectivement) et étaient attribuées à *Pseudo-nitzschia seriata* et *Chaetoceros socialis*, respectivement (**Tableau III.3**). La plupart des espèces de ce groupe présentait une saisonnalité marquée dont certaines ont été occasionnelles (i.e. *Cerataulina pelagica*) et d'autres récurrentes (i.e. *Rhizosolenia imbricata*) selon les années (cf ci-après § II.2.).

Tableau III.3 : Abondances relatives moyennes (%N) au cours du printemps, abondances moyennes (N moyenne en 10^3 cell.L $^{-1}$) et fréquences d'occurrence (%) en fonction des printemps 2005-2007, des principaux taxons (dont la contribution à l'abondance totale > 0,1%). Pour chaque taxon, sont indiqués le groupe taxonomique, certains stades de vie, le code employé dans les analyses statistiques et le contenu cellulaire en carbone (pgC.L $^{-1}$).

Taxons	Code	Contenu carboné (pgC.cell $^{-1}$)	%N	N moyenne (10^3 cell.L $^{-1}$)			%FO		
			Total	2005	2006	2007	2005	2006	2007
Prymnesiophyceae									
<i>Phaeocystis globosa</i>	Scherffel 1899		77,64	176,24	4466,79	2952,60	91	100	100
Flagellés haploïdes		77,55	170,91	4465,73	2949,41	91	100	100	100
Flagellés diploïdes	flag n	10,8	24,33	x	945,12	1124,75	x	100	100
Cellules coloniales libres	flag 2n	14,2	2,94	x	173,69	112,05	x	100	51
Cellules coloniales en colonie	cell lib	14,2	33,92	108,09	2657,32	997,81	91	100	89
	cell col	57,0	16,36	62,82	689,60	714,81	36	57	63
Cryptophyta									
<i>Plagioselmis prolonga</i>	Butcher	Cryp	24,5	1,28	34,64	29,76	56,04	100	100
Dinophyta									
<i>Gymnodinium sp.</i>		Gymn	516,1	0,50	1,03	1,08	29,94	73	50
			0,49	0,90	0,09	29,82	45	7	86
Bacillariophyta									
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	(Castracane) Round 1990	Agla	20,57	447,19	1028,98	718,37	100	100	100
<i>Cerataulina pelagica</i>	(Cleve) Hendey 1937	Cera	158,6	0,31	4,28	5,66	15,37	64	64
<i>Chaetoceros curisetus</i>	Cleve 1889	Ccur	706,6	1,41	270,55	1,24	1,64	27	36
<i>Chaetoceros diadema</i>	(Ehrenberg) Gran 1897	Cdia	93,9	0,15	3,18	0,98	8,12	36	14
<i>Chaetoceros socialis</i>	Lauder 1864	Csoc	164,7	0,11	2,18	x	6,00	18	34
<i>Cylindrotheca closterium</i>	(Ehrenberg) Reiman & Lewin 1964	Cyli	53,5	6,29	5,42	167,10	319,86	36	57
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i>	(Bergon) Hasle 1996	Dact	167,3	0,13	4,05	9,48	3,24	82	71
<i>Ditylum brightwellii</i>	(T. West) Grunow in Van Heurck 1883	Dity	727,9	0,27	0,52	13,76	10,85	36	77
<i>Guinardia delicatula</i>	(Cleve) Hasle 1996	Dity	2668,3	0,11	x	4,35	4,90	x	50
<i>Guinardia flaccida</i>	(Cleve) (Castracane) H. Peragallo 1892	Gdel	2668,3	0,58	5,52	38,63	18,91	64	93
<i>Guinardia striata</i>	(Cleve) (Castracane) H. Peragallo 1892	Gfla	380,9	0,15	3,34	16,35	1,47	73	93
<i>Lauderia annulata</i>	(Stoltherfoth) Hasle 1996	Gstr	9742,4	0,12	8,71	8,40	1,55	55	69
<i>Leptocylindrus danicus</i>	Cleve 1889	Laud	956,2	0,30	0,34	0,23	18,37	9	64
<i>Nitzschia sp.</i>		Laud	872,3	0,40	1,53	54,32	2,72	7	37
<i>Paralia sulcata</i>	(Cleve) (Castracane) H. Peragallo 1892	Ldan	197,3	0,40	0,09	56,60	2,20	27	29
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	(Ehrenberg) Cleve 1873	Nitz	197,3	0,40	0,09	56,60	2,20	18	17
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	H. Peragallo in H. & M. Peragallo 1900	Para	6,9	0,19	11,44	11,82	3,54	82	57
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i>	(Grunow ex Cleve) Hasle 1993	Pdel	89,1	2,44	x	26,51	140,38	86	66
<i>Raphoneis amphiceros</i>	(Cleve) H. Peragallo	Ppun	25,3	0,63	5,25	93,60	x	73	64
<i>Rhizosolenia imbricata</i>	Ehrenberg	Pser	142,3	0,23	3,23	18,20	5,73	40	x
<i>Skeletonema costatum</i>	Brightwell 1858	Rhap	3527,2	0,27	79,24	116,15	69,03	91	80
<i>Thalassionema nitzschoides</i>	(Greville) Cleve 1873	Rimb	36,5	0,51	12,01	3,00	26,38	82	94
<i>Thalassiosira levanderi</i>	(Grunow) Mereschkowsky 1902	Skel	16,7	0,18	3,18	8,04	6,67	100	46
<i>Thalassiosira nordenskioeldii</i>	van Goor 1924	Thaa	28,9	0,13	1,61	8,95	3,85	43	29
<i>Thalassiosira rotula</i>	Cleve 1873	Tlev	89,1	0,25	0,94	0,03	15,23	64	20
	Meunier 1910	Tnor	843,9	0,20	1,10	6,89	9,04	7	46
		Trot						86	63

x: absent

Le groupe des Cryptophytes, composé uniquement de l'espèce *Plagioselmis prolonga*, a été le troisième groupe contribuant le plus à l'abondance totale bien qu'il ne représentait que 1,3%. Il s'agit d'un groupe récurrent chaque année avec des abondances moyennes $>30.10^3$ cell.L⁻¹ mais il a été plus abondant au cours du printemps 2007. Ce groupe était principalement abondant en début et en fin de printemps, accompagnant le groupe des Bacillariophyceae. Les Dinophyceae autotrophes constituant le quatrième groupe, principalement représenté par *Gymnodinium sp.*, ont été particulièrement abondants au cours du printemps 2007, entre avril et mai.

II.2. Variations temporelles des communautés phytoplanctoniques

II.2.1. Variations de la biodiversité

L'indice de diversité de Shannon-Weaver (H') variait entre 0,11 bits.cell⁻¹ (le 23 avril 2007) et 2,40 bits.cell⁻¹ (le 2 avril 2007). Au cours du printemps de chaque année, la dynamique de la diversité consistait en deux diminutions, les valeurs minimales de diversité correspondant aux pics de biomasse des différents blooms (**Fig. III.3-A et Fig. III.3-B**). En général, ces faibles valeurs de diversité coïncidaient avec l'établissement de communautés pionnières. Comme l'indique la forme concave des diagrammes rang-fréquence (**Fig. III.4**), ce type de communauté consiste en une distribution irrégulière des individus entre les espèces et une faible diversité. Seul le diagramme rang-fréquence correspondant au premier pic de biomasse enregistré le 18 avril 2005 était de forme convexe, indiquant l'établissement d'une communauté déjà mature en début de printemps (**Fig. III.4-C**). Ce type de communauté se caractérise par une augmentation de l'équitabilité entre les espèces, accompagnée d'une perte de diversité. La tendance de la richesse spécifique (S) suivait celle de la diversité, bien qu'elle ait été plus nuancée au cours du printemps 2006, caractérisée par une diminution tout au long de la période d'étude (**Fig. III.3-A**).

La première communauté pionnière relévée entre mars et avril était généralement constituée des espèces *Phaeocystis globosa* et *Rhizosolenia imbricata* pouvant être accompagnées de Cryptophycées et de *Chaetoceros socialis*. La seconde communauté pionnière s'établissant entre mai et juin était composée d'espèces du genre *Guinardia* (*G. delicatula*, *G. striata* et *G. flaccida*) et de genres associés (*Cerataulina pelagica* et *Dactyliosolen fragilissimus*), parfois accompagnées d'espèces du genre *Pseudo-nitzschia* (*P. seriata*, *P. pungens* et *P. delicatissima*).

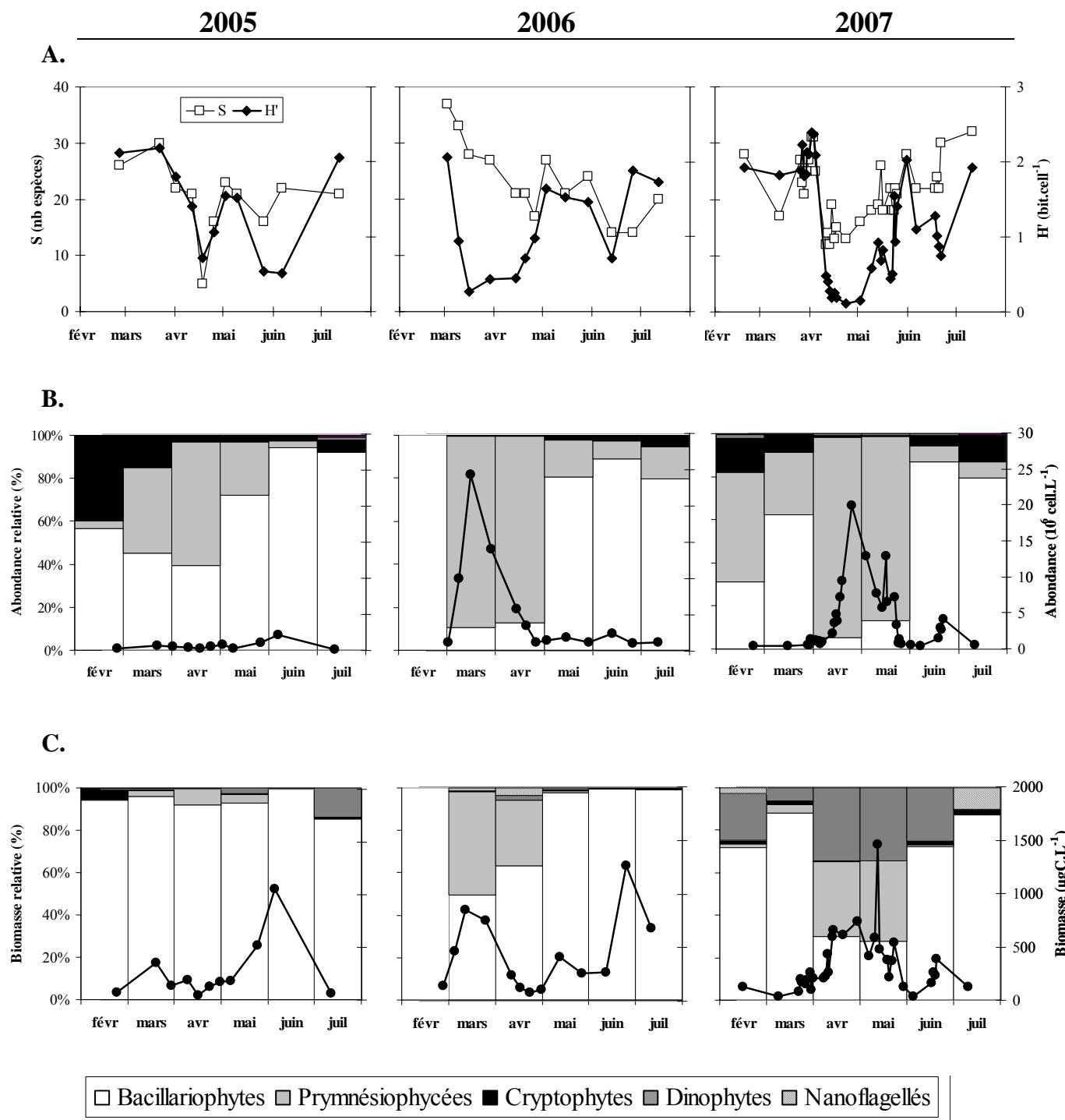


Figure III.3: Variations temporelles au cours des printemps 2005, 2006 et 2007 de (A) l'indice de diversité de Shannon-Weaver (H'), de la richesse spécifique (S) et des contributions des groupes phylogénétiques (i.e. Bacillariophytes, Prymnésiophycées, Cryptophytes, Dinophytes et nanoflagellés) à (B) l'abondance totale (10^6 cell.L $^{-1}$) et (C) à la biomasse carbonée totale ($\mu\text{gC.L}^{-1}$) du phytoplancton.

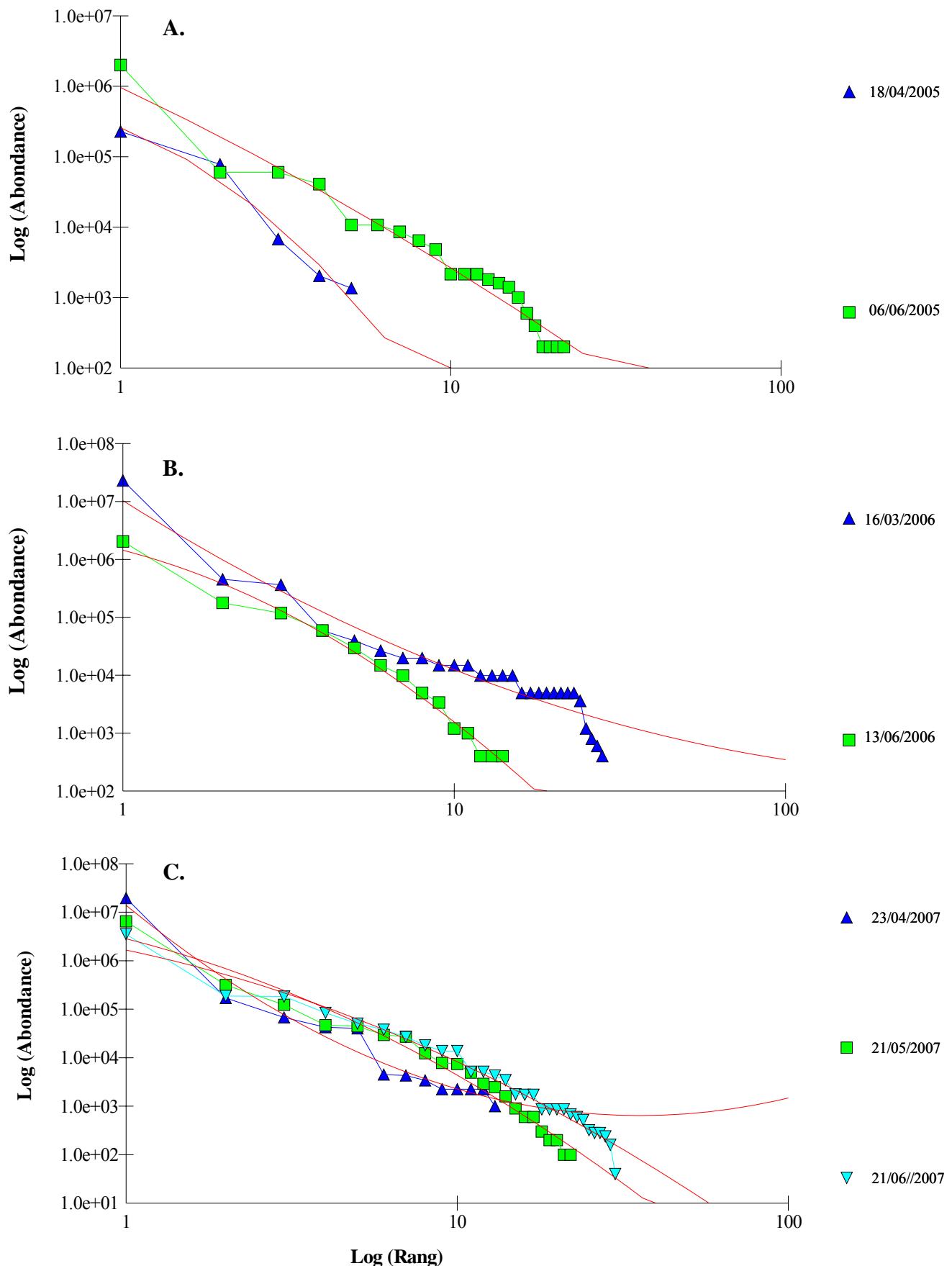


Figure III.4 : Diagrammes rang-fréquence des espèces phytoplanctoniques des échantillons présentant un indice de diversité faible ($H' < 1 \text{ bit.cell}^{-1}$) au cours des printemps (A) 2005, (B) 2006 et (C) 2007.

II.2.2. Variations des stocks phytoplanctoniques

Comme vu précédemment avec les concentrations en Chl *a*, les blooms printaniers en 2005 se caractérisent par des abondances cellulaires relativement faibles ($2,22 \cdot 10^6$ cell.L $^{-1}$), comparées à celles des blooms de 2006 ($24,26 \cdot 10^6$ cell.L $^{-1}$) et 2007 ($19,91 \cdot 10^6$ cell.L $^{-1}$). Les abondances et les biomasses carbonées ont été plus élevées au cours du printemps 2006.

Le **Tableau III.4** résume les valeurs d'abondance et de biomasse ainsi que les principaux moments des deux blooms (B1 et B2) définis au cours de chaque printemps à l'aide des concentrations en Chl *a* (**Fig. III.1-G**). Les durées des blooms, suivis grâce à un échantillonnage hebdomadaire à journalier, variaient de 35 à 80 jours (**Tableau III.4**).

Tableau III.4 : Biomasse carbonée maximale (Max B en $\mu\text{gC.L}^{-1}$), abondance maximale (Max N en 10^6 cell.L $^{-1}$) du phytoplancton total, dates de début, de maximum, de fin et durée (en jours) des blooms printaniers (B1 et B2) au cours de 2005, 2006 et 2007.

	2005		2006		2007	
	B1	B2	B1	B2	B1	B2
Max B	352	1050	848	1265	1458	390
Max N	0,78	2,22	24,26	2,47	19,92	4,16
Date début	25-févr	09-mai	02-mars	26-avr	26-mars	06-juin
Date max B	22-mars	06-juin	16-mars	26-juin	23-avr	21-juin
Date max N	02-mai	06-juin	16-mars	13-juin	15-mai	21-juin
Date fin	09-mai	12-juil	20-avr	12-juil	06-juin	11-juil
Durée	66	64	49	77	80	35

D'importantes différences ont été observées dans les stocks et les dates de pics entre les années (**Tableau III.4**). Parfois les dates de pics de la biomasse ne coïncidaient pas avec celles de l'abondance. Cette différence est liée à la taille des organismes responsables des blooms, les plus fortes abondances étant généralement attribuées à des espèces de petite taille. En comparaison des blooms définis à partir des concentrations en Chl *a*, il est important de noter que les deux blooms successifs détectés au moyen de la Chl *a* entre mars et mai 2007 (**Fig. III.1-G**) font partie d'un seul bloom défini par l'abondance et la biomasse phytoplanctonique (B1 ; **Tableau III.4**). De plus, l'existence du bloom B2 défini à la fois en terme d'abondance et de biomasse carbonée au mois de juin 2007 n'a été que faiblement détecté par les concentrations de Chl *a* (**Fig. III.1-G**).

Considérant l'abondance des groupes phylogénétiques, les Prymnesiophycées, les Bacillariophytes (diatomées) et les Cryptophytes constituaient les groupes les plus fréquents et présentaient une succession saisonnière marquée (**Fig. III.3-B**). Les diatomées

accompagnées de Cryptophytes étaient observées en hiver avant le bloom B1 et montraient une nouvelle accumulation à la fin du printemps au cours du bloom B2. Les diatomées étaient remplacées par les Prymnésiophycées au cours du printemps, coïncidant avec le premier bloom (B1). La chronologie d'apparition/disparition ainsi que la contribution à l'abondance totale des ces groupes ont été toutefois très différents entre les années (**Fig. III.3-B**). La contribution des Cryptophytes en hiver 2005 a été importante (40%) tandis que celle des Prymnésiophycées a été plus faible qu'au cours des autres printemps. En 2006, les contributions maximales des Prymnésiophycées ont été relevées dès le mois de mars. D'importantes contributions de Prymnésiophycées ont été relevées en Février 2007. En termes de biomasse, les diatomées contribuaient majoritairement au cours de chaque printemps (**Fig. III.3-C**). Les contributions de Prymnésiophycées et de Cryptophytes apparaissaient moins importantes voire quasi-nulles, au profit d'autres groupes tels que les Dinophytes (notamment en 2007) et les nanoflagellés.

II.2.3. Variations des espèces phytoplanctoniques

L'échantillonnage hebdomadaire à journalier a permis de suivre dans le détail le développement de sept espèces principales responsables des blooms observés (%N > 1 ; **Tableau III.3**): *Phaeocystis globosa*, *Plagioselmis prolonga*, *Rhizosolenia imbricata*, *Cerataulina pelagica*, *Chaetoceros socialis*, *Pseudo-nitzschia delicatissima* et *Pseudo-nitzschia seriata*. La dynamique de ces espèces sera décrite précisément dans une partie ultérieure (Cf § III.).

Certaines espèces se sont développées de manière récurrente chaque année, tandis que d'autres se caractérisaient par des développements plus ponctuels :

- *Rhizosolenia imbricata* et *Plagioselmis prolonga* se développaient de manière récurrente chaque année, suivant deux pics d'amplitude $> 10.10^3 \text{ cell.L}^{-1}$ (**Fig. III.5**).
- *Phaeocystis globosa* représentant le groupe des Prymnésiophycées, était l'espèce la plus dominante en termes d'abondance ($> 10.10^6 \text{ cell.L}^{-1}$) et était responsable des premiers pics (B1) observés au cours du printemps (**Fig. III.5**).
- Les seconds pics (B2) étaient attribués aux abondances ($> 100.10^3 \text{ cell.L}^{-1}$) de (i) *Cerataulina pelagica* en 2005, (ii) *Pseudo-nitzschia seriata* en 2006 et (iii) *Pseudo-nitzschia delicatissima* et *Chaetoceros socialis* en 2007 (**Fig. III.5**). Certaines espèces telles que *Chaetoceros socialis* pouvaient proliférer plusieurs fois au cours du printemps.

D'autres espèces se sont caractérisées par des blooms au cours de cette étude. *Asterionellopsis glacialis*, *Guinardia delicatula* et *Guinardia flaccida* présentaient plusieurs pics d'abondance avec des abondances maximales souvent enregistrées entre mai et juin. Des espèces tychopélagiques⁴⁰ telles que *Paralia sulcata*, *Cylindrotheca closterium* et *Raphoneis amphiceros* étaient particulièrement erratiques et n'ont pas eu lieu saisonnièrement. Ces dernières reliées à la remise en suspension pouvaient présenter des augmentations ponctuelles importantes (jusqu'à $1.10^6 \text{ cell.L}^{-1}$; **Fig. III.5**).

⁴⁰ Le terme « tychopélagique » est appliqué ici pour définir les espèces à l'origine benthique qui se retrouvent dans la colonne d'eau par remise en suspension.

Chapitre III : Structure phytoplanctonique au cours du bloom printanier

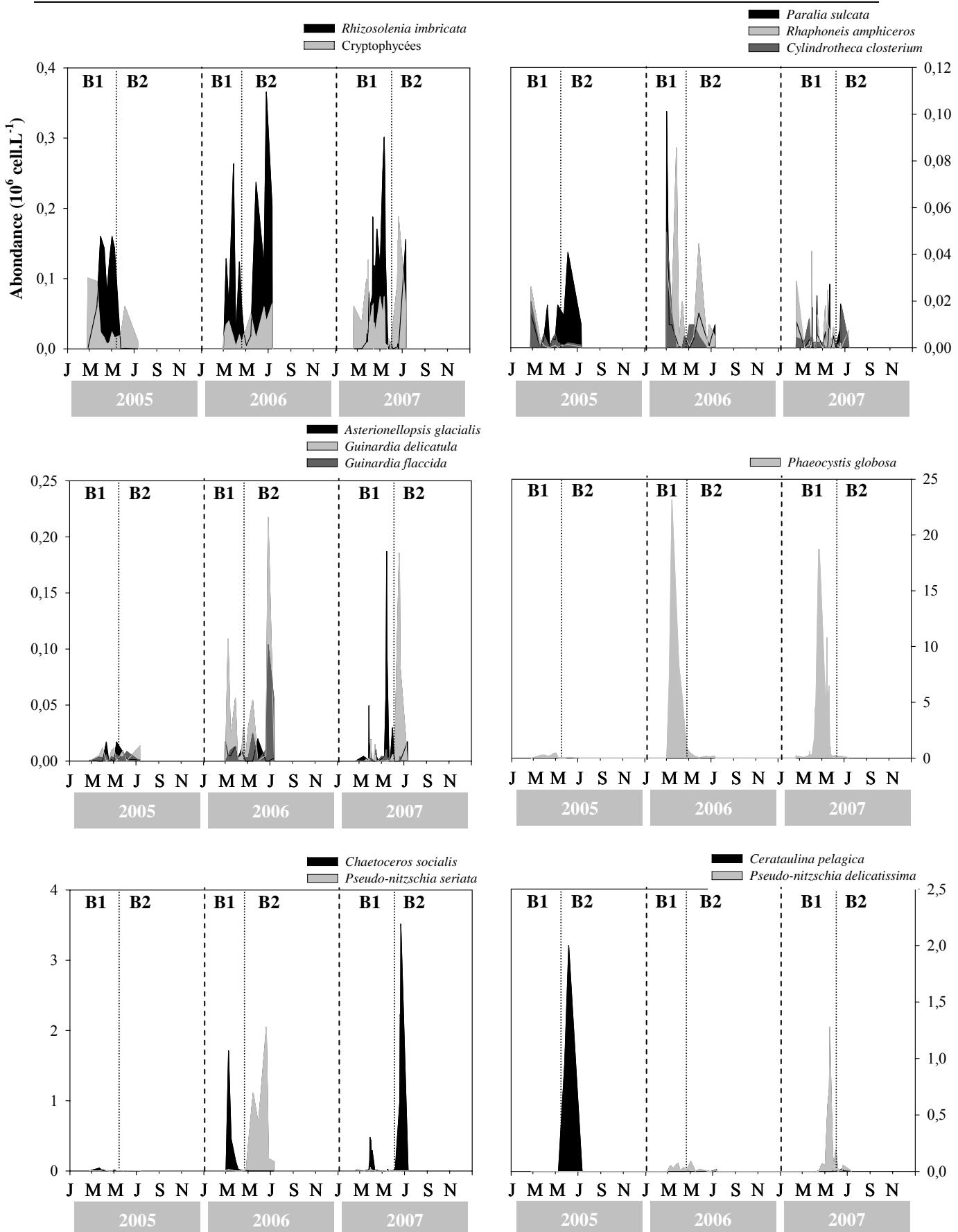


Figure III.5 : Variations temporelles de l'abondance des principales espèces (10^6 cell.L $^{-1}$) rencontrées au cours des printemps 2005, 2006 et 2007 (Attention aux échelles variables d'abondances).

II.2.4. Variations des morphotypes de *Phaeocystis globosa*

L'échantillonnage a également permis de suivre la dynamique des différentes formes de vie de *Phaeocystis globosa* dont le développement durait en moyenne deux mois (**Fig. III.6**).

Les cellules coloniales libres et en colonie ainsi que les flagellés haploïdes sont responsables des variations d'abondances de *Phaeocystis globosa* (contribution à N > 15% ; **Tableau III.3**) tandis que les flagellés diploïdes apparaissent minoritaires (~3%). Les abondances des cellules coloniales en colonie et celles des flagellés haploïdes ont été plus faibles au cours du printemps 2006 (**Fig. III.6**).

Au cours du printemps 2006, le développement de chaque morphotype a eu lieu successivement dans l'ordre suivant : cellules coloniales en colonie, cellules coloniales libres, flagellés diploïdes et flagellés haploïdes (**Fig. III.6**). En revanche, en 2007, les morphotypes se sont développés de manière simultanée, à l'exception des flagellés diploïdes caractérisés par un développement plus bref en début de bloom de *Phaeocystis globosa* (~15 jours ; **Fig. III.6**).

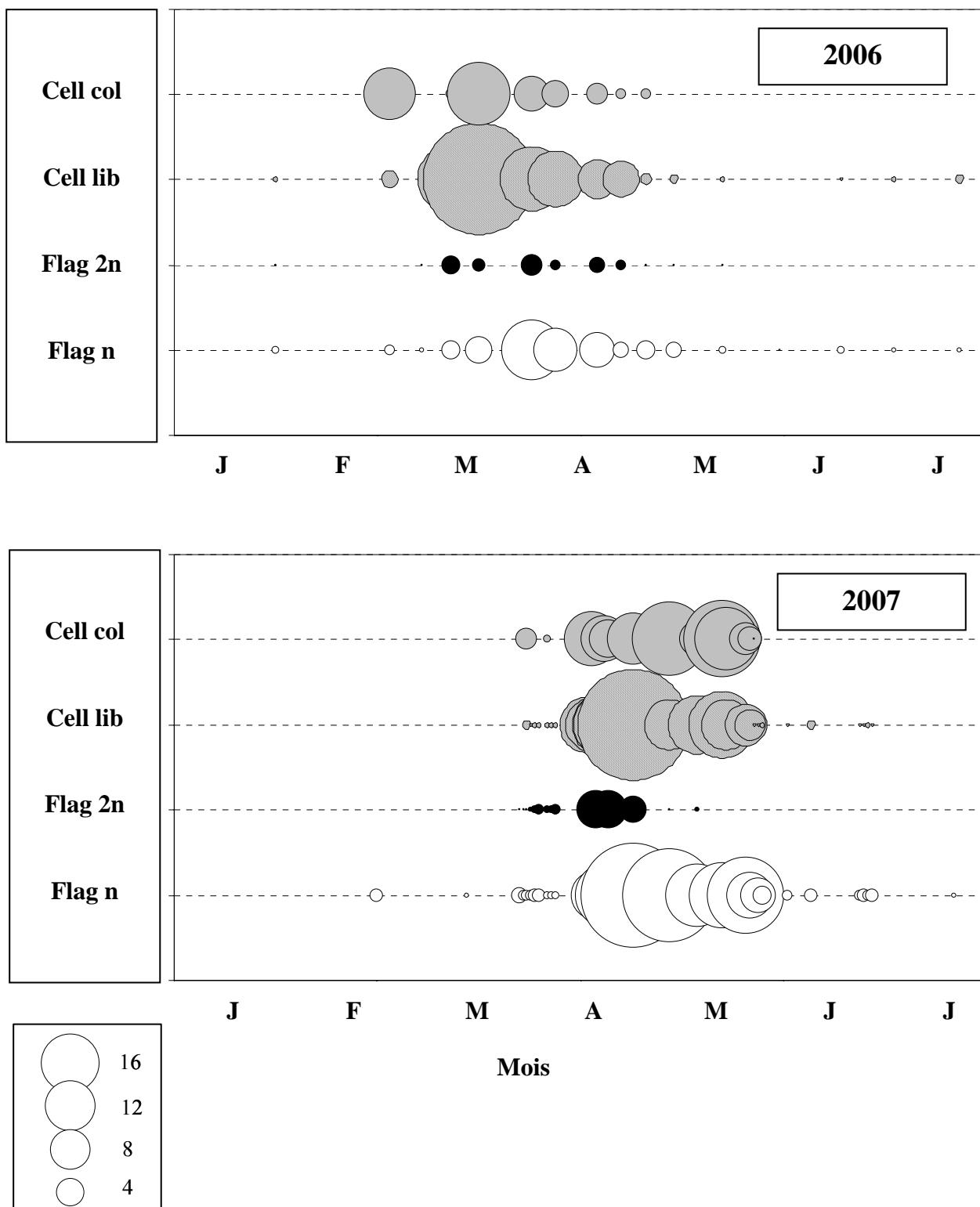


Figure III.6: Variations temporelles des abondances (10^6 cell.L^{-1}) des morphotypes de *Phaeocystis globosa*: les cellules coloniales en colonie (cell col), les cellules coloniales libres (cell lib), les flagellés diploïdes (flag 2n) et les flagellés haploïdes (flag n), des échantillons récoltés au cours du printemps 2006 et 2007. Pas de données disponibles pour le printemps 2005.

III. Influence environnementale sur les blooms phytoplanctoniques

Comme indiqué précédemment (Cf § III.2.3.), une description des variations des espèces qui ont été responsables de l'abondance des blooms est faite ci-après, en relation avec les variations des variables environnementales. Par souci de clarté, des périodes ont été définies (P), cependant elles correspondent aux principaux changements environnementaux pouvant expliquer le développement des espèces phytoplanctoniques. Par conséquent, ils ne doivent pas être confondus avec les périodes de bloom B1 et B2 précédemment définies sur la base des concentrations chlorophylliennes, abondance et biomasse phytoplanctonique totale.

Principaux changements dans la structure des communautés

En 2005, le début de la période d'échantillonnage (P1) était caractérisé par une diminution du gradient vertical de densité (**Fig III.7-B**). Les valeurs du gradient vertical de densité étaient de $9,2 \text{ g.m}^{-4}$ le 25/02 et atteignaient $1,9 \text{ g.m}^{-4}$ le 01/04. Cette diminution coïncidait alors avec la phase de début de développement de *Phaeocystis globosa* (**Fig. III.7-A**). Cependant, les concentrations maximales de *P. globosa* n'ont pas excédé $0,5.10^6 \text{ cell.L}^{-1}$ et les concentrations en nitrates étaient encore $> 5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ à la fin de cette période (**Fig. III.7-C**).

Du 11/04 au 09/05, une augmentation des concentrations en sels nutritifs a été observée, en particulier des formes azotées (**Fig. III.7-C** ; $+ 3-4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour DIN). Les concentrations en DIN encore relativement élevées en mai ($> 5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) ont précédé au déclenchement d'un bloom de *Cerataulina pelagica* (P2). Les concentrations minimales en sels nutritifs atteintes en juin correspondaient au maximum d'abondance de *C. pelagica* (**Fig. III.7-A et III.7-C** ; concentration maximale de $2.10^6 \text{ cell.L}^{-1}$).

Deux changements de structure ont caractérisé le printemps 2005. Le premier changement était associé à une diminution de la stabilité et était concomitant à de faibles concentrations hivernales de sels nutritifs. Le maintien des conditions de mélange a probablement conduit à un faible développement de *Phaeocystis globosa*. Le second changement de structure coïncidait avec un apport de sels nutritifs entraînant le développement intensif de *Cerataulina pelagica*.

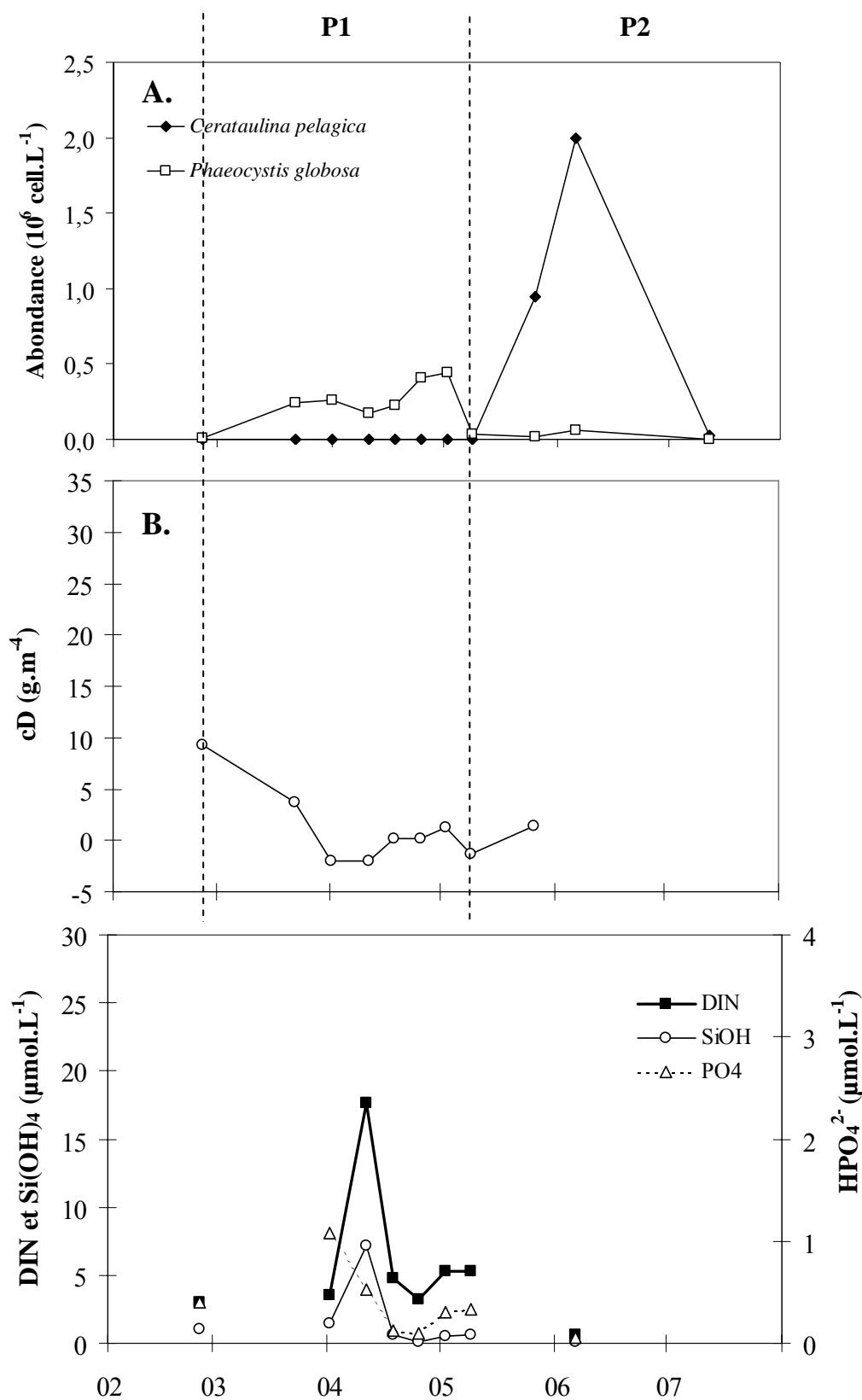


Figure III.7: Variations temporelles au cours du printemps 2005 (A); de l'abondance des deux espèces dominantes (B) du gradient vertical de densité (cD); (C) des concentrations en sels nutritifs.

En 2006, le début de la période d'échantillonnage (P1) était marqué par une augmentation du gradient vertical de densité (de 4,6 à 16,9 g.m⁻⁴ du 02/03 au 16/03), parallèlement à la phase de croissance des blooms de *Chaetoceros socialis*, puis de *Phaeocystis globosa* (**Fig. III.8-A et B**). Un décalage d'une semaine entre les dates de pic de ces deux espèces a été observé. Le pic de *Chaetoceros socialis* a eu lieu le 09/03, suivi du pic de *Phaeocystis globosa* le 16/03 (**Fig. III.8-A**). Ces blooms précoces ont été responsables de la diminution rapide des concentrations en sels nutritifs observée entre le 02/03 et le 09/03 (**Fig. III.8-C**). Les stocks de DIN étaient alors épuisés contrairement aux concentrations en silicates (> 1 µmol.L⁻¹), les concentrations en phosphates ayant atteint leurs faibles valeurs dès le mois de mars (proches de 0.5 µmol.L⁻¹). Au cours de cette période, une augmentation de concentrations de COD a également été enregistrée, concomitante avec la phase décroissante du bloom de *Phaeocystis globosa*, pour atteindre un maximum de 265 µmol.L⁻¹ fin Avril (**Fig. III.8-D**).

Lorsque les concentrations maximales de COD étaient atteintes le 26/04 (P2), le bloom de *Pseudo-nitzschia seriata* démarrait et la phase de développement du bloom coïncidait avec la diminution des quantités de COD entre le 26/04 et 04/05.

Comme en 2005, un apport de DIN a été observé entre le 15/05 et 29/05 (**Fig. III.8-C** ; 4,9 µmol.L⁻¹). Cette augmentation était à l'origine d'un second pic d'abondance de *Pseudo-nitzschia seriata* atteignant des densités plus importantes que lors du premier pic (**Fig. III.8-A** ; 2.10⁶ cell.L⁻¹).

Le printemps 2006 a été caractérisé par trois changements de structure. Les deux premiers changements étaient associés à une stratification précoce de la colonne d'eau et étaient concomitants à une diminution rapide des concentrations hivernales en sels nutritifs. L'augmentation de la stabilité de la colonne d'eau a conduit au développement de *Chaetoceros socialis* immédiatement suivi par un important développement de *Phaeocystis globosa*. Le troisième changement de structure coïncidait avec une augmentation de concentrations en COD à la suite du bloom de *Phaeocystis globosa*. Les concentrations maximales coïncidaient avec le démarrage d'un bloom de *Pseudo-nitzschia seriata*. Un apport ponctuel en sels nutritifs aurait entraîné un second développement consécutif, plus intense, de *Pseudo-nitzschia seriata*.

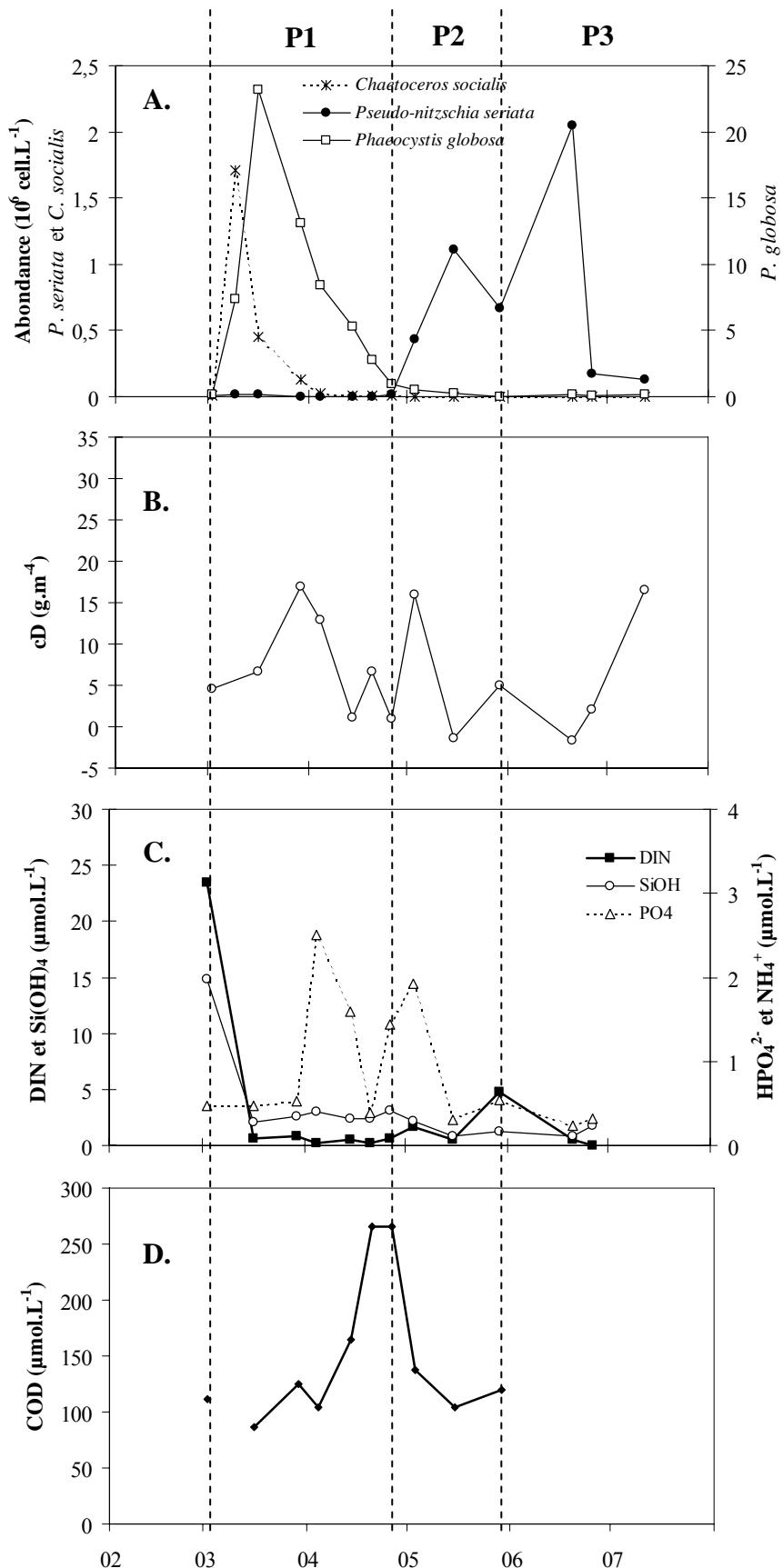


Figure III.8: Variations temporelles au cours du printemps 2006 (A); de l'abondance des deux espèces dominantes (B) du gradient vertical de densité (cD); (C) des concentrations en sels nutritifs et (D) des concentrations en carbone organique dissous.

En 2007, un premier bloom de *Chaetoceros socialis* de faible intensité a démarré fin mars (P1) et coïncidait avec une période de mélange matérialisée par une diminution abrupte du gradient de densité (**Fig. III.9-A et III.9-B**). Ce premier bloom coïncidait avec la diminution des stocks hivernaux de sels nutritifs. Au cours de cette période, des valeurs faibles ont été atteintes pour l'ammonium, les silicates et les phosphates.

Le démarrage d'un bloom de *Phaeocystis globosa* a eu lieu à partir du 04/04 (P2), concomitant à une augmentation du gradient de densité (**Fig. III.9-A et III.9-B**). Les valeurs minimales des concentrations en DIN ont été atteintes au cours de la phase de développement du bloom et une augmentation des concentrations en COD a été observée (**Fig. III.9-C et III.9-D**). Les stocks de silicates n'étaient alors pas épuisés, contrairement à ceux de DIN.

Au maximum de concentrations de COD début mai (**Fig. III.9-D** ; $424 \mu\text{mol.L}^{-1}$), une augmentation d'abondance de *Pseudo-nitzschia delicatissima* a été constatée (P3 ; **Fig. III.9-A**). A la fin du bloom de *Pseudo-nitzschia delicatissima*, un apport d'ammonium à été enregistré (**Fig. III.9-C** ; $+ 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Celui-ci coïncidait avec le démarrage d'un second bloom de *Chaetoceros socialis* (P4), plus intense que le premier observé en début de printemps (**Fig. III.9-A**; $3,5.10^6 \text{ cell.L}^{-1}$).

Au cours du printemps 2007, quatre changements de structure ont été répertoriés. Le premier changement correspondait à un bloom de *Chaetoceros socialis*, de faible intensité, associé à une période de mélange suivie d'une faible stratification. Ce bloom était responsable du début de la diminution des stocks de silicates, de phosphates et d'ammonium. Le second changement était attribué à l'établissement d'une stratification plus importante de la colonne d'eau accompagnant un bloom intense de *Phaeocystis globosa*. Au cours de ce bloom, les stocks de phosphates et DIN (nitrates+nitrites) ont été épuisés (mais il y a eu une importante régénération de l'ammonium, et dans une moindre mesure, des phosphates) et d'importantes quantités de COD ont été apportées. Le troisième changement consistait en un bloom de *Pseudo-nitzschia delicatissima* dont le démarrage coïncidait avec les concentrations maximales de COD et des pics de régénération d'ammonium. Le quatrième changement a eu lieu avec un second bloom très intense de *Chaetoceros socialis*, coïncidant avec une régénération importante d'ammonium.

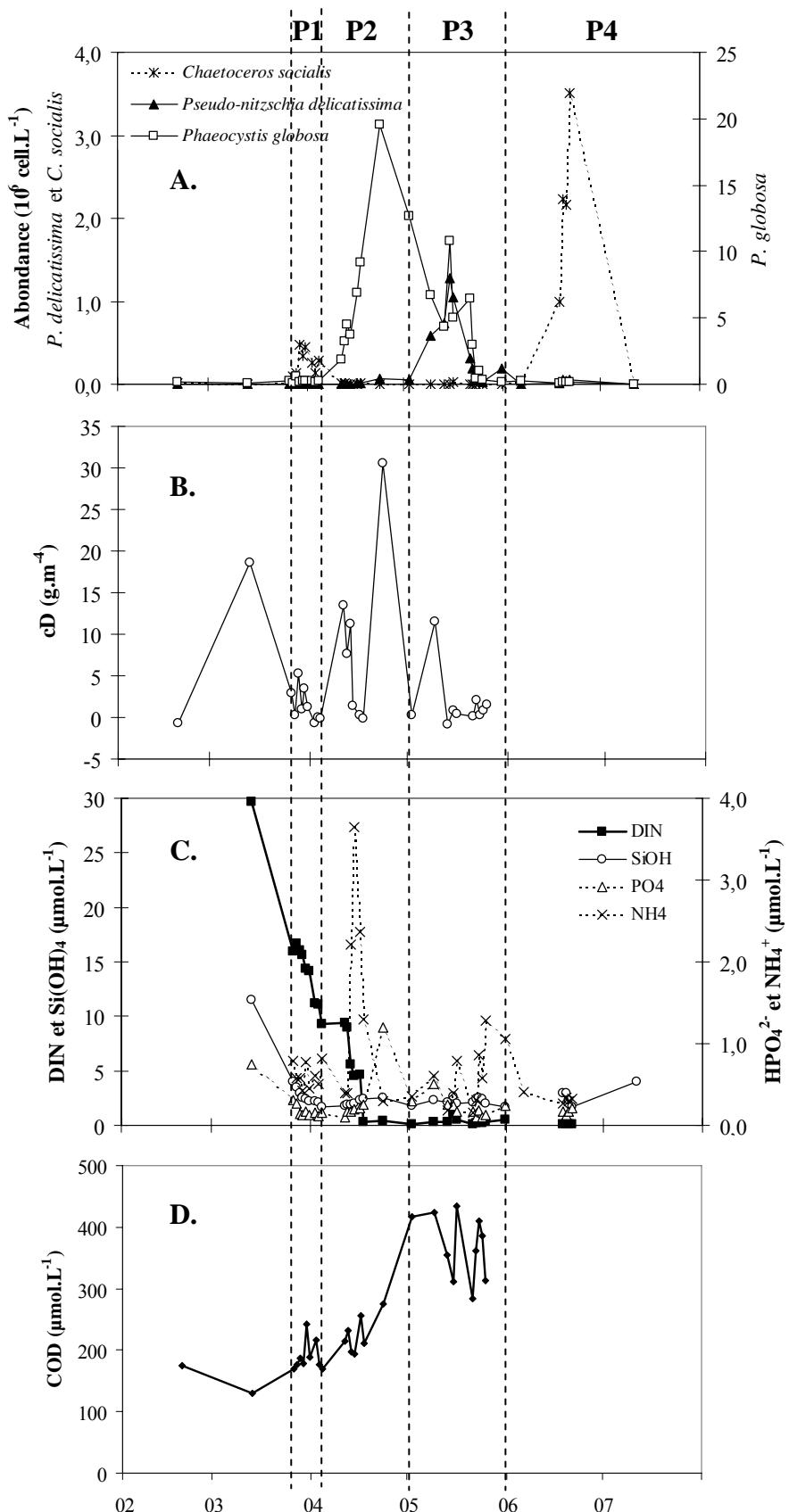


Figure III.9: Variations temporelles au cours du printemps 2007 (A); de l'abondance des trois espèces dominantes (B) de la luminosité incidente moyenne dans la colonne d'eau (PAR moyen) et du gradient vertical de densité (cD); (C) des concentrations en sels nutritifs et (D) des concentrations en carbone organique dissous.

IV. Structure des communautés phytoplanctoniques

IV.1. Morphologie et stratégie adaptative des espèces

A chacune des espèces répertoriées selon leur importance relative (**Tableau III.3**) est attribuée une des trois stratégies adaptatives (C-S-R) en fonction de leur rapport de surface/volume (S/V) et de leur dimension linéaire maximale (DLM) (Reynolds, 1988, 1996). Le graphique de dispersion obtenu à partir de ces deux paramètres permet de discriminer des groupes fonctionnels aux propriétés morphologiques et physiologiques similaires (**Fig. III.10**). Les groupes fonctionnels sont divisés en trois stratégies primaires correspondant à (i) des espèces C-stratégies (colonialistes-invasives) de petite taille, à fort taux de croissance et de rapport S/V élevé, (ii) des espèces S-stratégies (tolérantes au stress nutritif) de grande taille, à faible taux de croissance et de rapport S/V faible et (iii) des espèces R-stratégies (rudérales), de forme allongée et, en dépit pour quelques unes d'entre elles, de leur grande dimension, de rapport S/V élevé.

Le graphique de dispersion du S/V et de la DLM des 28 espèces dominantes montre qu'elles présentent une large gamme de formes et de tailles et qu'elles se répartissent de manière inégale, en fonction des trois stratégies, indépendamment de leur groupe taxonomique (**Fig. III.10**). Dans cette analyse, l'espèce *Phaeocystis globosa* est représentée suivant ces différents stades de vie car ceux-ci présentent des morphologies distinctes. Ainsi les colonies de *P. globosa* sont considérées comme une entité et un modèle sphérique de taille moyenne (300 µm) est utilisé pour représenter ce morphotype.

- La majorité des espèces de diatomées sont des stratégies-R et se répartissent le long d'un gradient de S/V, allant de 0,4 à 4,6 µm⁻¹. Cette distribution des espèces en diagonale montre un continuum entre les espèces de petite taille (S/V élevé) et de DLM élevé du genre *Pseudo-nitzschia* et *Skeletonema* et des espèces de grande taille (S/V faible) du genre *Guinardia*. Ces espèces de diatomées sont accompagnées de Cryptophytes.
- Certaines espèces de diatomées sont répertoriées en tant que stratégies-S, voire à la limite entre les stratégies R et S. Il s'agit d'espèces appartenant au genre *Guinardia* ou à des genres associés tels que *Lauderia*, *Cerataulina* et *Dactyliosolen*. Le dinoflagellé *Gymnodinium* sp. ainsi que les colonies de *Phaeocystis globosa* appartiennent également à cette catégorie. Cependant, *Gymnodinium* sp. se situe à la limite entre les stratégies C et S.

- La stratégie-C inclut les formes libres de cellules de *Phaeocystis globosa*, c'est à dire les cellules coloniales libres (cell lib), les flagellés diploïdes (Flag 2n) et les flagellés haploïdes (Flag n). Il est à noter que ce dernier morphotype se trouve à la limite entre les stratégies C et R.

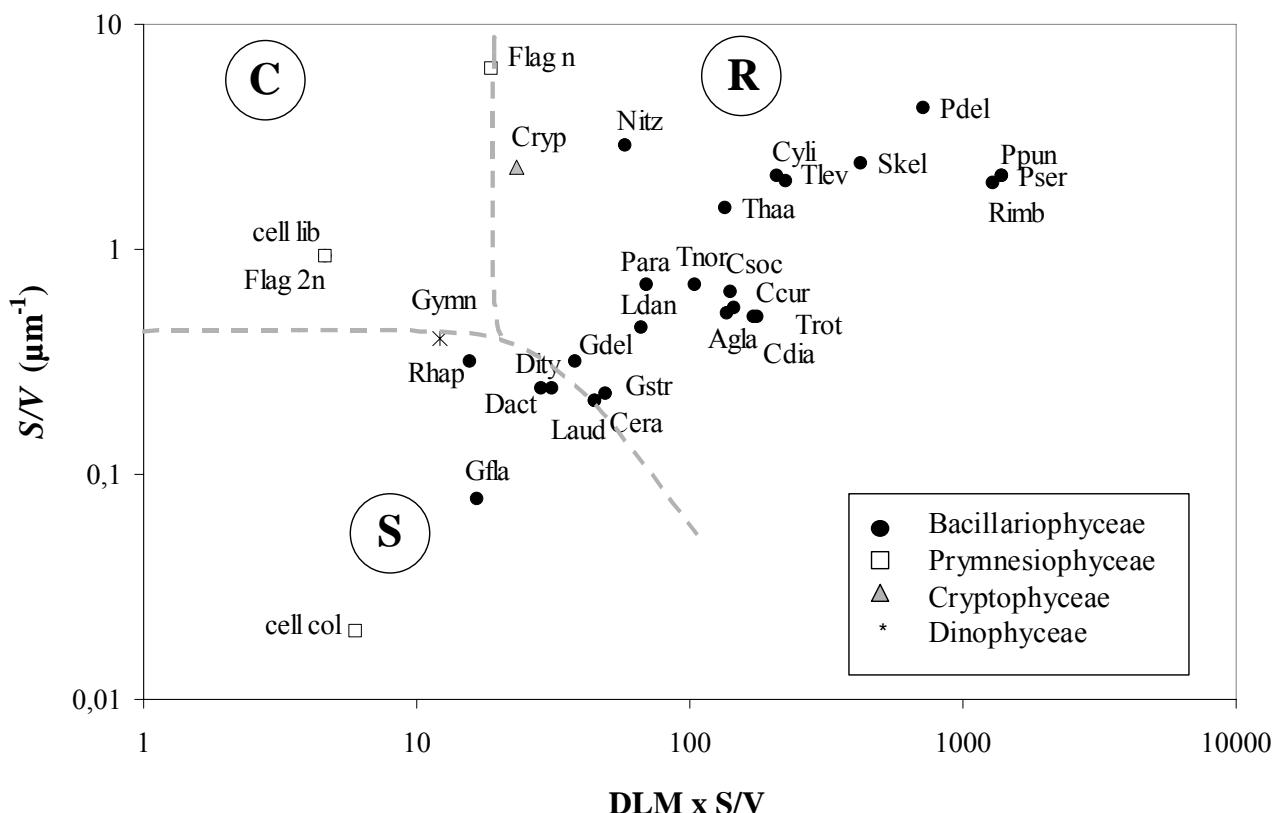


Figure III.10 : Distribution des espèces indicatrices (voir Tableau III.3 pour la signification des abréviations) suivant les stratégies adaptatives C-S-R. Les espèces sont localisées dans un espace déterminé par leur rapport surface-volume (S/V) et le produit de leur dimension linéaire maximale (DLM) et du S/V.

IV.2. Analyse de la variabilité des assemblages phytoplanctoniques

Une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été réalisée sur l'ensemble des observations afin d'identifier des assemblages d'espèces phytoplanctoniques (**Fig. III.11**). Les deux premiers axes de l'analyse factorielle des correspondances (AFC) décrivent 29,9% de l'inertie totale. Le plan des deux premiers axes fait apparaître clairement la variabilité saisonnière des échantillons (**Fig. III.11-A**) et des espèces (**Fig. III.11-B**). Le premier axe est structuré par l'opposition entre les échantillons prélevés entre février et début avril, caractérisés par *Lauderia annulata* (16% de l'inertie totale), *Thalassiosira nordenskioeldii* (12%) et *Chaetoceros curvisetus* (10%), et les échantillons prélevés entre fin avril et juillet. Le second axe sépare les échantillons récoltés entre fin avril et début mai caractérisés par les cellules coloniales en colonie de *Phaeocystis globosa* (12%) et les échantillons récoltés entre fin mai et juillet caractérisés par *Leptocylindrus danicus* (18%).

L'AFC met en évidence la succession saisonnière de trois assemblages d'espèces :

- Un premier **assemblage hivernal (1)** composé d'espèces du genre *Chaetoceros*, de *Nitzschia sp.*, *Thalassiosira nordenskioeldii*, *Thalassionema nitzschoides*, *Lauderia annulata*, *Dactyliosolen fragilissimus*, *Ditylum brightwellii* et des flagellés diploïdes de *Phaeocystis globosa*.
- Un second **assemblage printanier (2)** composé des flagellés haploïdes et des cellules coloniales libres et en colonie de *Phaeocystis globosa*, d'espèces du genre *Thalassiosira*, du groupe *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Skeletonema costatum*, *Asterionellopsis glacialis*, *Raphoneis amphiceros* et du dinoflagellé *Gymnodinium sp.*
- Un troisième **assemblage pré-estival (3)** composé d'espèces du genre *Guinardia*, du groupe *Pseudo-nitzschia seriata*, de *Leptocylindrus danicus*, *Cerataulina pelagica*, *Cylindrotheca closterium*, *Paralia sulcata* et des Cryptophycées.

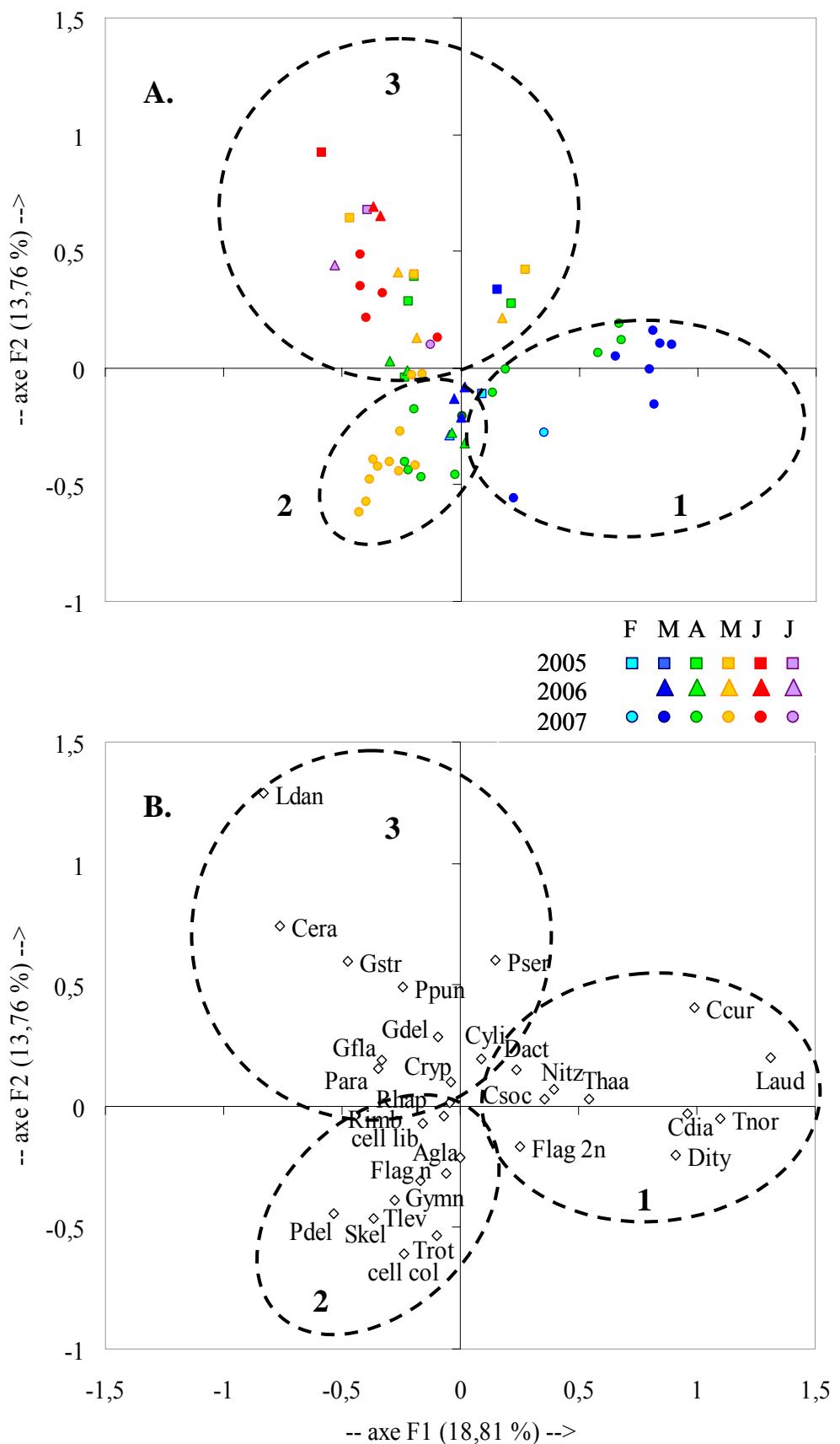


Figure III.11: Résultats de l'analyse factorielle des correspondances réalisées sur les données d'abondances des taxons phytoplanctoniques principaux [60 observations x 32 variables]. (A) Projections des observations et (B) projections des variables sur le plan défini par les axes 1 et 2. Voir le tableau III.3. pour les abréviations des taxons.

Cependant les périodes d'apparition et les contributions à l'abondance cellulaire variaient selon les années (**Fig. III.12**). L'assemblage 3 était observé au mois de février en 2005, mais n'a pas pu être observé en 2006 en raison du manque d'échantillonnage à la même période cette année-là, et était de nouveau présent entre juin et juillet en 2005 et 2006. Cet assemblage n'a pas fortement contribué en 2007. L'assemblage 2 était observé entre mars et mai avec une contribution maximale. L'apparition de cet assemblage a été plus précoce en 2006 où la contribution maximale a été observée en mars. L'assemblage 1 présentait des contributions maximales en mars au cours de la transition entre l'assemblage 3 et l'assemblage 2. Cet assemblage n'était pas dominant, à l'exception du printemps 2007, où les contributions maximales ont été importantes et une seconde apparition a eu lieu en juin, au détriment de l'assemblage 3 observé en 2005 et 2006.

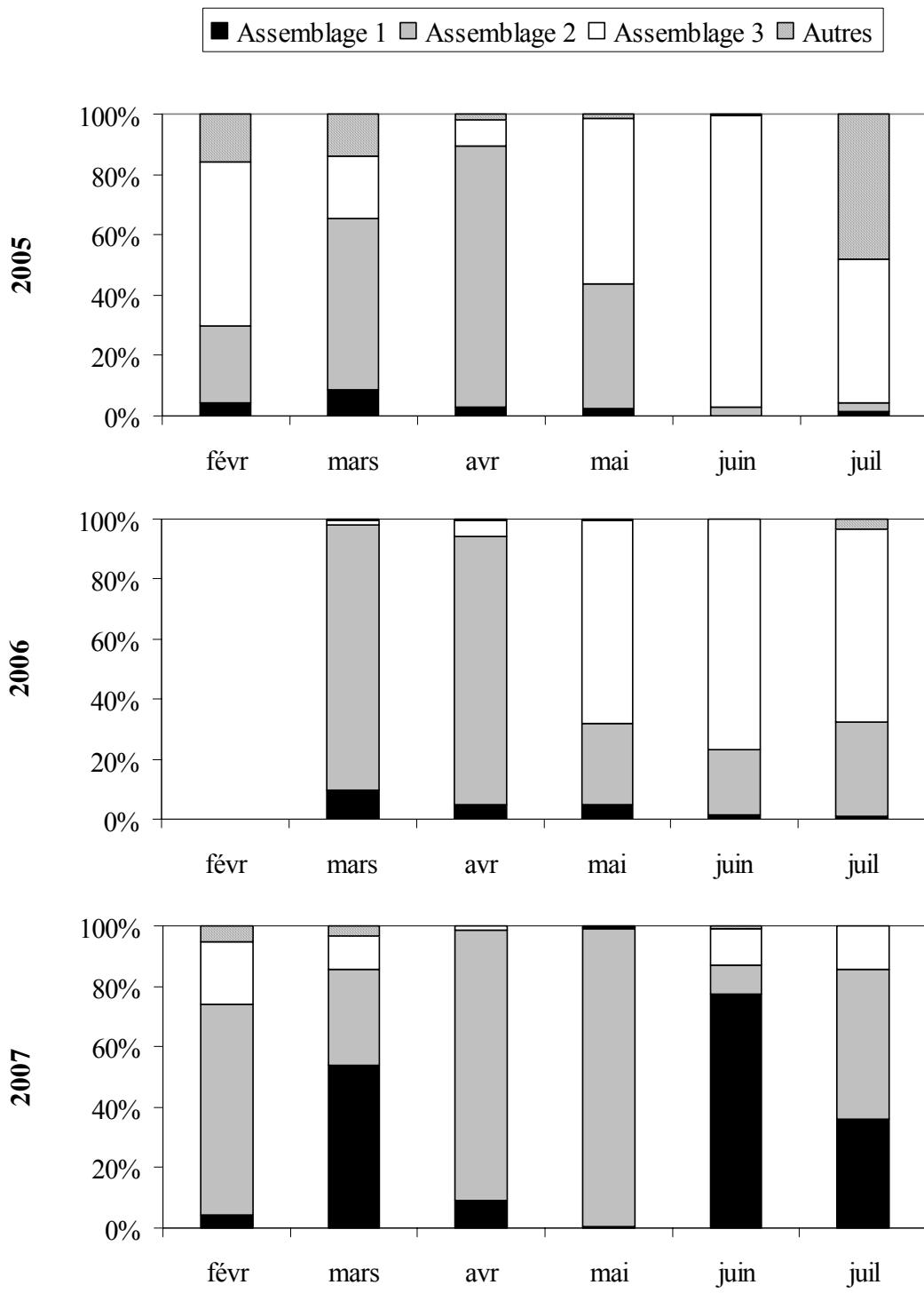


Figure III.12: Contributions mensuelles à l'abondance phytoplanctonique totale, à partir des abondances moyennes par mois des espèces appartenant aux trois assemblages déterminés par l'AFC. La catégorie « Autres » correspond aux espèces minoritaires.

IV.3. Relation entre les assemblages phytoplanctoniques et les variables environnementales

Une analyse de redondance (Analyse Canonique de Redondance, ACR) a été utilisée pour étudier les influences environnementales sur les assemblages phytoplanctoniques. L'analyse ACR indique que les variables environnementales sélectionnées expliquent significativement 52% de la variation temporelle des espèces phytoplanctoniques. Les deux premiers axes comptent pour 46,8% de la variance totale. Les corrélations entre les variables biologiques et environnementales sont fortes pour le premier (0,87) et le second (0,86) axe. Les concentrations en DIN (0,70), en SiOH (0,41) et en COD (-0,43) sont les principaux facteurs explicatifs de la variation des abondances des espèces le long du premier axe, tandis que le coefficient d'atténuation (-0,55), la température (0,55) et la concentration en ammonium (0,54) sont les principaux facteurs du deuxième axe (**Tableau III.5**). Nous pouvons en déduire que le premier axe représente un gradient nutritif, tandis que le second axe représente un gradient de stabilité de la colonne d'eau.

Tableau III.5 : Coefficients de corrélations entre les variables environnementales et les deux premiers axes de l'analyse ACR.

Variables (code)	Axe 1	Axe 2
Vitesse du vent (vent)	-0,1329	-0,2292
Débit de la Liane (débit)	0,1086	-0,0524
Température (T)	-0,3794	-0,5461
Salinité (S)	-0,2103	0,2770
Luminosité moyenne (PAR)	0,0533	0,1501
Coefficient d'atténuation (K)	-0,0851	-0,5574
Gradient de densité (cD)	-0,1525	-0,2416
Nitrate + nitrite (DIN)	0,7036	-0,0631
Ammonium (NH4)	0,1453	0,5425
Silicate (SiOH)	0,4148	0,2107
Phosphate (PO4)	0,3384	0,1439
Carbone organique dissous (COD)	-0,4310	-0,0048

L'ordination directe de la ACR représente la distribution des espèces par rapport aux gradients nutritifs et de stabilité (**Fig. III.13**) :

- Sur l'axe 1 représentatif du gradient nutritif, les espèces du genre *Chaetoceros*, *Thalassiosira nordenskioeldii*, *Thalassionema nitzschoides*, *Lauderia annulata*, *Ditylum brightwellii* et *Nitzschia sp.* sont associées à des conditions riches en sels nutritifs, en particulier en DIN. Ces espèces sont représentatives de l'assemblage 1. D'autres espèces sont opposées le long de cet axe, aux conditions riches en sels nutritifs et sont associées aux concentrations en COD. Il s'agit d'espèces appartenant à l'assemblage 2 telles que *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Skeletonema costatum* et *Gymnodinium sp.*
- Sur l'axe 2 représentatif du gradient de stabilité, les morphotypes de *Phaeocystis globosa* sont associés aux périodes de mélange. La plupart de ces morphotypes sont caractéristiques de l'assemblage 2. À l'opposé, d'autres espèces sont associées aux conditions stratifiées telles que les espèces des genres *Guinardia* et *Pseudo-nitzschia*, *Cerataulina pelagica*, *Leptocylindrus danicus*. Les conditions de stratification sont également associées à de fortes concentrations en ammonium, provenant des apports ponctuels observés à cette période et à la forte reminéralisation bactérienne.

Il faut noter que les espèces potentiellement toxiques du genre *Pseudo-nitzschia* sont distribuées le long du gradient nutritif (sels nutritifs et COD) avec *P. seriata* associée aux concentrations en sels nutritifs, opposée à *P. delicatissima* associée aux concentrations en COD.

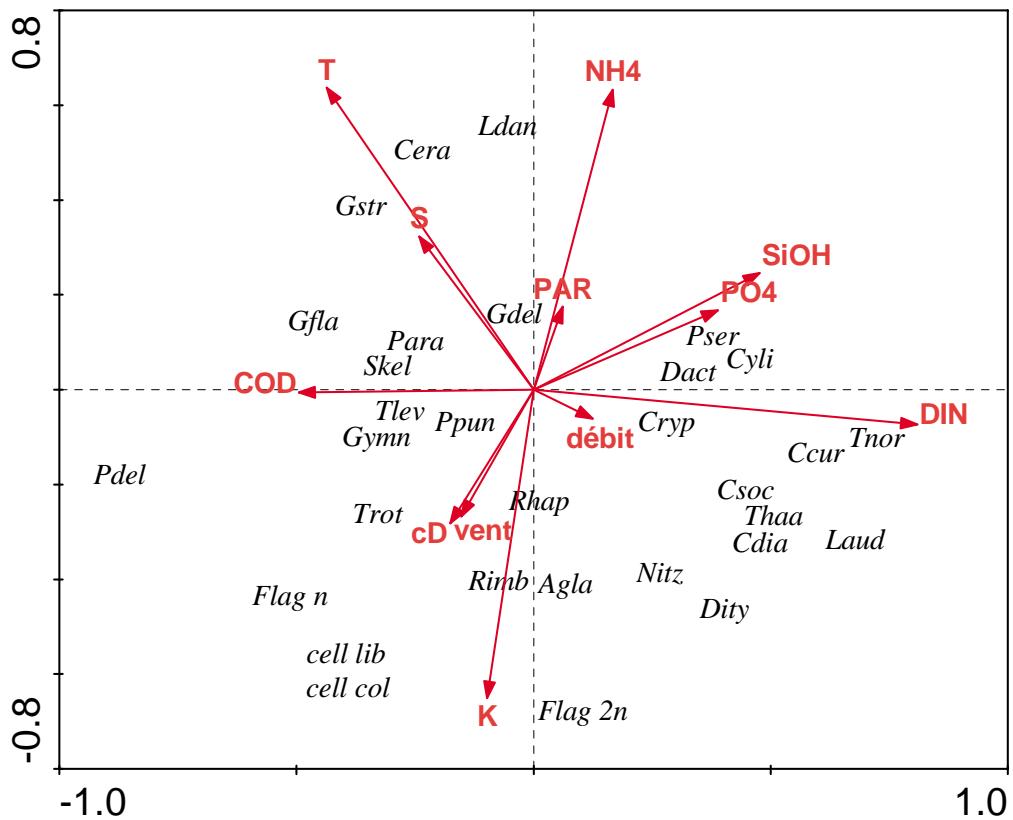


Figure III.13 : Diagramme d'ordination de l'analyse de redondance (ACR), réalisée sur l'ensemble des données d'abondance des espèces indicatrices ($n = 41$). Les vecteurs symbolisent les variables environnementales. Voir les Tableaux III.3 et III.5 pour les abréviations des taxons principaux.

Les corrélations de rang de Spearman ($p < 0,001$) indiquent que les concentrations en DIN et en silicates ainsi que la température et le coefficient d'atténuation K affectent le plus grand nombre d'espèces (**Tableau III.6**). En revanche, la salinité et la concentration en phosphate affectent peu d'espèces. *Thalassiosira nordenskioeldii* est l'espèce la plus représentative des conditions riches en sels nutritifs, tandis que *Pseudo-nitzschia delicatissima* est l'espèce la plus caractéristique de conditions pauvres en sels nutritifs inorganiques et riches en matière organique dissoute. Les morphotypes de *Phaeocystis globosa* sont fortement associés aux conditions de mélange, tandis que *Cerataulina pelagica*, *Leptocylindrus danicus* et *Guinardia striata* sont corrélés à la stratification indiquée par la température.

Tableau III.6. Coefficients de corrélation de rang de Spearman entre les variables hydro-biologiques et l'abondance des espèces dominantes. Seules les variables environnementales significatives et les espèces dont $p < 0,001$ sont représentées.

Les abréviations utilisées ici se réfèrent à celles utilisées dans les Tableaux III.3 et III.5.

Le nombre d'échantillons n varie, suivant les relations considérées, entre 26 et 60.

débit	COD	NH4	DIN	PO4	SiOH	T	S	K
Cera (-0,49)	Ppun (-0,48)	Flag 2n (-0,66)	Pdel (-0,66)	Pdel (-0,58)	cell lib (-0,58)	Thaa (-0,61)	Laud (-0,42)	Flag 2n (0,57)
Gstr (-0,45)	Pser (-0,45)	cell lib (-0,55)	Gfla (-0,49)	Tnor (0,47)	Flag n (-0,51)	Dity (-0,49)		cell lib (0,54)
Ldan (-0,44)	Gymn (0,65)	Flag n (-0,49)	Flag n (-0,46)		Pdel (-0,51)	Cera (0,63)		Rimb (0,52)
Thaa (0,42)	Pdel (0,51)	cell col (-0,44)	Tnor (0,58)		Gfla (-0,50)	Ldan (0,56)		cell col (0,44)
			Laud (0,56)		cell col (-0,49)	Gstr (0,51)		Agla (0,44)
			Ccur (0,45)		Tnor (0,54)			
					Cyli (0,51)			
					Csoc (0,47)			

Bilan : identification des groupes fonctionnels

En accord avec un récent travail d'Alves-de-Souza et al. (2008), les groupes fonctionnels sont identifiés sur la base à la fois du diagramme C-S-R, de l'analyse AFC et de l'analyse ACR. Nous pouvons considérer que deux espèces appartiennent à un même groupe fonctionnel, lorsqu'elles sont regroupées ensemble dans les trois analyses. Or les trois groupes sont composés d'espèces de stratégie différente:

- L'assemblage 1 est constitué de plusieurs espèces stratégies-R de petite taille du genre *Chaetoceros*, *Thalassiosira nordenskioeldii*, *Thalassionema nitzschoides* ($S/V \sim 0,5\text{-}1 \mu\text{m}^{-1}$) ainsi que des espèces stratégies-S de grande taille telles que *Lauderia annulata*, *Ditylum brightwellii* ou *Dactyliosolen fragilissimus* ($S/V < 1 \mu\text{m}^{-1}$). Ces espèces représentent un assemblage transitoire observé entre la fin de l'hiver et le début du printemps. Elles sont corrélées avec les concentrations en sels nutritifs, en particulier de nitrates+nitrites.
- L'assemblage 2 est constitué d'un mélange d'espèces de stratégie différente. Il est constitué essentiellement de stratégies-R de $S/V \sim 0,5\text{-}1 \mu\text{m}^{-1}$ tels que *Asterionellopsis glacialis*, *Thalassiosira rotula* ainsi que des espèces stratégies R de $S/V > 1 \mu\text{m}^{-1}$ telles que *Thalassiosira levanderi*, *Skeletonema costatum* et *Pseudo-nitzschia delicatissima*. La plupart des morphotypes de *Phaeocystis globosa* de stratégie C (cellules coloniales et flagellés haploïdes) et S (colonies) sont présents dans cet assemblage. Ils sont accompagnés d'un autre stratège S, le dinoflagellé *Gymnodinium sp.* Toutes ces espèces sont présentes au printemps et sont associées à des conditions de mélange, pauvres en sels nutritifs inorganiques mais riches en matière organique.
- L'assemblage 3 est constitué principalement d'espèces de stratégie R de $S/V < 0,5\mu\text{m}^{-1}$ du genre *Guinardia* (*G. delicatula* et *G. striata*), de *Leptocylindrus danicus* et *Cerataulina pelagica* proches des espèces de stratégie S telles que *Guinardia flaccida*. Ces espèces sont associées à des stratégies R de $S/V > 1 \mu\text{m}^{-1}$ du genre *Pseudo-nitzschia* (*P. seriata* et *P. pungens*) *Rhizosolenia imbricata* et les Cryptophytes du type *Plagioselmis prolonga*. Ces espèces présentent principalement de fortes abondances à la fin du printemps marqué par la mise en place des conditions estivales caractérisées par des températures élevées.

Discussion

Composition et développement des communautés phytoplanctoniques

La composition et la diversité en espèces dans la zone côtière étudiée (jusqu'à 66 espèces au printemps) sont comparables à celles d'autres études publiées sur les zones côtières Nord Européennes (i.e. 55 espèces en Baie Sud de la Mer du Nord ; Muylaert et al., 2006). Le site d'étude a déjà fait l'objet de travaux sur les communautés phytoplanctoniques mais ceux-ci ne rapportaient pas de diversité comparable (i.e. 45 taxons en 1997 au Sud de Boulogne-sur-mer, sur le site SOMLIT [Breton et al., 2000] et 38 taxons en 2003 entre Wimereux et la Baie de Somme [Schapira et al., 2008]). Cette différence pourrait être principalement attribuée à la fréquence d'échantillonnage plus élevée dans la présente étude que celles opérées dans ces travaux (un prélèvement hebdomadaire en moyenne par rapport à un prélèvement mensuel). Cette fréquence d'échantillonnage plus élevée a également permis de déceler des développements phytoplanctoniques de l'ordre de 15 à 30 jours. Cela signifie que la fréquence d'échantillonnage hebdomadaire constitue une échelle d'observation minimale pour suivre les blooms, comme préconisé par Dubelaar et al. (2004).

En zone côtière de la Manche orientale, le schéma saisonnier est typique des zones tempérées avec la prolifération printanière de différents groupes phytoplanctoniques en accord avec leurs préférences abiotiques particulières et leurs interactions avec les autres micro-organismes (autotrophes et hétérotrophes) et avec les brouteurs de plus grande taille. Les principaux changements dans la structure de la communauté sont dus aux variations d'abondance de 28 espèces dont 80% sont des diatomées (**Tableau III.3**). Les pics d'abondance et de biomasse printaniers en zone côtière de la Manche orientale sont principalement dus à des augmentations d'abondance de la Prymnésiophycée *Phaeocystis globosa*, d'espèces de diatomées (*Chaetoceros socialis*, *Pseudo-nitzschia seriata* et *delicatissima*, *Cerataulina pelagica*) et de Cryptophytes (*Plagioselmis prolonga*).

En général, *Phaeocystis globosa* représente l'espèce la plus abondante au cours du printemps (10^6 cell.L^{-1} ; 77% de l'abondance totale). Du fait de leur taille plus importante ($> 20 \mu\text{m}$; **Tableau III.3**), les diatomées dominent le plus souvent la biomasse du compartiment phytoplanctonique et se trouvent principalement en hiver et en fin de printemps associées aux Cryptophytes. Les Dinophytes et les nanoflagellés peuvent contribuer significativement à la biomasse phytoplanctonique au cours du printemps comme en 2007, mais nécessiteraient de

plus gros volumes de sédimentation et/ou des comptages en épifluorescence pour être estimés correctement.

Assemblages phytoplanctoniques et leurs caractéristiques écologiques

Il est important de connaître la structure des communautés phytoplanctoniques afin de comprendre leur dynamique. Les résultats suggèrent que le traitement des assemblages phytoplanctoniques en groupes taxonomiques (e.g. dinoflagellés, diatomées et nanoflagellés) pourrait entraîner une perte d'information étant donné qu'il s'agit de groupes d'espèces aux besoins écologiques et physiologiques différents.

La présente étude s'inscrit au sein d'une nouvelle approche dans le domaine de l'écologie du phytoplancton consistant en l'application du modèle proposé par Reynolds (Reynolds, 1988, 1996, 1997) et Reynolds et al. (2002). D'une manière générale, le modèle considère l'occurrence de groupes fonctionnels en interaction avec différents niveaux de conditions nutritives et de mélange et indépendamment de leurs caractéristiques saisonnières. D'après Reynolds et al. (2002), les groupes fonctionnels du phytoplancton consistent en des ensembles d'espèces aux caractéristiques morphologiques et physiologiques similaires. Objectivement, le travail effectué dans cette étude a consisté en trois analyses permettant d'identifier ces groupes fonctionnels : le diagramme C-S-R nous a permis d'identifier les groupes d'espèces basés sur leurs traits morphologiques tandis qu'avec la ACR, nous avons pu identifier des groupes d'espèces co-occurrentes sous les mêmes conditions environnementales.

Les assemblages rencontrés au printemps

Le diagramme C-S-R obtenu dans cette étude (**Fig. III.10**) est en accord avec Reynolds (1988). Il montre que les espèces phytoplanctoniques peuvent être assignées à une des trois stratégies C, S ou R indépendamment de leur origine phylogénétique. Toutefois, la majorité des espèces de diatomées présentes dans cette étude sont reconnues comme des stratégies-R. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude d'Alves-de-Souza et al. (2008), démontrant la distribution d'espèces de diatomées le long d'une diagonale interprétée comme la réminiscence du gradient r-K classique de Margalef (1978). Les espèces de diatomées prédominantes au cours des trois années d'étude sont concentrées dans la partie droite du gradient. Ceci confirme les observations réalisées à l'échelle saisonnière de Schapira et al. (2008) et Seuront et Vincent (2008) attestant de la prédominance d'espèces de sélection-r au printemps au cours des années 2003 et 2004 sur des sites proches.

Tableau III.7 : Comparaison des assemblages de diatomées rencontrés avant, pendant et après le bloom de *Phaeocystis globosa* en Manche orientale.

Site	Période	Assemblage pré-bloom	Assemblage bloom	Assemblage post-bloom	Références
Ambleteuse (point R1)	2005-2007	<i>Chaetoceros socialis</i> <i>Chaetoceros curisetus</i> <i>Chaetocerosdiadema</i> <i>Dactyliosolen fragilissimus</i> <i>Ditylum brightwellii</i> <i>Lauderia annulata</i> <i>Nitzschia</i> sp. <i>Thalassiosira nordenskioeldii</i>	<i>Asterionellopsis glacialis</i> <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> <i>Skeletonema costatum</i> <i>Thalassiosira levanderii</i> <i>Thalassiosira rotula</i>	<i>Cerataulina pelagica</i> <i>Cylindrotheca closterium</i> <i>Guinardia striata</i> <i>Guinardia delicatula</i> <i>Guinardia flaccida</i> <i>Leptocylindrus danicus</i> <i>Paralia sulcata</i> <i>Pseudo-nitzschia seriata</i> <i>Pseudo-nitzschia pungens</i> <i>Raphoneis amphiceros</i> <i>Rhizosolenia imbricata</i>	Chapitre III (cette étude)
Boulogne-sur-mer (point SRN1)	1992-2007	<i>Asterionellopsis glacialis</i> <i>Chaetoceros</i> sp. <i>Coscinodiscus wailesii</i> <i>Cylindrotheca closterium</i> <i>Ditylum brightwellii</i> <i>Eucampia zodiacus</i> <i>Melosira nummuloides</i> <i>Odontella sinensis</i> <i>Paralia sulcata</i> <i>Raphoneis amphiceros</i> <i>Skeletonema costatum</i> <i>Thalassionema nitzschoides</i> <i>Thalassiosira rotula</i> <i>Thalassiosira</i> sp.	<i>Lauderia annulata</i> <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	<i>Cerataulina pelagica</i> <i>Chaetoceros curisetus</i> <i>Chaetoceros socialis</i> <i>Guinardia delicatula</i> <i>Guinardia flaccida</i> <i>Guinardia striata</i> <i>Leptocylindrus</i> sp. <i>Pseudo-nitzschia seriata</i> <i>Pseudo-nitzschia</i> sp. <i>Rhizosolenia imbricata</i> <i>Rhizosolenia setigera</i>	Chapitre II

L'analyse AFC nous a permis d'identifier la succession de trois assemblages d'espèces entre février et juin des années 2005 à 2007 (**Fig. III.11**). La succession de trois assemblages de diatomées a déjà été mise en évidence à une échelle saisonnière à plus long terme au Chapitre II (**Tableau III.7**). La plupart des espèces des assemblages hivernal, printanier et estival définis sur le long terme à une échelle d'observation moins fréquente sont communes aux assemblages de pré-bloom, bloom et post-bloom définis à moyen terme à une échelle d'observation plus fréquente. Toutefois certaines différences entre les assemblages définis à chacune des échelles d'observation sont à noter.

L'assemblage hivernal précédant le bloom de *Phaeocystis globosa* est constitué des espèces de petite taille du genre *Chaetoceros* ($S/V > 0,5 \mu\text{m}^{-1}$) qui co-existent avec des espèces de plus grande taille telles que *Lauderia annulata* ou *Ditylum brightwellii* ($S/V < 0,5 \mu\text{m}^{-1}$). Cependant, dans les assemblages définis à une échelle saisonnière globale à plus long terme (**Tableau III.7**), les espèces de *Chaetoceros* appartiennent préférentiellement à l'assemblage estival, comme il a déjà été rapporté par Seuront et Vincent (2008). La coexistence entre espèces de petite taille et espèces de grande taille serait attribuée à des apports de nutriments ponctuels suivant des événements météorologiques (Schapira et al., 2008). Les espèces de *Chaetoceros* présentent une forte affinité pour les concentrations élevées en nutriments, en particulier en nitrate et en silicate (**Tableau III.6**). Ces espèces sont reconnues comme étant opportunistes, à croissance rapide et par conséquent capables de répondre rapidement aux nutriments nouvellement introduits par les fleuves ou précipitations (Malej et al., 1995) et constituent selon Frontier (1985), les premières espèces indicatrices de phase d'eutrophisation.

L'assemblage printanier au cours du bloom de *P. globosa* est constitué d'un mélange d'espèces de stratégies différentes. Il correspond au développement de la plupart des morphotypes de *Phaeocystis globosa* (e.g. cellules colones libres et en colonies, flagellés haploïdes), mais également de *Pseudo-nitzschia delicatissima* et du dinoflagellé *Gymnodinium sp.* L'association de *P. globosa* et de *P. delicatissima* est également observée dans l'assemblage printanier défini à plus long terme (**Tableau III.7**). *P. delicatissima* présente une forte affinité pour *P. globosa*, et on la retrouve régulièrement associée aux colonies, le % de colonies couvertes de ces diatomées augmentant avec l'augmentation de la taille des colonies de *P. globosa* (Sazhin et al., 2007). La corrélation entre l'abondance de *P. delicatissima* et les concentrations en COD ($\rho = 0,51$; $p < 0,05\%$; **Tableau III.6**) attesterait de la capacité de cette espèce à explorer des environnements riches en matière organique. Cet assemblage comprend également des espèces comme *Asterionellopsis glacialis*, *Skeletonema*

costatum, *Thalassiosira* spp., généralement caractéristiques de la période hivernale (**Tableau III.7** ; Schapira, 2005 ; Seuront et Vincent, 2008). Ces espèces de petite taille ($S/V > 0,5 \mu\text{m}^{-1}$) apparaissent particulièrement liées aux conditions de mélange, comme le montre la relation entre *Asterionellopsis glacialis* et le coefficient d'atténuation de la lumière K (**Tableau III.6**). L'assemblage estival suivant le bloom de *P. globosa* comprend principalement des espèces de grande taille ($S/V < 0,5 \mu\text{m}^{-1}$) du genre *Guinardia* (*G. delicatula* et *G. striata*), *Leptocylindrus danicus* et *Cerataulina pelagica*. Ces espèces de diatomées sont similaires à celles de l'assemblage estival défini sur le long terme (**Tableau III.7**). Elles présentent une forte affinité pour les eaux à température plus élevée (**Tableau III.6**). Cependant, il est à noter la présence dans cet assemblage d'espèces tychopélagiques telles que *Paralia sulcata* et *Raphoneis amphiceros*, habituellement observées en automne et en hiver en Manche orientale et en Mer du Nord (**Tableau III.7** ; Rousseau et al., 2002 ; Muylaert et al., 2006). Parmi les espèces de *Pseudo-nitzschia* présentes dans les assemblages, *Pseudo-nitzschia seriata* est considérée comme potentiellement toxique (Fehling et al., 2004). L'apparition de ces espèces dans les assemblages est relativement récente. Comme montré dans le Chapitre I, leur présence est plus importante depuis les années 2000. Des observations similaires ont été faites par Muylaert et al. (2006) en Mer du Nord, qui recense des espèces du genre *Pseudo-nitzschia* en 2003 non relevés dans l'étude de Rousseau et al. (2002) en 1995. Au cours de la présente étude, les espèces du genre *Pseudo-nitzschia* sont séparées dans deux assemblages distincts (i) *Pseudo-nitzschia delicatissima* dans un assemblage printanier et (ii) *P. seriata* et *P. pungens* dans un assemblage estival. Une telle séparation a déjà été établie par Fehling et al. (2006), constatant des dynamiques saisonnières différentes entre le « groupe-*seriata* » (i.e. *P. seriata*, *P. pungens*) et le « groupe-*delicatissima* » (i.e. *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*).

Schéma de succession des assemblages phytoplanctonique

L'analyse ACR a montré que 52% de la variabilité totale des trois assemblages phytoplanctoniques était expliquée par les sels nutritifs, la lumière et les conditions de mélange. La distribution des espèces au sein de ces assemblages est dépendante du degré de stabilité et de concentrations en nutriments. On observe principalement une répartition des espèces stratégies-R dans des conditions riches en sels nutritifs et soumises au mélange comme en hiver, les espèces de stratégie C dans des conditions riches en sels nutritifs et stables comme souvent au printemps et les espèces de stratégie S dans des conditions pauvres en sels nutritifs et stables comme en été. Ces résultats correspondent à l'« intaglio » de

Reynolds établissant la succession saisonnière des assemblages rencontrés en zone côtière (Smayda et Reynolds, 2001 ; **Fig. III.14**). Ces auteurs ont proposé une approche similaire à celle formulée par Margalef (Margalef, 1978) dans laquelle la combinaison de la disponibilité en sels nutritifs et le degré de mélange détermine la structure des assemblages. Cependant, ce modèle inclut plusieurs modifications : (i) il considère deux axes, la turbulence et les nutriments comme étant des variables indépendantes ; (ii) l'axe de la turbulence se réfère principalement au mélange vertical relatif à la diminution de la lumière avec la profondeur et (iii) la convergence des propriétés physiologiques et morphologiques des espèces caractérise les groupes fonctionnels pour lesquels l'origine phylogénétique des espèces n'est pas pertinente.

Cependant à l'échelle du printemps, les assemblages apparaissent principalement sous la forme d'associations hétérogènes en termes de traits morphologiques. Ils révèlent qu'à court terme des variations environnementales interviennent de manière répétée au cours de la saison, entraînant des changements dans la structure des communautés (Pannard et al., 2008a).

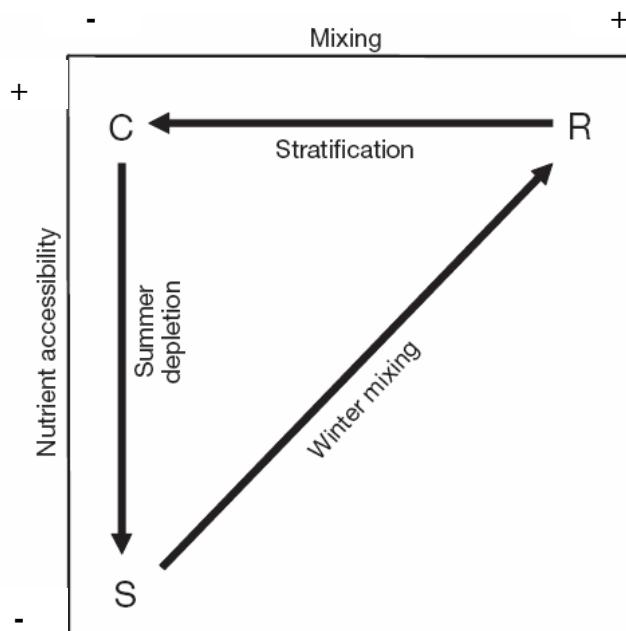


Figure III.14 : Schéma de succession saisonnière des stratégies de vie phytoplanctoniques selon les composantes C-S-R en relation avec la disponibilité des sels nutritifs et le degré de mélange de la colonne d'eau. Ce schéma est issu de Phlips et al. (2006) d'après Smayda et Reynolds (2001).

Dynamique saisonnière et écologie des morphotypes de *Phaeocystis globosa*

Dans une revue sur les connaissances actuelles de l'écologie de *Phaeocystis*, Verity et al. (2007b) ont souligné l'importance de considérer la totalité du cycle de vie pour mieux comprendre son rôle dans les écosystèmes marins. Cependant, l'occurrence et l'abondance relative des stades flagellés sont encore mal connues, principalement à cause des difficultés méthodologiques inhérentes à leur identification et quantification (Cf. Chapitre I). Grâce à une étude sur les morphotypes prédominants de *Phaeocystis globosa* dans le milieu d'étude au microscope électronique à balayage (Guiselin et al., 2009 ; **Annexe 1**), nous avons suivi les abondances de ces différents stades de vie pour évaluer les avantages de ces transitions de stade au sein des communautés phytoplanctoniques. Les résultats soulignent l'importance des cellules coloniales libres et de flagellés haploïdes dans le milieu (**Fig. III.6**). Il est communément admis que les colonies représentent la forme majoritaire de *Phaeocystis* pendant le bloom (Lancelot et Rousseau, 1994 ; Chen et al., 2002 ; Gieskes et al., 2007). La formation des colonies réduit l'impact de la prédation du zooplancton sur la population de *Phaeocystis globosa* (voir pour une revue Netjstgaard et al., 2007). Les cellules isolées sont susceptibles d'être broutées par le microzooplancton dont les représentants ont des taux de croissance comparables à ceux de leurs proies. De plus, elles souffrent de pertes dramatiques par lyse virale (Jacobsen et al., 1996 ; Brussard et al., 1999). La plus forte proportion de colonies en 2007 pourrait être induite par la présence de zooplancton. La transition des cellules libres en colonies réduirait la mortalité de la population, et ce, via une communication chimique entre les colonies et le zooplancton (Jakobsen et Tang, 2002 ; Tang, 2003). Dans ce cas, il s'agirait d'un contrôle de la population de *P. globosa* de type « top-down » plutôt que « bottom-up », ce qui reste à confirmer.

Différentes hypothèses ont été avancées sur les transitions entre les différents morphotypes (voir pour une revue Rousseau et al., 2007). La transition du stade flagellé en stade colonial n'a pas pu être observée en 2006 en raison de la précocité du bloom de *P. globosa* par rapport à notre échantillonnage, et en 2007, tous les morphotypes sont apparus en même temps (**Fig. III.6**). Seul un décalage évident a été observé pendant le bloom de l'année 2006, entre les colonies et les flagellés haploïdes, attestant la libération des flagellés haploïdes à partir des colonies, comme déjà mentionné par Peperzak et al. (2000) et Rousseau et al. (2007).

Une importante variabilité interannuelle des flagellés diploïdes et des colonies a été observée avec des développements à différents moments du printemps. Les flagellés diploïdes ne sont observés qu'occasionnellement dans le milieu (Kormann, 1955 ; Peperzak et al., 2000). Les

résultats des analyses AFC et ACR attestent de l'apparition préliminaire des flagellés diploïdes qui n'appartiennent pas au même assemblage que les autres morphotypes. L'apparition de ce morphotype serait lié à un processus sexuel appelé syngamie qui consiste en la fusion de deux flagellés haploïdes (Peperzak et al., 2000) et serait à l'origine du bloom de cellules coloniales (Kornmann, 1955).

Au niveau écologique, les morphotypes correspondent à une diversité de stratégies adaptatives, pouvant expliquer le succès de *Phaeocystis globosa* dans son milieu (Verity et Medlin, 2003). Le stade diploïde (e.g. cellules coloniales et flagellés diploïdes) est considéré comme un stratège de sélection-r, caractérisé par un fort taux de croissance, utilisant les sels nutritifs inorganiques et résistant à la turbulence. Le stade haploïde (e.g. flagellés haploïdes) est considéré comme stratège de sélection-K, caractérisé par un faible taux de croissance, adapté aux conditions limitées en sels nutritifs et capable d'utiliser la mobilité et le mixotrophie (Valero et al., 1992 dans Rousseau et al., 2007). Ce modèle connu sous le nom de « Mandala de Margalef » n'est pas suffisant pour décrire la succession des stades de vie de *Phaeocystis globosa*. Il n'explique pas les taux de production importants de flagellés haploïdes comparables à ceux des cellules coloniales. De plus, la turbulence serait un facteur limitant dans la formation des colonies (Schapira et al., 2006). Comme pour les autres espèces rencontrées dans cette étude, l'approche de Reynolds et al. (2002) apparaît plus appropriée pour expliquer le cycle de vie de *Phaeocystis globosa* et consiste en la combinaison de la disponibilité en sels nutritifs avec le degré de mélange du milieu. Le diagramme C-S-R indique une distribution des morphotypes parmi les trois stratégies adaptatives avec (i) les cellules coloniales libres et les flagellés diploïdes en stratégie-C, (ii) les cellules coloniales en colonie en stratégie-S et (iii) les flagellés haploïdes à la limite entre les stratégies R et C.

Variabilité inter annuelle et facteurs de contrôle

A partir des concentrations chlorophylliennes et/ou des abondances et biomasses phytoplanctoniques totales, nous avons pu définir en un premier temps deux blooms successifs, pouvant correspondre à plusieurs poussées d'espèces différentes : (i) un bloom printanier (B1) et (ii) un bloom pré-estival (B2). Dans de nombreuses études en milieu naturel et en mésocosme, les blooms printaniers de *Phaeocystis* sont co-occurents avec, ou suivent les blooms de diatomées (Peperzak et al., 1998 ; Goffart et al., 2000 ; Rousseau et al., 2002 ; Tungaraza et al., 2003 ; Larsen et al., 2004), ce qui a été le cas dans le cadre de notre étude, au printemps 2006 et 2007. D'autre part, les blooms pré-estivaux de diatomées sont connus sur le

site d'étude (Lamy, 2006) et peuvent parfois être plus importants que les blooms printaniers, comme en 2005 (**Fig. III.3**).

L'analyse des variables environnementales et phytoplanctoniques indique l'absence d'un schéma régulier et récurrent et confirme l'importante variabilité interannuelle déjà observée dans les travaux antérieurs réalisés en Manche orientale (Brunet et al., 1996 ; Breton et al., 2000). La variabilité interannuelle des communautés phytoplanctoniques relève à la fois (i) d'un décalage temporel dans la succession des espèces et (ii) d'une variabilité propre aux communautés (e.g. taux de croissance, capacité de colonisation des assemblages).

Déterminisme des « blooms printaniers »(B1)

Les hivers des trois années de suivi sont marqués par de fortes concentrations en sels nutritifs aussi importantes que leur constante classique de demi-saturation respective K_s pour leur absorption : <0,1 µM pour les phosphates, 0,5 µM pour les nitrates et 2 µM pour les silicates ; Thingstad et al. 1993. Del Amo et Brzezinski 1999 ; Kudela et Cochlan 2000). Par conséquent, la concentration en nutriments ne constitue pas un facteur limitant la croissance phytoplanctonique en fin d'hiver.

Le premier bloom du printemps 2005 est de faible intensité (< 5 µg.Chl a. L⁻¹ ; **Fig. III.1-G**) principalement causé par un faible développement de *Phaeocystis globosa* (< 0,5. 10⁶ cell.L⁻¹ ; **Fig. III.7-A**) et la quasi absence de développement de diatomées. Le démarrage de ce faible développement phytoplanctonique correspondrait à une période de mélange important de la colonne d'eau (**Fig. III.7-B**). Gomez et Souissi (2008) ont également constaté l'absence de bloom au cours du printemps 2005 dans une station au sud de Boulogne sur Mer (station SOMLIT). D'après ces auteurs, l'absence de bloom de *P. globosa* serait attribué à plusieurs facteurs : (i) à un retard de stratification de la colonne d'eau, (ii) à une faible disponibilité de la lumière due à la turbidité (sédiments en suspension) et à la matière organique et (iii) à la compétition avec les diatomées tychopélagiques.

Nos résultats corroborent les deux premières hypothèses avec l'observation d'un mélange important de la colonne d'eau (**Fig. III.2-C1**) ainsi que d'une importante turbidité (**Fig. III.2-B1**) et des concentrations élevées de matière organique (**Fig. III.1-H**) non reliées à la biomasse phytoplanctonique.

Les études antérieures mettent en évidence l'étendue de la période productive d'avril à mai (Brunet et al, 1992 ; Brylinski et al., 1996 ; Gentilhomme et Lizon, 1998 ; Seuront et al., 2006). Le bloom relevé en mars 2006 apparaît donc précoce par rapport aux conditions habituelles d'apparition. L'existence de blooms phytoplanctoniques précoces dans cette zone

est une caractéristique du cycle annuel récemment mis en évidence par Schapira (2005) et Lamy et al. (2006) pour l'année 2003. Une stratification précoce de la colonne d'eau serait à l'origine de l'apparition dès la fin de l'hiver de *P. globosa*, comme l'atteste l'augmentation du gradient de densité (**Fig. III.2-C2**).

Les blooms annuels de *Phaeocystis globosa* ont été observés dans les zones côtières eutrophisées de la Mer du Nord (Cadée, 1986) et suivent généralement un premier bloom de diatomées, en particulier de *Chaetoceros sp.* (Rousseau et al., 2002), ce qui a pu être confirmé au cours de la précédente étude en fin d'hiver 2006 et 2007. Une variété de facteurs déclenchant les blooms de *P. globosa*, en particulier l'initiation des colonies à partir de cellules seules ont été proposés, incluant la température, la lumière et les sels nutritifs (Verity et al., 1991 ; Vaulot et al., 1994 ; Peperzak et al., 2000). *Phaeocystis* peut aussi être un important compétiteur pour les sels nutritifs avec les diatomées (Escaravage et al., 1995 ; Jacobsen, 2000). *Phaeocystis* se développerait notamment lorsque les conditions nutritives limitantes en silice sont atteintes (Reid et al., 1990), tandis que les diatomées auraient un avantage compétitif sur *Phaeocystis* en conditions riches en silice, dû à leur taux de croissance plus élevé et à leur capacité de stockage plus importante (Egge et Asksnes, 1992 ; Escaravage et al., 1995). Cependant, Peperzak et al. (1998) ont avancé l'effet potentiel d'une limitation en phosphore plutôt qu'une limitation en silice sur le développement de *Phaeocystis*. Cette hypothèse a été évoquée depuis dans divers travaux tels que ceux de van der Zee et Chou (2004) et Veldhuis et al. (2005). D'après les concentrations en sels nutritifs enregistrées au début de la prolifération de *Phaeocystis* en 2007, les concentrations en phosphates étaient faibles, c'est-à-dire inférieures à 0,1 µM (**Fig. III.1-F**). Cette hypothèse pourrait expliquer en partie l'absence de bloom de *Phaeocystis* en 2005. En effet, l'absence de développement préliminaire de diatomées n'a pas entraîné de consommation totale des stocks hivernaux de phosphates en 2005 comme l'attestent les teneurs supérieures à 0,1 µM jusqu'au mois de juin (**Fig. III.1-F**). Quand les concentrations en phosphate inorganique sont faibles, *Phaeocystis* est capable de produire les enzymes extracellulaires phosphatases alcalines (Van Boekel et Veldhuis, 1990), lui conférant la potentialité de croître sur du phosphate organique (Van Boekel 1991).

Peperzak et al. (1998) soulignent également que la disponibilité en lumière dans la colonne d'eau aurait un rôle plus important. Un seuil de luminosité ($> 100 \text{ W.h.m}^{-2}.j^{-1}$) serait requis pour le développement de *P. globosa*. Le seuil requis pour la croissance des diatomées ($> 50 \text{ W.h.m}^{-2}.j^{-1}$) serait en revanche inférieur à celui de *Phaeocystis* (Riley, 1957 ; Gieskes et Kraay, 1975). De tels seuils de luminosité n'ont pu être mis en évidence dans le cadre de cette

étude. Cependant, le degré de mélange (cD), utilisé comme indice de stratification, suggère une importante remise en suspension coïncidant avec un maximum de turbidité à la fin de l'hiver 2005. Ces conditions de luminosité défavorables auraient ainsi empêché le déclenchement du bloom de *Phaeocystis* en 2005. Par ailleurs, les faibles luminosités favoriseraient la formation des colonies, tandis que les fortes luminosités et températures favoriseraient les cellules seules de *Phaeocystis* (Verity et al., 1991 ; Jacobsen, 2000). La relation entre le coefficient d'atténuation K de la lumière et les concentrations de Chl *a* au moment de la prolifération des colonies de *Phaeocystis* atteste de cette hypothèse (**Fig. III.2-B**).

Déterminisme des blooms pré-estivaux (B2)

L'état de maturité (proportion d'espèces dominantes) révèle le degré d'organisation et de complexité de l'écosystème. Le schéma de succession est le même d'année en année, cependant la chronologie, la contribution des différentes espèces et leur proportion changent. En particulier, la prolifération des cellules de *P. globosa* entraîne une diminution importante de la diversité (**Fig. III.3-A**) ainsi que des modifications de l'écosystème.

Les blooms répertoriés à la suite du bloom printanier principal ont été observés à la suite d'apports de nutriments ponctuels (en particulier des formes azotées) reliés à des événements météorologiques (Lewis 1978). Ce type d'événement s'est traduit en 2005 par un bloom de *Cerataulina pelagica* et a conduit en 2007 au retour dans la colonne d'eau de *Chaetoceros socialis*, espèce proliférant en début de printemps la même année. L'analyse à long terme réalisée à Boulogne-sur-Mer au Chapitre II avait déjà révélé l'apparition de bloom de ces espèces considérées comme exceptionnelles vis-à-vis des 15 ans d'étude. Des blooms inhabituels de *Cerataulina pelagica* ont déjà été observés dans d'autres milieux. En zone côtière de la Nouvelle Zélande durant les trois mois d'été 1982-83, le bloom de *Cerataulina* a pu être relié à des conditions calmes associées à un inhabituel faible indice de l'Oscillation Sud (Taylor et al., 1985). De même en Mer Baltique en automne 2005, des observations du service de surveillance HELCOM révélaient un bloom de *Cerataulina pelagica* accompagnés de *Dactyliosolen fragilissimus* et de *Chaetoceros brevis*, espèces connues comme marines avec une affinité pour les eaux saumâtres et indicatrices d'un flux entrant d'eau chaude et riche en sels nutritifs.

Les apports en azote inorganique dissous en zone côtière provoqueraient également une augmentation de l'abondance de *Pseudo-nitzschia* spp. (Hasle et al., 1996; Parsons et al., 2002). L'amplitude de ces blooms, selon la littérature, peut être stimulée par des apports

ponctuels d'azote, principalement NH_4^+ et NO_3^- . Par exemple, Cusak et al. (2004) et Kaczmarśka et al. (2007) ont trouvé que la présence de *P. delicatissima* était corrélée avec des environnements riches en nitrates, tandis que les environnements riches en phosphates favoriseraient la croissance de *P. pungens*.

Dans le cadre de notre étude, le bloom de *Pseudo-nitzschia delicatissima* observé en 2007 démarrait lorsque les concentrations en COD étaient maximales. Une étude expérimentale suggère que sous une faible disponibilité en nitrate et ammonium, *P. delicatissima* serait capable d'utiliser l'urée comme source alternative d'azote (Loureiro et al., 2008). De plus, elle serait capable de puiser cette source d'azote à partir de matière organique dissoute et pourrait produire d'avantage d'acide domoïque, ce qui conférerait la toxicité aux cellules, plus importante que chez celles se développant sur les composés inorganiques d'azote (Howard et al., 2007).

En conclusion, les blooms de fin de printemps de *Cerataulina pelagica* (2005) et de *Chaetoceros socialis* (2007) reposeraient sur des apports de sels nutritifs, suggérant une production nouvelle de phytoplancton. En revanche, les blooms des espèces du genre *Pseudo-nitzschia* (2006 et 2007) seraient dus à la reminéralisation de matière organique, suggérant une production régénérée de phytoplancton.

Différentes échelles de variabilité et conditions climatiques

Nos résultats suggèrent que les conditions hydro-climatiques seraient le principal facteur responsable de la forte variabilité interannuelle des communautés phytoplanctoniques. Les conditions météorologiques rencontrées au cours des printemps 2005, 2006 et 2007 semblent avoir joué un rôle important sur la structure phytoplanctonique. Deux échelles de changement au sein de la communauté phytoplanctonique peuvent être distinguées : (i) des changements instantanés liés aux événements de mélange et (ii) des changements avec décalage temporel (temps de développement des populations) associés aux changements de lumière ou de disponibilité en sels nutritifs (Pannard et al. 2008a).

Parmi les changements instantanés, nous avons observé un retour de la structure des communautés présentes après le bloom de *Phaeocystis* à un assemblage initial précédent le bloom de *Phaeocystis* (*Chaetoceros socialis* en juin 2007), qui était relié à des apports en sels nutritifs (Lewis 1978). Cependant ces apports ponctuels n'induisent pas toujours de changements qualitatifs de structure des communautés mais des changements quantitatifs de biomasse. Par exemple, suite à un apport en sels nutritifs en 2006, nous avons observé une

augmentation de l'abondance de *Pseudo-nitzschia seriata* déjà en développement (**Fig. III.8-A**).

Concernant les changements avec décalage, l'impact de la lumière peut excéder celui d'une limitation en sels nutritifs (Colijn et Cadée, 2003). La transformation des éléments nutritifs en biomasse algale requiert des radiations solaires comme source d'énergie nécessaire à la photosynthèse. Ainsi, l'expression de l'eutrophisation peut être contrainte par les processus physiques qui gouvernent la disponibilité de l'énergie lumineuse pour le phytoplancton.

Il est reconnu que les panaches fluviaux, comme ceux de la Loire et la Gironde dans le Golfe de Gascogne, peuvent modifier le calendrier des blooms et induire d'importants blooms hivernaux par l'établissement d'une stratification haline (« panache de dilution ») plus précoce que la stratification thermique (Labry et al., 2001). A l'inverse, la turbidité hivernale liée aux apports en eau douce des principaux exutoires (« panache turbide ») limite la croissance phytoplanctonique en atténuant la pénétration verticale de la lumière (Mann et Lazier, 1996 ; Kristiansen, 1998 ; Labry et al., 2002). Par conséquent, en zones tempérées et à proximité de la côte, la turbidité des eaux est le facteur qui détermine alors la disponibilité de la lumière, i.e. la charge de matière en suspension originaire des apports par les fleuves et/ou de la remise en suspension sous contrôle de l'amplitude de la marée et du forçage par le vent. L'hiver 2004/2005 a déjà été rapporté comme étant particulier (Gomez et Souissi, 2008). D'après ces auteurs, les températures enregistrées en dessous des normales saisonnières ont pu retarder la mise en place d'une stratification thermique. Cependant, les températures les plus froides ont été enregistrées en 2006 (**Tableau III.1**) et nos résultats attestent de l'absence de stratification liée principalement à la salinité. Le début de l'année 2007 a également été marqué par des conditions climatiques perturbées qui se sont traduits par un établissement tardif de la stratification. Ainsi, l'absence de stratification rendraient les conditions de lumière défavorables et par conséquent, aucun développement de phytoplancton n'aurait lieu pendant ces épisodes de mélange de fin d'hiver. Le fait que le bloom de *Phaeocystis* se soit tout de même déclenché en 2007, résiderait dans l'établissement d'autres conditions telle qu'un épuisement en phosphore par exemple.

En conclusion, nos résultats ont permis de mieux comprendre la structure des communautés phytoplanctoniques au cours de la période productive. Cette structure s'exprime principalement en terme d'assemblages hétérogènes d'espèces voire de stades de vie présentant des stratégies de survie diverses. Nous pouvons également souligner l'importance écologique de *Phaeocystis globosa* sur son milieu. Cette espèce peut modifier

significativement la structure phytoplanctonique par un apport massif de composés organiques dans le milieu. Cette matière organique stimulerait particulièrement le développement d'espèces potentiellement toxiques du genre *Pseudo-nitzschia*, comme il a été déjà observé dans Sazhin et al. (2007).. De tels blooms ne sont pas prévisibles, mais l'identification d'assemblages d'espèces dominantes permet de connaître les espèces susceptibles de proliférer. En outre, il a également été démontré que des événements météorologiques ayant lieu à courte échelle de temps pouvaient influencer les variations observées à plus grande échelle, agissant directement sur l'abondance des espèces ou indirectement sur les conditions de sels nutritifs et de lumière. Il serait intéressant de mener une étude à une fréquence d'observation plus fine.

CHAPITRE IV

Application de la cytométrie en flux à l'étude de la variabilité à court terme du phytoplancton

Introduction

La zone côtière est un système ouvert soumis à une forte variabilité des conditions physiques et chimiques, essentiellement due à l'hydrodynamisme (e.g. courants de marée, fronts côtiers, turbulence) et aux apports d'eau douce. Les populations phytoplanctoniques présentes sont influencées à la fois par les facteurs locaux inhérents à la masse d'eau et par les transports horizontaux induits par les courants de marée, les mouvements advectifs et le vent (Cloern, 1996). Ces facteurs fluctuent selon des échelles de temps différentes allant d'un cycle de marée à des saisons entières (Cassayas, 2000).

Le phytoplancton constitue un indicateur très dynamique (Smayda, 1998) de part sa grande diversité en espèces, ses forts taux de croissance (jusqu'à plus d'une division par heure ; Furnas, 1991) et des réponses rapides aux changements de conditions physiques et chimiques (Cloern, 2001). Nous avons vu dans les chapitres précédents que les événements phytoplanctoniques tels que les efflorescences provoquaient d'importants changements dans la structure des communautés. De tels phénomènes prennent place lorsqu'une espèce du phytoplancton se reproduit à un taux plus élevé que celui des pertes cellulaires, s'accumulant dans un court laps de temps.

Le suivi de la variabilité des blooms est traditionnellement accompli par des observations microscopiques laborieuses d'échantillons discrets d'eau de mer. Ces contraintes méthodologiques rendent difficile le suivi des successions de blooms, des espèces responsables de ces blooms, de la variabilité de leur écophysiologie et de leur magnitude potentielle (Smayda, 1997). Les fréquences d'observation employées entraînent une perte importante d'informations non seulement par rapport aux poussées phytoplanctoniques mais également vis à vis des changements des communautés (Dubelaar et al., 2004 ; **Fig. IV .1**). En tenant compte d'un taux de croissance commun du phytoplancton, la fréquence d'échantillonnage théorique à appliquer dans le cadre d'une surveillance serait d'une fois par jour.

L'utilisation d'une nouvelle génération d'instruments bio-optiques capables d'accéder rapidement à différents aspects de la dynamique phytoplanctonique est en plein essor. Parmi ces techniques, l'analyse du phytoplancton par cytométrie en flux a déjà confirmé avec succès sa capacité à détecter le phytoplancton au niveau de groupes et de certaines espèces (Takabayashi et al., 2006 ; Anglès et al., 2008 ; Thyssen, 2008). De plus, cette technique présente un intérêt grandissant dans la détection précoce de blooms d'algues nuisibles (Rutten et al., 2005 ; Buskey et Hyatt, 2006).

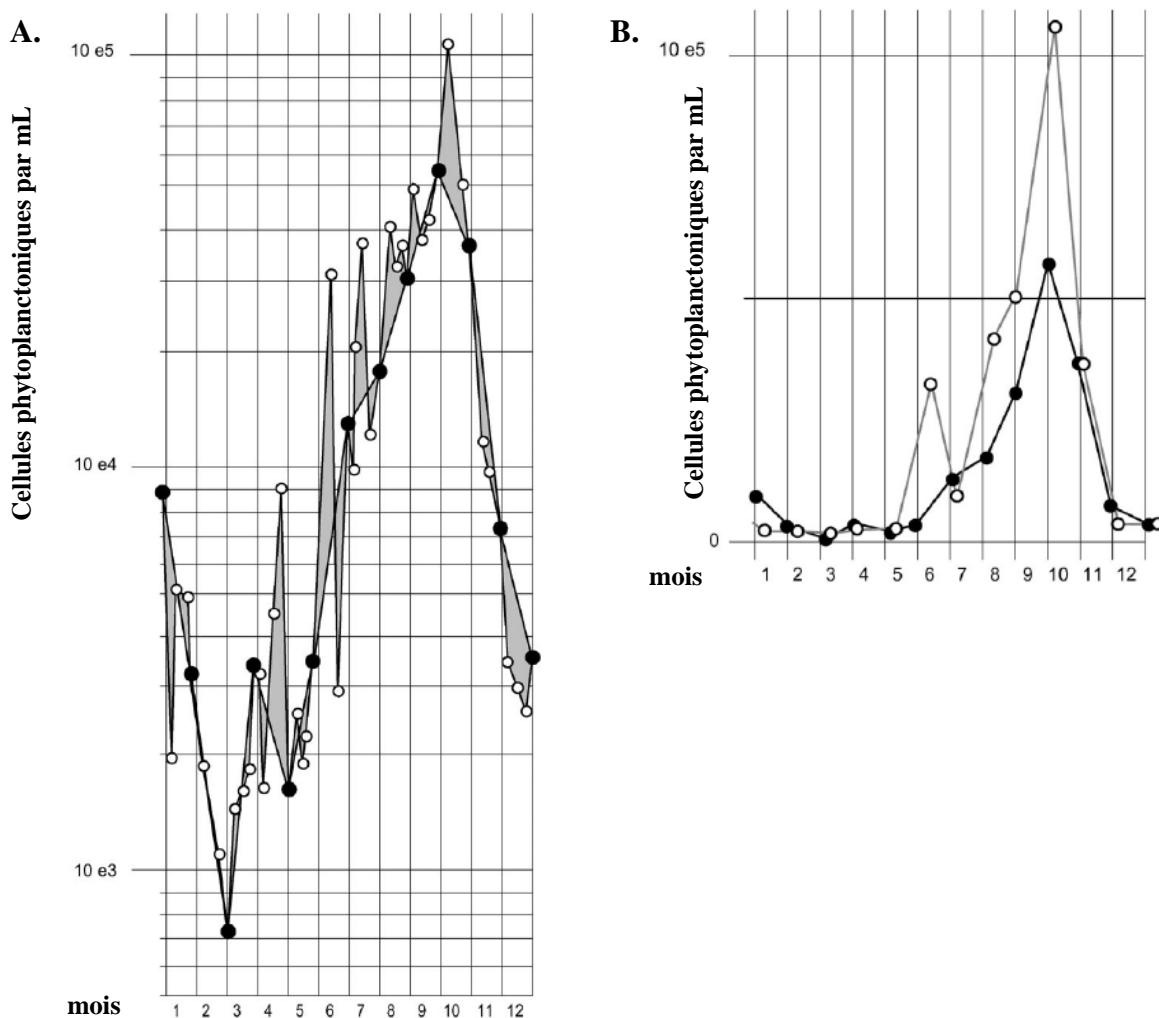


Figure IV.1 : Comptages phytoplanctoniques réalisés au cytomètre en flux au cours d'un bloom. La figure (A) illustre la perte d'informations (aires grises) causée par la réduction d'un échantillonnage mensuel (ronds noirs) par rapport un échantillonnage hebdomadaire (ronds blancs). La figure (B) illustre le biais induit par la discréétisation de l'échantillonnage. Les ronds noirs reproduisent les valeurs mesurées chaque première semaine du mois ; les ronds blancs reproduisent les valeurs mesurées chaque deuxième semaine du mois (d'après Dubelaar et al., 2004).

Cependant les travaux se sont d'abord naturellement orientés vers des groupes de cellules facilement identifiables grâce à leur contenu pigmentaire ou leur morphologie, souvent isolées en culture. L'accessibilité à la richesse spécifique constitue un défi, compte tenu de l'importante diversité de forme, de taille, de physiologie des espèces phytoplanctoniques dans les milieux aquatiques. Le CytoSense (CytoBuoy B.V., Pays-Bas) a la capacité de scanner les propriétés optiques de particules comprises entre 1 et 800 µm, donnant des informations supplémentaires sur la forme des particules, en plus des critères de taille et de contenu pigmentaire.

Dans ce chapitre, nous rapportons les premiers résultats d'une étude réalisée sur des échelles de temps plus courtes que celles des suivis d'observation des réseaux de surveillance actuels (cf. Chapitre II) à l'aide du CytoSense, en zone côtière de la Manche orientale. Les objectifs de cette étude consistaient à compléter l'observation de la variabilité phytoplanctonique au cours d'un bloom (cf. Chapitre III) et d'appréhender le développement très rapide de certaines espèces phytoplanctoniques telles que *Phaeocystis globosa*. Le travail a été mené au cours du bloom phytoplanctonique printanier 2007 (cf. Chapitre III) selon une fréquence journalière à horaire. La première partie de ce travail a consisté en la caractérisation d'espèces et/ou de groupes phytoplanctoniques à partir des données cytométriques. La seconde partie a permis d'appréhender la variabilité phytoplanctonique à plus haute résolution temporelle, consistant en une échelle d'observation journalière répartie sur quatre campagnes au cours d'un bloom. Un suivi des caractéristiques environnementales réalisé simultanément a permis de définir le contexte physico-chimique de notre étude et de déterminer s'il existe un impact des facteurs environnementaux sur la variabilité à court terme du phytoplancton.

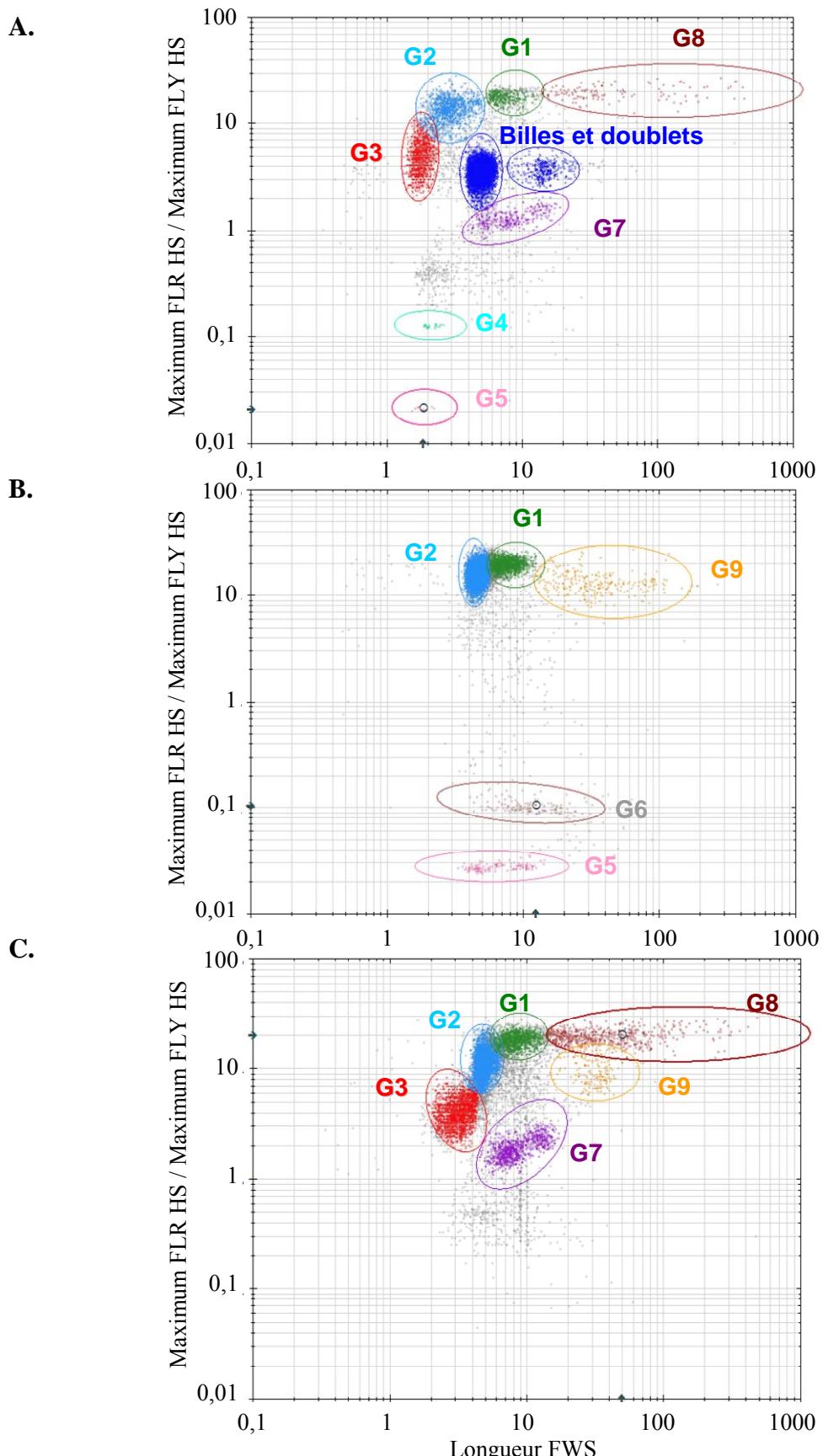


Figure IV.2 : Identification de groupes phytoplanctoniques présents dans le milieu naturel nommées de G1 à G9, à partir d'un cytogramme (longueur du FWS vs rapport du maximum de FLR et maximum de FLY) à différents moments du suivi : (A) en début; (B) en milieu et (C) en fin de suivi. Des billes et des doublets de billes sont figurés sur le cytogramme (A).

I. Les classes phytoplanctoniques rencontrées en milieu naturel

I.1. Identification des groupes

Un total de 9 groupes a été identifié au cours du bloom printanier 2007 (**Fig. IV.2**). Les cellules des groupes G1 et G2 ont été observées dans tous les échantillons (**Fig. IV.2-A, B et C**). Les cellules des groupes G3, G7 et G8 ont été principalement enregistrées en début et fin de période de suivi (**Fig. IV.2-A et C**). Les cellules du groupe G5 étaient présentes du début jusqu'en milieu de suivi (**Fig. IV.2-A et B**), tandis que celles du groupe G9 sont apparues à partir du milieu de suivi (**Fig. IV.2-B et C**). Les cellules des groupes G4 et G6 ont été respectivement observées uniquement en début et milieu de suivi (**Fig. IV.2-A et B**).

La taille moyenne des cellules varie de valeurs minimales inférieures à 2 µm pour le groupe G4 jusqu'à des valeurs maximales supérieures à 100 µm pour le groupe G9 (**Tableau IV.1**). Trois catégories de taille étaient représentées par les cellules des différents groupes :

- Les **groupes G2, G3, G4 et G5** étaient constituées de cellules ultraplancotoniques (2-5 µm),
- Les **groupes G1, G6 et G7** comprenaient des cellules nanoplancotoniques (5-20 µm),
- Les cellules des **groupes G8 et G9** appartenaient à la catégorie microplanctonique (20-200 µm).

Les groupes G4, G5 et G6 présentent des rapports FLR/FLY 10 fois plus faibles que les rapports des autres groupes, en raison de valeurs de fluorescence jaune plus élevée celles de fluorescence rouge (**Tableau IV.1**).

Les groupes G1 et G9 se caractérisaient par de forts rapports FLR/FWS, en raison d'un niveau élevé de fluorescence rouge (**Tableau IV.1**).

Tableau IV.1 : Moyennes (\pm écart-type) des principales caractéristiques des groupes cytométriques sur l'ensemble des données acquises au cours du suivi 2007 ($n = 35$). Total représente l'intégration des signaux FWS, SWS HS, FLR HS et FLY HS (10^3 U.A.) et FLO LS (U.A.). FLR/FLY représente le rapport de l'intégration des signaux de fluorescence rouge et jaune et FLR/FWS représente le rapport de l'intégration des signaux de fluorescence rouge et de diffusion vers l'avant.

Groupe	Longueur FWS (μm)	Total FWS	Total SWS HS	Total FLR HS	Total FLY HS	Total FLO LS	FLR/FLY	FLR/FWS
G1	$7,52 \pm 1,77$	$7,84 \pm 5,07$	$0,66 \pm 0,70$	$11,03 \pm 4,59$	$0,71 \pm 0,24$	$17,37 \pm 15,57$	$13,36 \pm 3,01$	$3,32 \pm 2,21$
G2	$3,31 \pm 0,61$	$0,63 \pm 0,25$	$0,07 \pm 0,06$	$0,47 \pm 0,22$	$0,13 \pm 0,04$	$7,34 \pm 7,50$	$3,09 \pm 1,09$	$1,89 \pm 2,07$
G3	$4,07 \pm 0,60$	$3,26 \pm 0,94$	$0,15 \pm 0,15$	$2,24 \pm 1,00$	$0,24 \pm 0,07$	$8,35 \pm 9,27$	$9,22 \pm 2,67$	$1,67 \pm 1,11$
G4	$2,20 \pm 0,27$	$1,11 \pm 0,36$	$0,45 \pm 0,03$	$2,70 \pm 0,27$	$21,32 \pm 1,70$	$11,91 \pm 11,18$	$0,15 \pm 0,04$	$1,87 \pm 0,94$
G5	$4,39 \pm 1,20$	$0,97 \pm 1,06$	$0,17 \pm 0,09$	$0,72 \pm 0,08$	$28,25 \pm 2,63$	$7,50 \pm 8,74$	$0,03 \pm 0,01$	$1,29 \pm 0,40$
G6	$11,44 \pm 4,49$	$9,05 \pm 5,70$	$1,73 \pm 3,08$	$0,88 \pm 0,70$	$8,92 \pm 7,80$	$7,66 \pm 9,80$	$0,12 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,64$
G7	$10,75 \pm 3,73$	$13,15 \pm 6,72$	$1,96 \pm 2,93$	$6,53 \pm 3,26$	$4,14 \pm 1,92$	$17,17 \pm 11,93$	$1,7 \pm 0,43$	$0,79 \pm 0,46$
G8	$36,35 \pm 21,54$	$9,35 \pm 7,25$	$3,18 \pm 4,20$	$7,65 \pm 5,85$	$0,73 \pm 0,45$	$42,62 \pm 40,58$	$11,99 \pm 2,44$	$0,93 \pm 0,58$
G9	$64,54 \pm 78,21$	$133,60 \pm 195,67$	$33,77 \pm 65,41$	$171,99 \pm 275,82$	$9,37 \pm 16,07$	$187,62 \pm 174,13$	$20,62 \pm 2,78$	$2,25 \pm 1,66$

Sur la base des enregistrements réalisés sur des cellules isolées, les neuf groupes ont pu être identifiés progressivement en milieu naturel à l'aide de l'analyse des attributs des signaux et des profils optiques. Ces groupes ont été confirmés par les observations et comptages microscopiques.

I. 1.1. Les groupes de cellules de *Phaeocystis globosa*

Les cellules des **groupes G1, G2 et G3** ont été identifiées comme étant des cellules libres de *Phaeocystis globosa*. En accord avec Rutten et al. (2005), les cellules libres de *Phaeocystis globosa* se subdivisent en trois groupes selon leur taille et leur niveau de fluorescence rouge lorsqu'elles sont analysées par cytométrie en flux (**Fig. IV.3**). Le groupe G1 est constitué des cellules de plus grande taille et présente les niveaux de fluorescence rouge les plus élevés (**Tableau IV.1**). Les groupes G2 et G3 présentent des cellules de taille similaire mais de niveau de fluorescence rouge différent (**Tableau IV.1**).

Sur la base d'une étude préliminaire sur les morphotypes de *Phaeocystis globosa* (Guiselin et al. (2009) ; Cf **Annexe 1**), le groupe G1 peut être considéré comme étant les cellules coloniales libres dont la taille est principalement comprise entre 3,5 et 9 µm et peut atteindre jusqu'à 13 µm lorsque les cellules sont en division (**Fig. IV.3**). Les groupes G2 et G3 représenteraient des flagellés haploïdes se distinguant principalement selon leur taille : (i) les flagellés haploïdes de 3 à 6 µm (groupe G2) (**Fig. IV.4**) et (ii) les flagellés haploïdes de 1,5 à 4,5 µm (groupe G3) (**Fig. IV.4**).

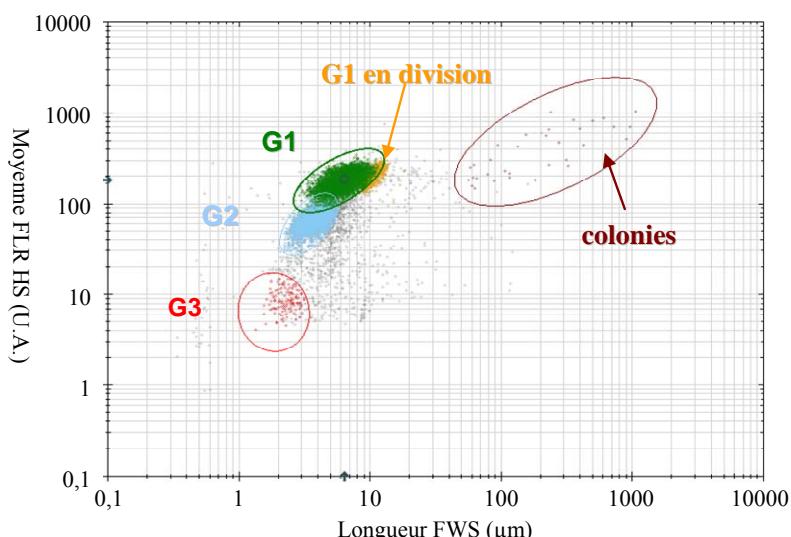


Figure IV.3 : Identification des groupes de *Phaeocystis globosa* à partir d'un échantillon de culture issue de la souche BCZ 99, fournie par le laboratoire d'Ecologie des Systèmes Aquatiques de l'Université Libre de Bruxelles. Le cytogramme de la longueur du FWS et de la moyenne du FLR HS présente trois groupes de cellules isolées (G1, G2 et G3). Des colonies composées de plusieurs cellules et des cellules du groupe G1 en division étaient également présentes dans la culture.

I.1.2. Les groupes de cellules à fluorescence jaune

Les **groupes G4, G5, G6 et G7** sont constitués de petites cellules ($< 20 \mu\text{m}$) caractérisées par des niveaux de fluorescence jaune élevés (**Tableau IV.1**).

Les cellules du **groupe G4** présentent une taille relativement petite ($1,8\text{-}2,2 \mu\text{m}$; **Fig. IV.4**) et une importante signature de fluorescence jaune par rapport à la taille et à la fluorescence rouge (**Tableau IV.1**). Elles se distinguent des cellules des groupes G5 et G6 par une fluorescence orange élevée. En raison de la petite taille, de la forte fluorescence jaune caractéristique de la phycoérythrine et de la forte fluorescence orange caractéristique de la phycocyanine, les cellules du groupe G4 ont été identifiées comme étant des cyanobactéries du genre *Synechococcus*.

Les cellules du **groupe G5** se caractérisent par une importante signature de fluorescence jaune par rapport au signal de FWS (**Fig. IV.4**). Elles présentent par ailleurs une taille similaire à celles des cellules flagellées de *P. globosa* (groupes G2 et G3). Cependant, le niveau de fluorescence rouge de ces cellules est relativement faible (**Tableau IV.1**). La fluorescence jaune de ces cellules pourrait résulter de la dégradation des pigments chlorophylliens en phéopigments des cellules de *P. globosa*.

Les cellules du **groupe G6** présentent les mêmes caractéristiques de fluorescence que les cellules du groupe G5 (**Tableau IV.1**) mais diffèrent par leur taille plus grande (**Fig. IV.4**). La fluorescence jaune est reconnue chez certains ciliés ayant ingéré des cellules phytoplanctoniques et parfois chez des cellules lysées, après ingestion par du zooplancton.

Les cellules du **groupe G7** présentent les mêmes caractéristiques de fluorescence que les cellules du groupe G4 (**Tableau IV.1**) mais diffèrent par leur taille plus importante (**Fig. IV.4**). Un autre groupe phytoplanctonique contient à la fois de la phycocyanine et de la phycoérythrine, il s'agit de Cryptophytes (Cf la culture de *Rhodomonas sp.*, Chapitre I § III.4.2.).

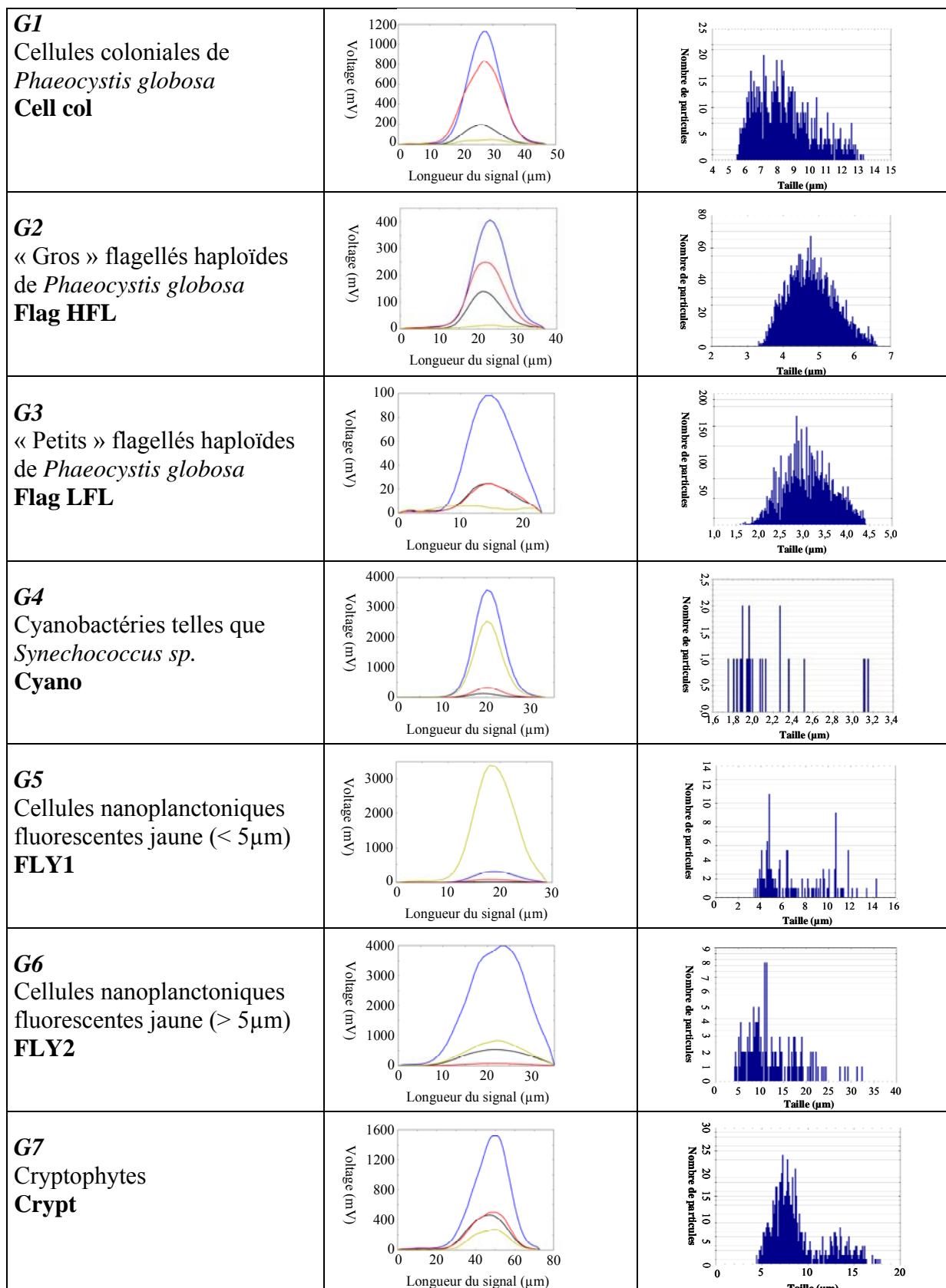


Figure IV.4 : Profils optiques et distribution de taille (μm) des cellules des groupes nanoplanctoniques G1 à G7 rencontrées dans le milieu naturel. Les signaux de FWS (noir), SWS (bleu), FLR (rouge) et FLY (jaune) sont représentés pour chaque profil.

I.1.3. Les groupes de diatomées

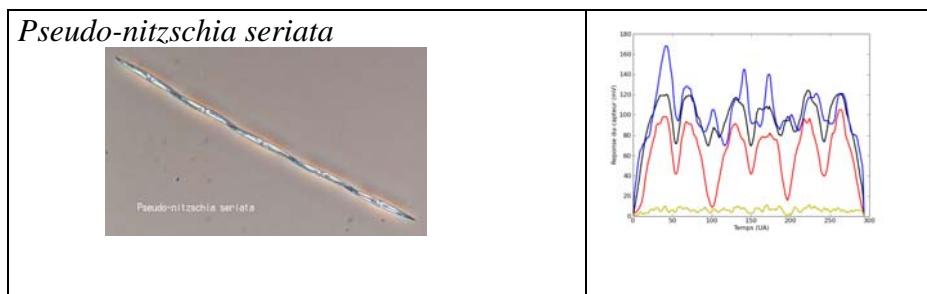
Deux **groupes G8 et G9** ont été identifiés comme étant des diatomées. Ces groupes correspondent à deux des groupes définis à partir des cellules isolées et mises en culture (Cf Chapitre I § III.4.2.).

- Les cellules du **groupe G8** présentent des niveaux élevés de fluorescence rouge (**Tableau IV.1**) et seront nommées **Diat-HFL** (High Fluorescence Level),
- Les cellules du **groupe G9** se caractérisent par des niveaux de fluorescence beaucoup plus faibles (**Tableau IV.1**) et seront nommées **Diat-LFL** (Low Fluorescence Level).

I.2. Validation à l'échelle saisonnière

Dans le but de déterminer le potentiel du CytoSense à détecter et quantifier *in situ* les espèces responsables de bloom, nous avons comparé les estimations de concentrations des différents groupes cytométriques identifiés, aux comptages microscopiques d'espèces ou groupes équivalents.

Les observations microscopiques ont permis de confirmer et/ou d'identifier les principaux profils cytométriques composant les groupes de diatomées (**Fig. IV.5**). L'identification des espèces n'a été possible que lorsque les particules classées étaient numériquement dominantes et qu'un nombre réduit d'espèces constituait la majeure partie du groupe en question. Ainsi le groupe des Diat-LFL (G8) était principalement composé de *Pseudo-nitzschia* (*P. seriata*, *P. delicatissima*) facilement identifiable d'après son profil bimodal (**ci-dessous**) :



En revanche, le groupe Diat-HFL (G9) était composé de divers profils optiques. Comme évoqué dans le Chapitre III, les espèces de diatomées se sont succédées au cours du bloom printanier 2007.

1. La période précédant le bloom de *P. globosa* était dominée par *Chaetoceros socialis*, *Lauderia annulata* et *Thalassiosira nordenskioeldii* (**Fig. IV.5**).
2. La période de bloom était dominée par *Pseudo-nitzschia delicatissima* (**ci-dessus**) accompagnée de *Rhizosolenia imbricata* et de *Skeletonema costatum* (**Fig. IV.5**).
3. La période suivant le bloom de *P. globosa* était de nouveau dominée par *Chaetoceros socialis* accompagnée de *Guinardia delicatula* (**Fig. IV.5**).

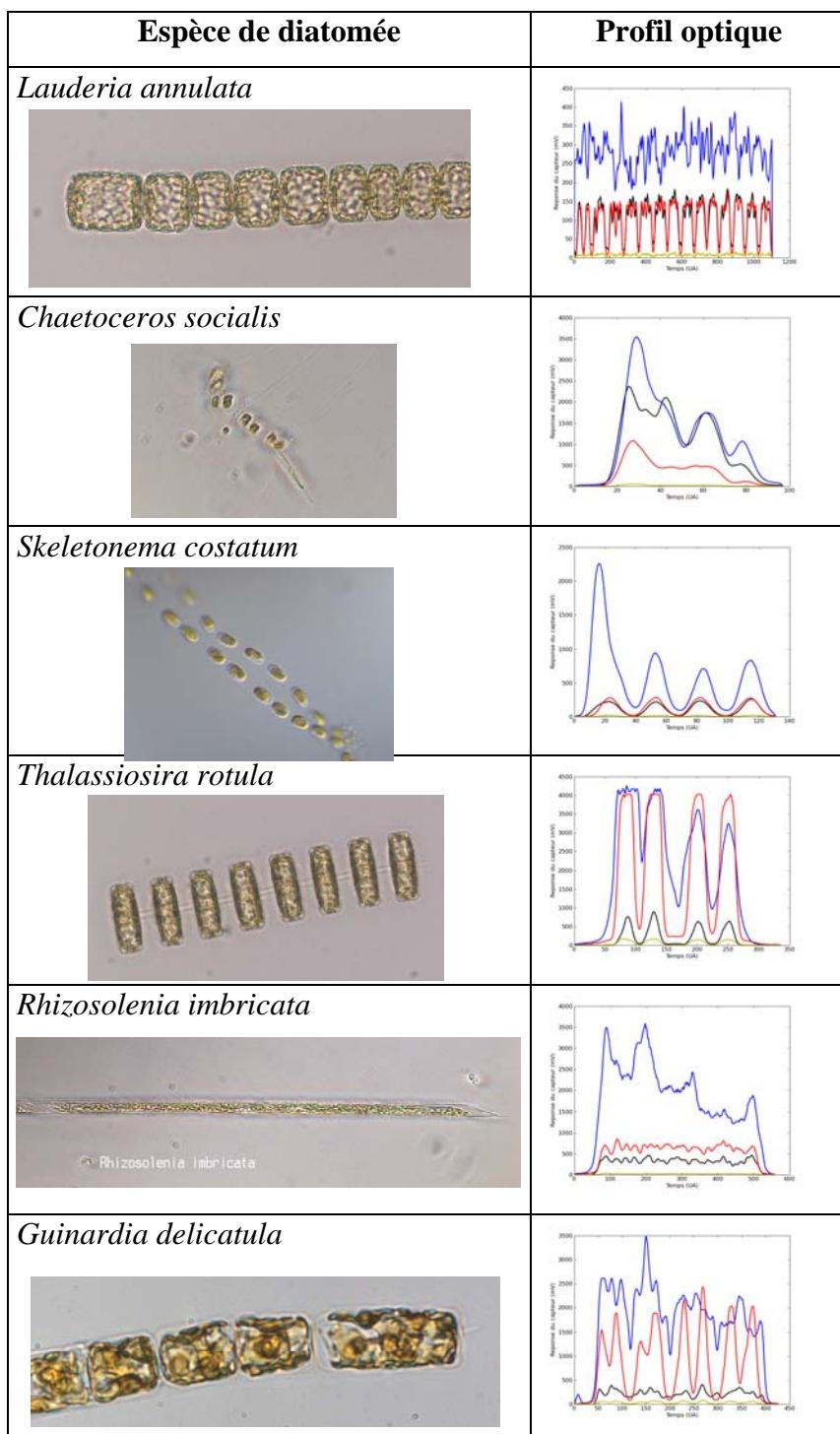


Figure IV.5 : Profils cytométriques des principales espèces de diatomées rencontrées dans le milieu naturel et issues du groupe Diat-HFL. Les photos sont issues d'échantillons du milieu naturel.

Selon les espèces ou groupes définis en cytométrie, les espèces ou groupes correspondants en microscopie présentaient globalement des dynamiques similaires, avec des corrélations entre les deux méthodes allant de $R^2 = 0,4$ à $R^2 = 0,8$ (**Fig. IV.6**). D'importantes sous-estimations des comptages cytométriques sont à noter concernant les Diat-HFL (G9) et les cellules coloniales de *P. globosa* (G1). La sous-estimation des diatomées est due à la présence de nombreuses cellules sous forme de colonie pour lesquelles l'appareil détecte des particules à part entière (**Fig. IV.6-F**). Pour les cellules coloniales de *P. globosa*, il s'agirait d'avantage d'une surestimation des comptages microscopiques puisque ce phénomène n'est pas observé pour les flagellés haploïdes (**Fig. IV.6-A et B**).

I.3. Essai d'automatisation de reconnaissance

Une approche mathématique a été initiée dans le cadre de cette étude et apporte des perspectives prometteuses dans l'automatisation de reconnaissance des profils cytométriques. Caillault et al. (2009) ont développé une mesure de comparaison conjointe d'ensembles de signaux, basée sur la notion d'appariement élastique (Dynamic Time Warping, DTW ; **Annexe 2**).

La **Figure IV.7** montre les premiers résultats obtenus, pour le suivi dans le milieu naturel, de trois espèces qui ont formé différents blooms au cours du printemps 2007 (Cf Chapitre III). Le DTW permet de travailler avec les profils optiques eux-mêmes et non plus sur les attributs de signal de groupes de particules. Par apprentissage du modèle mathématique à partir de profils acquis en culture, les formes des signaux sont comparées et assignées à une espèce. Cette méthode permet également d'ajuster le dénombrement des cellules en colonie à partir de la durée moyenne du signal équivalente à la taille d'une cellule individuelle pour chaque espèce. Dans l'exemple **Fig. IV.7**, le nombre de cellules de *Chaetoceros socialis* a été ajusté avec une taille moyenne de cellules de 10 µm, et le nombre de cellules de *Pseudo-nitzschia delicatissima* avec une taille moyenne de 50 µm.

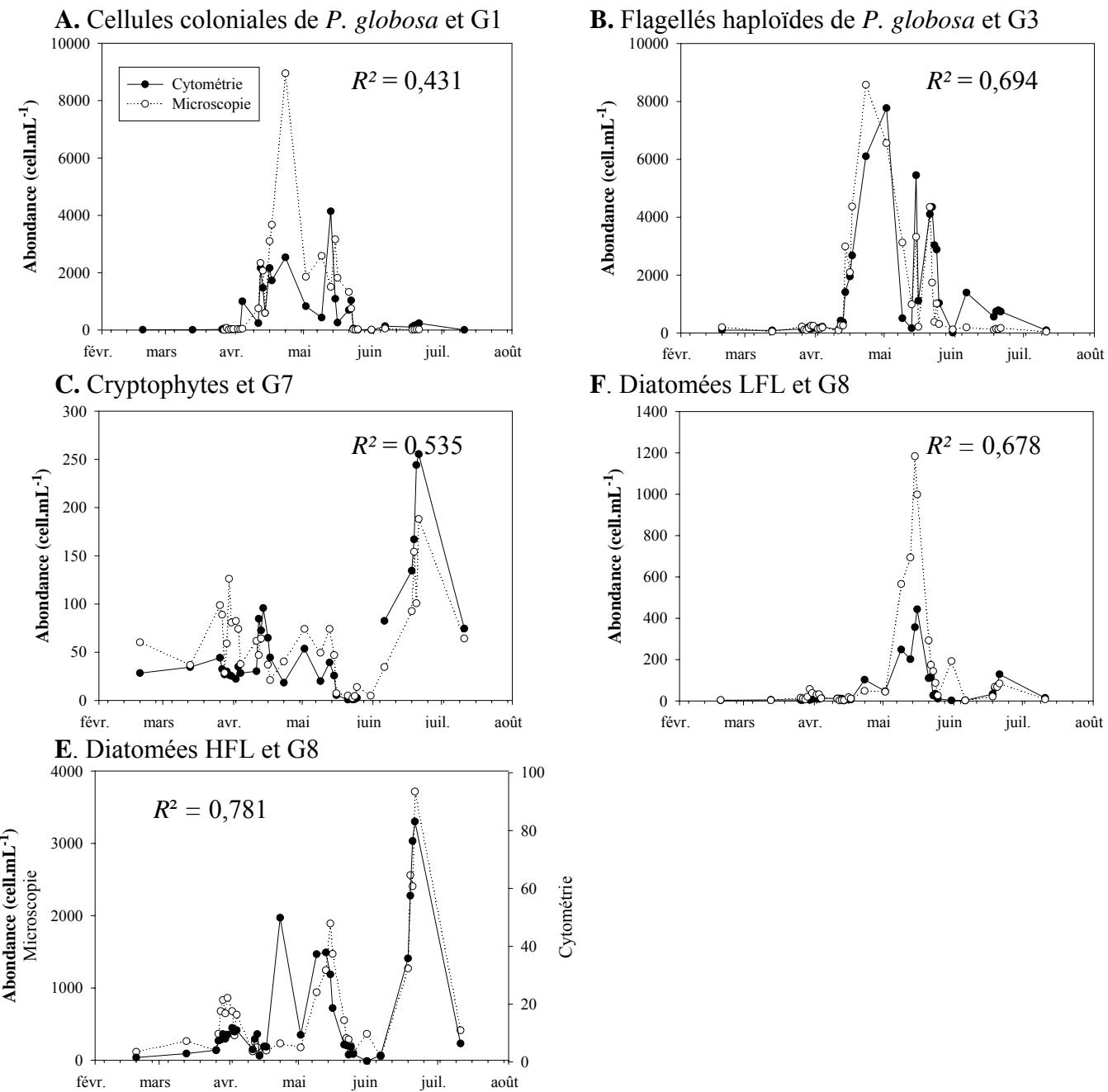


Figure IV.6 : Validation à l'échelle saisonnière au cours du bloom printanier 2007, des comptages cytometriques des groupes (cell.mL⁻¹) avec les comptages réalisés au microscope à partir d'échantillons du milieu naturel (station R1). (A) les cellules coloniales de *Phaeocystis globosa* et le groupe G1 ; (B) les flagellés haploïdes de *P. globosa* et le groupe G3 ; (C) les Cryptophyceae et le groupe G7 ; (D) le total des diatomées considérées LFL et le groupe G9 et (E) le total des diatomées considérées HFL et le groupe G9.

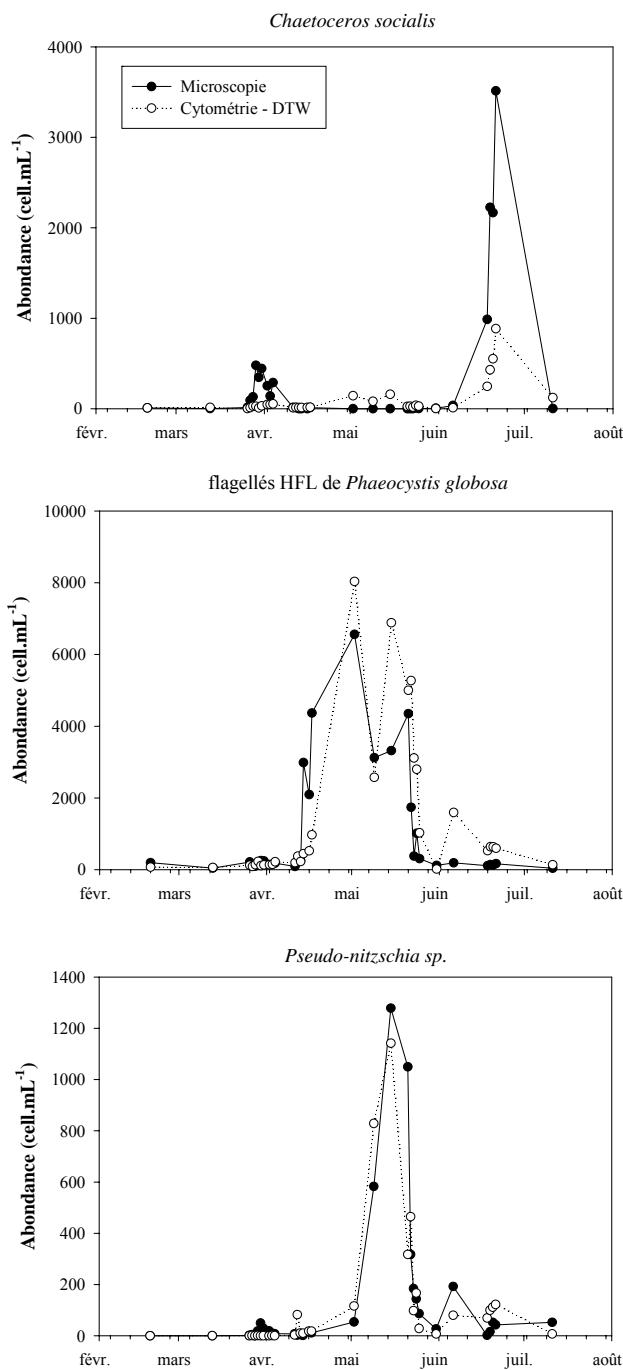
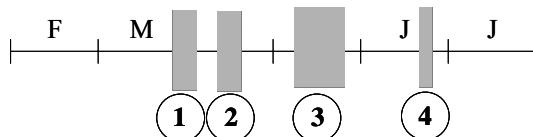


Figure IV.7: Résultats de reconnaissance des profils optiques de cellules issues d'échantillons du milieu naturel (*Chaetoceros socialis*, flagellés haploïdes de *Phaeocystis globosa* et *Pseudo-nitzschia delicatissima*) à l'aide de la méthode « Dynamic Time Warping » (Caillault et al., 2009) à partir des analyses au CytoSense et comparaison avec les comptages des mêmes espèces au microscope.

II. Variabilité à court terme

Les périodes d'échantillonnage à court terme, correspondent à différentes phases du bloom printanier 2007, présenté au **Chapitre III** : **2007**



1. La première période d'échantillonnage (du 26/03 au 04/04) correspond à la phase de démarrage du bloom printanier. Cette période se caractérise par un premier bloom (correspondant à la période P1 définie en 2007 au Chapitre III) de diatomées dominé par *Chaetoceros socialis*, avec une abondance phytoplanctonique comprise entre 0,47 et $1,32 \cdot 10^6$ cell.L⁻¹ et une biomasse carbonée comprise entre 83 et 262 µgC.L⁻¹. Cette période sera intitulée **P1** dans la suite de cette étude.
2. La seconde période d'échantillonnage (du 11/04 au 17/04) correspond à la phase de croissance du bloom printanier de *P. globosa*. Cette période coïncidait avec une augmentation de l'abondance phytoplanctonique de 2,07 à 9,49 cell.L⁻¹ et de la biomasse carbonée de 209 à 661 µgC.L⁻¹, due à *Phaeocystis globosa*. Cette période (période P2, Chapitre III) sera intitulée **P2** dans la suite de cette étude.
3. La troisième période d'échantillonnage (du 09/05 au 25/05) correspond à la phase de décroissance du bloom printanier de *P. globosa*. L'abondance phytoplanctonique était comprise entre 0,61 à 12,86 cell.L⁻¹ et la biomasse carbonée entre 213 et 1458 µgC.L⁻¹. Les valeurs maximales d'abondance et de biomasse phytoplanctonique ont été observées au cours de cette période et correspondent à une production secondaire de *P. globosa* et à un second bloom de diatomées dominé par *Pseudo-nitzschia delicatissima*. Cette période (période P3, Chapitre III) sera intitulée **P3** dans la suite de cette étude.
4. La quatrième période d'échantillonnage (du 18/06 au 21/06) correspond à la phase suivant le bloom printanier. Cette période était caractérisée par l'augmentation de l'abondance phytoplanctonique de 1,50 à 4,16 cell.L⁻¹ et de la biomasse carbonée entre 160 et 390 µgC.L⁻¹, due à *Chaetoceros socialis*. Cette période (période P4, Chapitre III) sera intitulée **P4** dans la suite de cette étude.

Au cours de la période P3, un suivi lagrangien des masses d'eau à l'aide d'une bouée ARGOS a été réalisé entre le 15 et 16/05, à une fréquence moyenne de 4 h au cours de 24 h. Ceci nous ont permis d'étudier les variations journalières des groupes phytoplanctoniques.

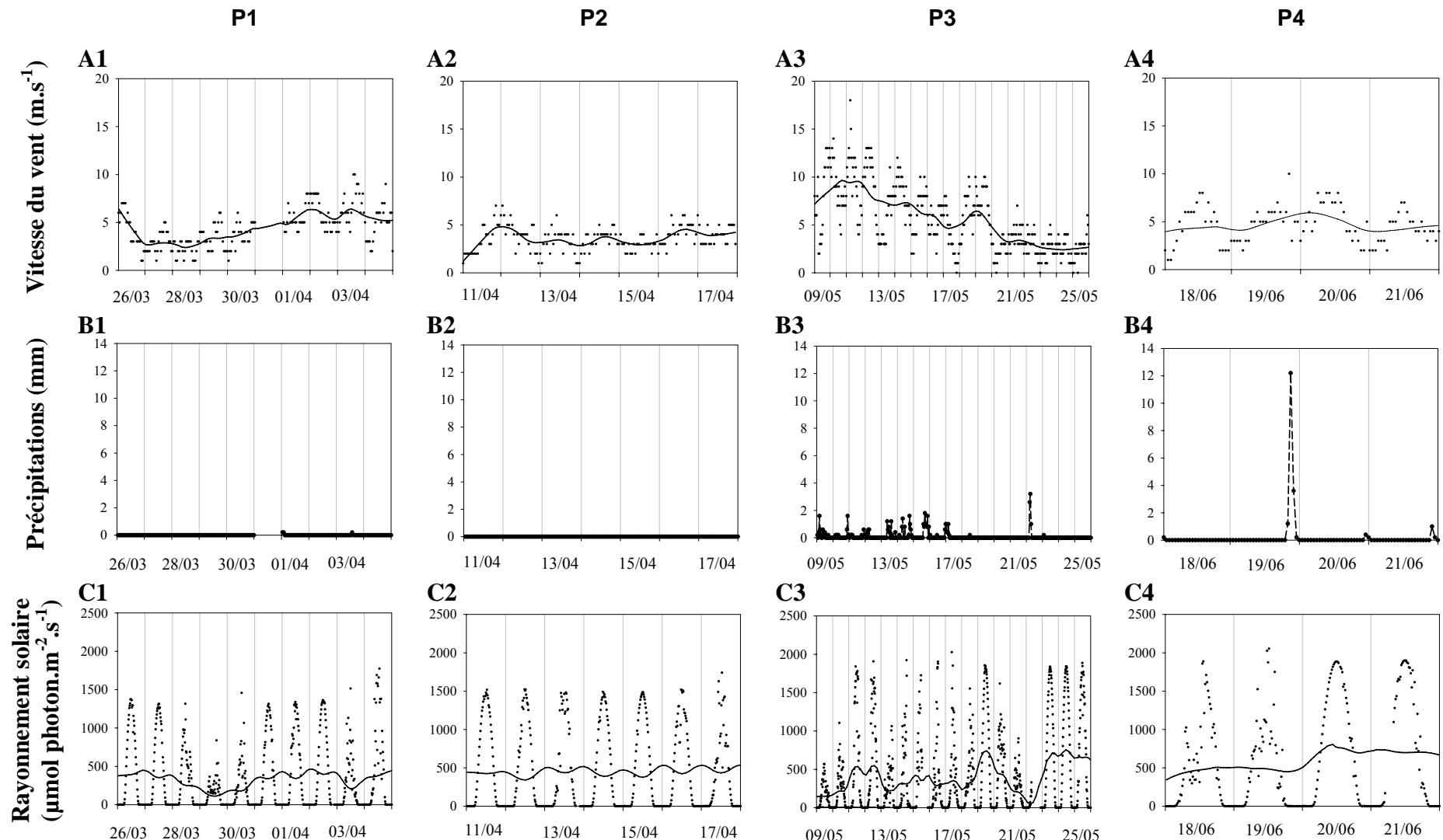


Figure IV.8 : Principales caractéristiques météorologiques au cours des 4 périodes de suivi à court terme (P1 à P4), à Boulogne-sur-mer définies par (A) la vitesse du vent (m.s^{-1}) ; (B) les précipitations (mm) et (C) le rayonnement solaire ($\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les courbes correspondent au lissage des données à l'aide d'une méthode loess d'ordre 1.

II.1. Variations à court terme des facteurs environnementaux

II.1.1. Contexte climatique

Le suivi réalisé au cours de la **période P1** est caractérisé par une augmentation progressive de la vitesse du vent (**Fig. IV.8-A1**) avec des moyennes journalières allant de 2,3 à 6,7 m.s⁻¹. Une vitesse maximale de 10 m.s⁻¹ a été enregistrée au cours de la journée du 03/04. Les vents de NE ont globalement dominé pendant le suivi, à l'exception de la période du 27 au 29/03 caractérisée par la dominance de vents de SE (données non représentées). Aucun épisode pluvieux n'a été important en dépit de quelques jours faiblement ensoleillés (**Fig. IV.8-B1 et C1**). Les 29/03, 30/03 et 03/04 étaient caractérisés par un rayonnement solaire moyen < 250 µmol photon.m⁻².s⁻¹. L'ensoleillement maximal a été observé le 04/04 avec une valeur de 1576 µmol photon.m⁻².s⁻¹.

Le suivi réalisé au cours de la **période P2** a été marqué par des conditions météorologiques exceptionnelles. Les jours du suivi ont été particulièrement ensoleillés avec des moyennes journalières comprises entre 373 et 487 µmol photon.m⁻².s⁻¹ et caractérisés par des vents faibles, compris entre 2,1 et 4,1 m.s⁻¹ (**Fig. IV.8-C2 et A2**).

En revanche, le suivi réalisé au cours de la **période P3** était caractérisé par des conditions météorologiques perturbées. Un événement de vent fort (moyenne journalière > 6 m.s⁻¹) a eu lieu du 30/04 au 19/05 (**Fig. IV.8-A3**). Il s'agissait de vents de NO et une vitesse maximale de 18 m.s⁻¹ a été atteinte le 09/05. Cet épisode a également été marqué par d'importantes précipitations journalières allant de 0,2 à 8,8 mm (maximum observé le 15/05 ; **Fig. IV.8-B3**). Cependant, les conditions étaient également très contrastées avec des jours particulièrement ensoleillés tels que les 11/05, 12/05 et 19/05 marqués par un ensoleillement moyen > 500 µmol photon.m⁻².s⁻¹ (**Fig. IV.8-C3**). A partir du 20/05, les conditions ont été plus calmes, marqué cependant par une perturbation entre les 21/05 et 22/05. L'ensoleillement moyen était particulièrement faible (194 et 39 µmol photon.m⁻².s⁻¹, respectivement) et des précipitations de 7 mm ont été enregistrées (**Fig. IV.8-B3 et C3**).

Le suivi réalisé au cours de la **période P4** a été marqué par un événement pluvieux de forte amplitude (12 mm) mais bref (**Fig. IV.8-B4**). Cette perturbation s'est également traduite par deux jours marqué par un ensoleillement moyen (450 µmol photon.m⁻².s⁻¹ ; **Fig. IV.8-C4**), comparé aux jours suivants plus ensoleillés (750 µmol photon.m⁻².s⁻¹).

II.1.2. Contexte hydrologique et chimique

L'analyse des coefficients de variation (CV) fait état d'une forte variabilité des caractéristiques hydrologiques et chimiques au cours des différents suivis, à l'exception des concentrations en silicate (**Tableau IV.2**). Les CV variaient de < 25% en début et fin de bloom (e.g. P1 et P4) à > 60% au cours des phases de bloom (e.g. P2 et P3). Les concentrations en phosphates présentaient des CV plus élevés (> 60%) en P1 et P3.

Tableau IV.2 : Coefficients de variation (CV (%)) = écart-type/moyenne) et valeurs minimales et maximales [min. – max.] des caractéristiques hydrologiques définies par la température (T, °C), la salinité (S, p.s.u.), et des caractéristiques chimiques définies par les concentrations en ammonium (NH_4^+ , $\mu\text{mol.L}^{-1}$), en nitrates + nitrites ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$, $\mu\text{mol.L}^{-1}$), en silicates (Si(OH)_4 , $\mu\text{mol.L}^{-1}$) et en phosphates (HPO_4^{2-} , $\mu\text{mol.L}^{-1}$) rencontrées au cours des différents suivis à court- terme. Le nombre d'échantillons (*n*) est indiqué pour chaque suivi.

	P1 <i>n</i> = 9	P2 <i>n</i> = 7	P3 <i>n</i> = 9	P4 <i>n</i> = 4
Température (°C)	24%	74%	64%	10%
	[8,7 - 9,3]	[10,1 – 10,4]	[12,1 – 14,0]	[15,3 – 16,6]
Salinité (p.s.u.)	19%	60%	81%	11%
	[33,1 – 34,0]	[33,5 - 34,3]	[33,3 – 34,3]	[34,1 – 34,6]
NH₄⁺ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	24%	74%	64%	10%
	[0,42 – 0,81]	[0,39 – 3,65]	[0,15 – 1,28]	[0,27 – 0,34]
NO₃⁻ + NO₂⁻ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	19%	60%	81%	11%
	[9,32 – 16,69]	[0,32 – 9,43]	[0,11 – 1,14]	[0,07 – 0,09]
Si(OH)₄ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	28%	14%	9%	24%
	[1,71 – 3,97]	[1,76 – 2,45]	[2,04 – 2,60]	[1,68 – 2,91]
HPO₄²⁻ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	40%	28%	60%	20%
	[0,11 – 0,31]	[0,10 – 0,25]	[0,10 – 0,51]	[0,13 – 0,20]

Les différents suivis coïncidaient avec l'augmentation de la température. Cependant, l'amplitude thermique a été plus faible au cours des premières phases de bloom (entre 0,3 à 0,6°C en P1 et P2 ; **Fig. IV.9-A1 et A2**) qu'au cours des dernières phases de bloom (entre 1,3 à 1,9°C en P3; **Fig. IV.9-A3 et A4**).

Au cours des différents suivis, la salinité a présenté des valeurs comprises entre 33,1 à 34,6 p.s.u. et caractérisées par des variations proches de 1 p.s.u (**Tableau IV.2** ; **Fig. IV.9-A**). Ces variations pouvaient être imputées aux conditions de prélèvement. L'heure de prélèvement, réalisé alternativement en courant de flot et de jusant, fluctuait un peu autour de la basse mer.

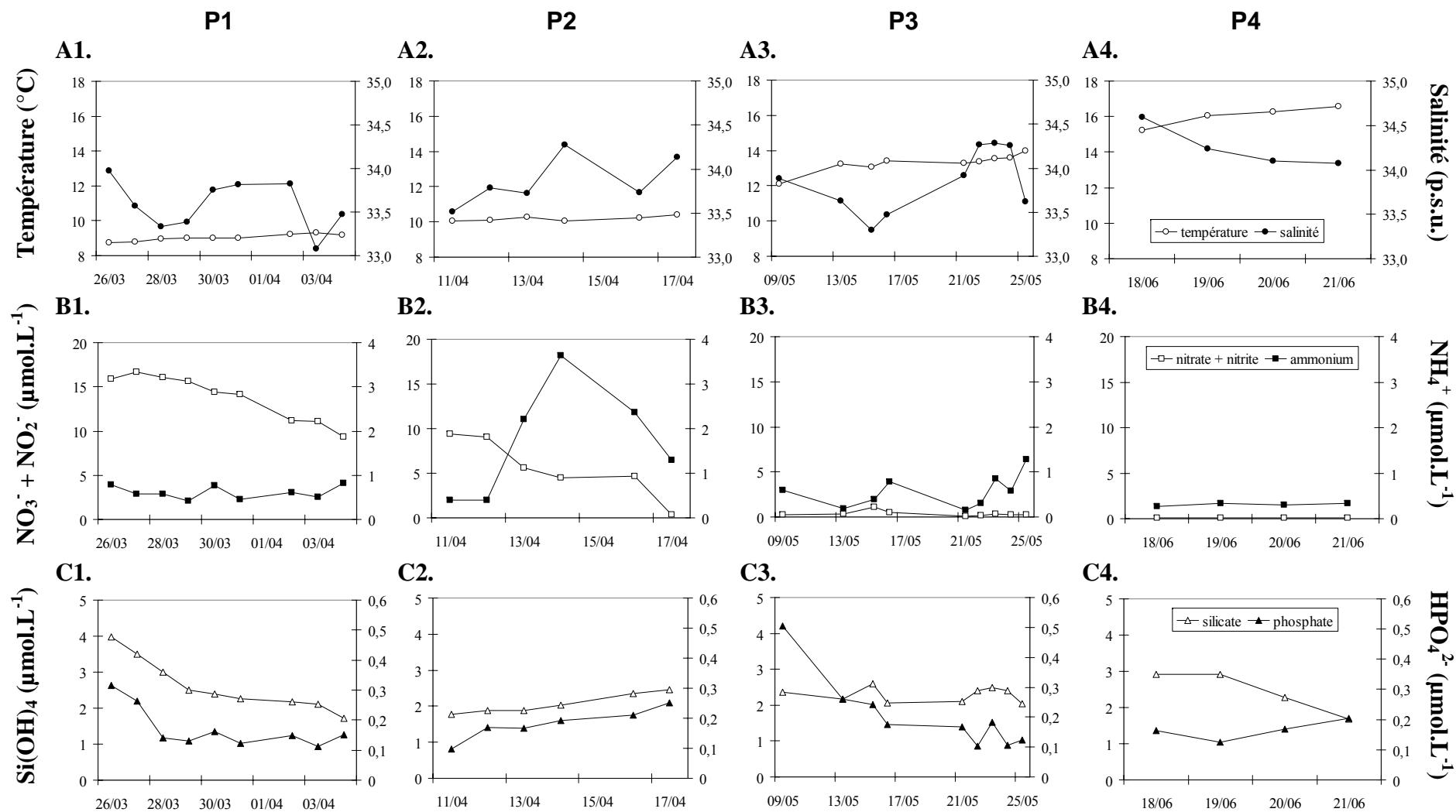


Figure IV.9: Principales caractéristiques hydrologiques au cours des 4 périodes de suivi à court terme (P1 à P4), à Boulogne-sur-mer définies par (A) la température ($^{\circ}\text{C}$) et la salinité (p.s.u.), et des caractéristiques chimiques représentées par les concentrations ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) (B) en nitrate + nitrite ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) et ammonium (NH_4^+), et (C) en silicate (Si(OH)_4) et phosphate (HPO_4^{2-}).

En **période P1**, les concentrations en ammonium relevées étaient inférieures à $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, comprises entre $0,27$ et $0,81 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (**Fig. IV.9-B1**). Les concentrations en phosphates ont diminué de $0,31$ à $0,11 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ au cours des trois premiers jours (**Fig. IV.9-C1**). Les concentrations en nitrate + nitrite et en silicate ont diminué progressivement tout au long de ce suivi de $15,93$ à $9,32 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour les nitrates + nitrites (**Fig. IV.9-B1**) et de $3,97$ à $1,71 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour les silicates (**Fig. IV.9-C1**).

En **période P2**, les concentrations maximales en ammonium ont été relevées (**Tableau IV.2**). Elles ont augmenté de manière importante de $0,39 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ le $11/04$ jusqu'à $3,65 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ le $14/04$ et ont diminué à partir du $14/04$ (**Fig. IV.9-B2**). Les concentrations en nitrate + nitrite ont continué de diminuer progressivement avec des valeurs allant de $9,43$ à $0,32 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (**Fig. IV.9-B2**). En parallèle, une légère augmentation des concentrations en silicate et en phosphate a été observée au cours de cette phase (+ $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour les silicates et + $0,1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour les phosphates ; **Fig. IV.9-C2**).

En **période P3**, des augmentations ponctuelles d'ammonium ont été observées avec des concentrations maximales de $0,79 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ le $16/05$ et de $1,28 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ le $25/05$ (**Fig. X9-B3**). Les concentrations de nitrate + nitrite ont été inférieures à $0,5 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, à l'exception d'un pic de $1,14 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ observé le $15/05$ (**Fig. IV.9-B3**). Au cours de cette période, une nouvelle diminution des concentrations en phosphates a été observée, allant de $0,51$ à $0,10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, tandis que les concentrations en silicate variaient légèrement de $2,04$ à $2,60 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (**Fig. IV.9-C3**).

En **période P4**, les concentrations en ammonium étaient proches de $0,3 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ et les concentrations en nitrates + nitrites atteignaient des niveaux proches de la limite de détection (**Fig. IV.9-B4**). Seules les concentrations en silicate ont présenté une diminution importante de $2,91$ à $1,68 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ tandis que les concentrations en phosphate variaient de $0,12$ à $0,20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ (**Fig. IV.9-C4**).

II.3. Variations à court terme des groupes phytoplanctoniques

II.3.1. Evolution de l'abondance des groupes

Les flagellés HFL et les cellules fluorescentes jaunes FLY2 ont présenté une plus forte variabilité au cours des phases de bloom ($CV > 75\%$ en P2 et P3 ; **Tableau IV.3**). D'autres groupes ont montré des variations plus importantes en périodes P1 et P3 telles que les cellules coloniales ($CV = 235\%$ en P1 et 151% en P3; **Tableau IV.3**), les flagellés LFL ($CV = 66$ et 160%) et les diatomées LFL ($CV = 110$ et 91%). Les variations de Cryptophyceae ont été plus importantes en période P3 ($CV = 125\%$; **Tableau IV.3**), tandis que la variabilité des cellules FLY1 a progressivement diminué de 201% en P1 à 74% en P4 (**Tableau IV.3**).

Tableau IV.3 : Coefficients de variation ($CV (\%) = \text{écart-type/moyenne}$) et valeurs minimales et maximales [min. – max.] des abondances (cell.mL^{-1}) des groupes cytométriques rencontrés au cours des différents suivis à court terme. Le nombre d'échantillons (n) est indiqué pour chaque suivi. L'absence de données est signifiée par un X.

	P1 <i>n</i> = 9	P2 <i>n</i> = 7	P3 <i>n</i> = 9	P4 <i>n</i> = 4
Cell col (G1)	235% [19,33 – 998,44]	58% [240,03 – 2164,09]	151% [8,49 – 4138,91]	31% [107,42 – 236,70]
Flag LFL (G2)	66% [0,00 – 153,94]	54% [108,82 – 508,86]	160% [16,84 – 481,06]	40% [522,32 – 1241,67]
Flag HFL (G3)	21% [108,72 – 212,63]	89% [106,00 – 2676,01]	75% [162,64 – 5448,21]	14% [556,89 – 777,45]
Cyano (G4)	41% [2,43 – 8,46]	X	X	X
FLY1 (G5)	201% [0,19 – 15,02]	92% [30,64 – 264,00]	96% [7,41 – 158,33]	74% [0,00 – 0,72]
FLY2 (G6)	X	144% [3,18 – 127,27]	119% [6,02 – 206,07]	74% [1,06 – 5,31]
Crypto (G7)	22% [22,36 – 44,27]	38% [30,28 – 95,74]	125% [0,67 – 26,64]	28% [130,42 – 241,53]
Diat LFL (G8)	110% [0,00 – 2,82]	37% [2,54 – 5,98]	91% [10,71 – 433,60]	44% [22,63 – 68,60]
Diat HFL (G9)	37% [8,45 – 29,35]	36% [6,55 – 26,02]	92% [3,59 – 57,48]	49% [43,47 – 149,75]

En **période P1**, les cellules de *Phaeocystis globosa* ont été dominantes en termes d'abondance avec des valeurs maximales comprises entre 154 et 998 cell.mL⁻¹ (**Fig. IV.10-A1**). L'abondance des cellules de *P. globosa* a été relativement constante au cours de ce suivi (< 200 cell.mL⁻¹; **Fig. IV.10-A1**), à l'exception d'une augmentation rapide de l'abondance des cellules coloniales observée de 36 cell.mL⁻¹ le 03/04 à 998 cell.mL⁻¹ le 04/04.

Au cours de cette période, d'autres groupes d'abondance plus faible ont montré des variations. L'abondance des cellules de Cryptophyceae a diminué (**Fig. IV.10-B1**), tandis que celle des diatomées HFL a augmenté progressivement au cours de la semaine (**Fig. IV.10-C1**).

En terme de contributions relatives, la dominance des flagellés LFL a diminué au cours de la phase de début de bloom, progressivement remplacée par celle des flagellés HFL en fin de période, avant la dominance de cellules coloniales (**Fig. IV.10-D1**).

En **période P2**, les flagellés HFL et les cellules coloniales de *P. globosa* ont majoritairement dominé (valeurs maximales de 2676 et 2164 cell.mL⁻¹; **Fig. IV.10-A2**), et étaient accompagnées de flagellés LFL (valeur maximale de 509 cell.mL⁻¹ en début de période; **Fig. IV.10-A2**). Les abondances des cellules coloniales et des flagellés HFL ont augmenté, tandis que l'abondance des flagellés LFL a diminué (**Fig. IV.10-A2**). Cependant, l'augmentation des cellules coloniales présentait deux pics successifs (2164 cell.mL⁻¹ le 12/04 et 2161 cell.mL⁻¹ 17/04 ; **Fig. IV.10-A2**), accompagnés d'augmentations d'abondance de cellules FLY1 et FLY2 (**Fig. IV.10-B2**).

Dans une moindre mesure, l'abondance des diatomées HFL présentait une dynamique similaire à celle de l'abondance des cellules coloniales, marquée par deux pics successifs (23 cell.mL⁻¹ le 14/04 et 26 cell.mL⁻¹ le 17/04 ; **Fig. IV.10-C2**).

Au cours de cette phase, les trois groupes de cellules de *P. globosa* se sont succédés (**Fig. IV.10-D2**). La contribution des cellules flagellées LFL a été élevée le premier jour. Elles ont été rapidement remplacées par des cellules coloniales entre le 12 et le 13/04, elles-mêmes suivies par des cellules flagellées HFL à partir du 14/04.

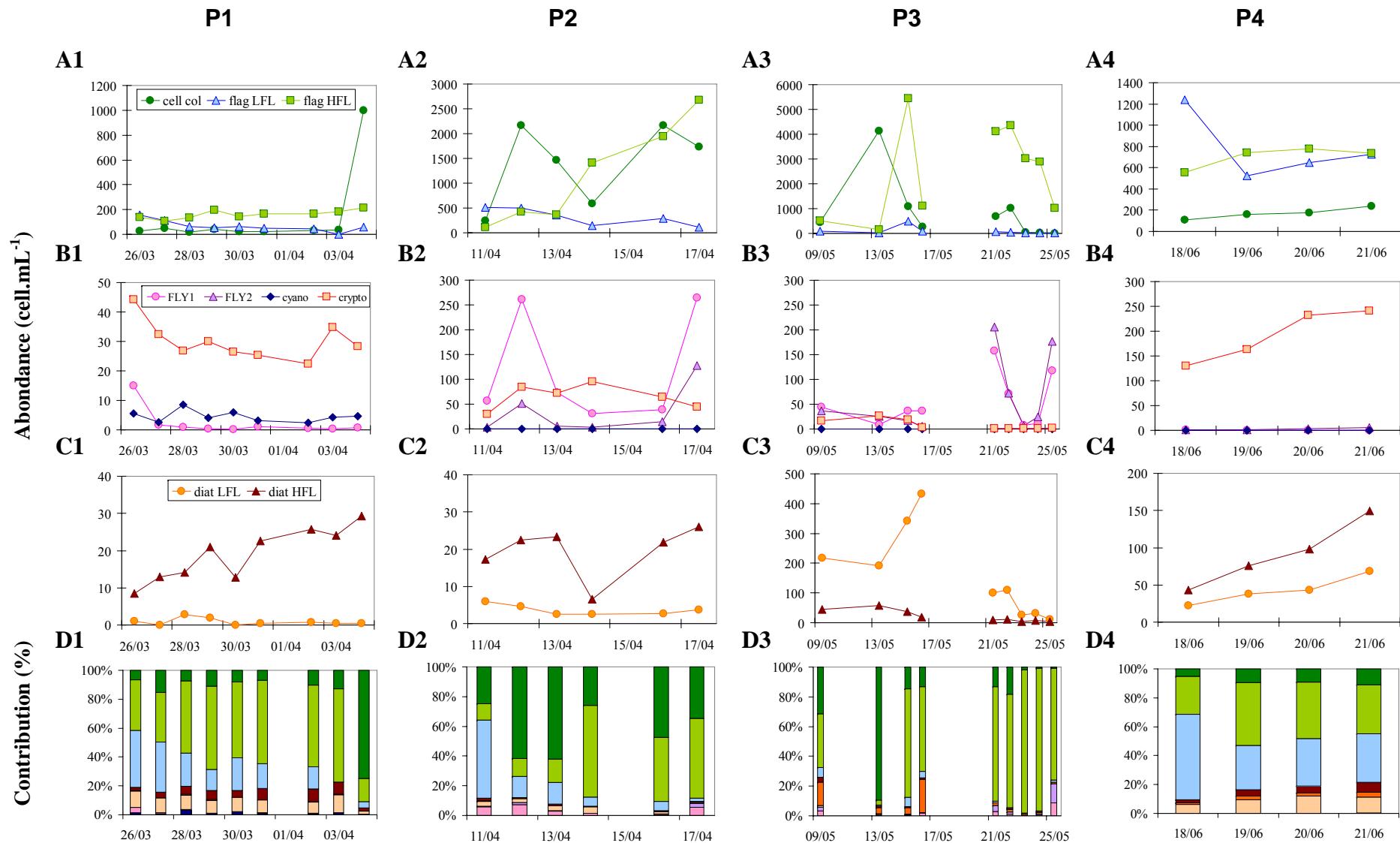


Figure IV.10 : Suivis des groupes phytoplanctoniques, au cours des 4 périodes à court terme à la station R1. Variations de l'abondance (cell.mL⁻¹) (A) des cellules coloniales et des flagellés HFL et LFL de *Phaeocystis globosa*, (B) des cellules nanoplanctoniques appartenant aux Cyanobactéries, aux Cryptophyceae et des cellules fluorescentes jaunes FLY1 et FLY2 et (C) des cellules de diatomées HFL et LFL. (D) Contributions relatives des groupes.

En **période P3**, les flagellés HFL et les cellules coloniales de *P. globosa* étaient toujours dominants mais présentaient des abondances deux fois supérieures à celles rencontrées au cours de la phase précédente (valeurs maximales de 5448 et 4139 cell.mL⁻¹; **Fig. IV.10-A3**). Des pics successifs d'abondance de différents groupes phytoplanctoniques ont été observés pendant cette phase. Au cours de la première semaine, un pic de cellules coloniales a été observé le 13/05 (4139 cell.mL⁻¹; **Fig. IV.10-A3**), suivi le 15/05 d'une brève augmentation de l'abondance des flagellés HFL (5448 cell.mL⁻¹; **Fig. IV.10-A3**) et le 16/05 d'un pic de diatomées LFL (434 cell.mL⁻¹; **Fig. IV.10-C3**).

Au cours de la seconde semaine du suivi, des valeurs élevées de concentrations en flagellés HFL ont été enregistrées entre le 21 et le 22/05 (4350 cell.mL⁻¹; **Fig. IV.10-A3**), suivies d'une diminution entre le 23 et le 25/05. Ces concentrations importantes étaient accompagnées d'importantes quantités de cellules FLY2 (206 cell.mL⁻¹; **Fig. IV.10-B3**) et de cellules FLY1 (158 cell.mL⁻¹; **Fig. IV.10-B3**).

Au cours de cette période, l'importante contribution de cellules coloniales associée à une importante contribution de diatomées LFL a été progressivement remplacée par celle des flagellés HFL associés aux cellules FLY1 et FLY2 (**Fig. IV.10-D3**).

En **période P4**, le même schéma de dominance que celui de la première phase a été observé, à savoir la dominance des cellules de *P. globosa*, cette fois-ci accompagnées de concentrations plus importantes de Cryptophyceae (nombre croissant au cours de la période, atteignant en fin de période une valeur maximale de 242 cell.mL⁻¹; **Fig. IV.10-B4**). Les abondances des cellules FLY1 et FLY2 ont été particulièrement faibles (< 10 cell.mL⁻¹; **Fig. IV.10-B4**). Au cours de ce suivi, seuls les Cryptophyceae et les groupes de diatomées ont présenté une augmentation franche et progressive (**Fig. IV.10-B4** et **C4**). Les autres groupes ne présentaient pas d'évolution particulière, hormis une diminution de l'abondance des flagellés LFL observée entre le 18/06 et le 19/06 (**Fig. IV.10-A4**).

II.3.2. Evolution des paramètres cellulaires des groupes

Pendant les périodes P2 et P3, l'abondance des cellules coloniales de *Phaeocystis globosa* présentait des pics successifs, surimposés à la tendance générale (**Fig. IV.10-A2 et A3**). Cependant, les paramètres cellulaires de taille, dérivée de la longueur du signal FWS, et de fluorescence de la chlorophylle *a*, dérivée de l'intégration du signal FLRHS, ne présentaient pas de telles variations (données non représentées).

Les valeurs de FLRHS et de FWS des cellules de *P. globosa* ont montré des différences conjointes de niveaux entre les différents suivis. D'une part, la taille moyenne des cellules était relativement plus élevée au cours des périodes P3 et P4 (**Tableau IV.4**) et d'autre part, les valeurs de FLRHS étaient supérieures à celles observées durant les deux premières phases (**Tableau IV.4**).

Ce schéma d'évolution des paramètres FWS et FLR a également été observé pour les diatomées LFL (**Tableau IV.4**).

Globalement, les cellules FLY1 et FLY2 ont présenté les mêmes caractéristiques que les cellules de *P. globosa*. Cependant, le niveau de fluorescence rouge a été plus élevé en phase de croissance pour les cellules FLY1 et au cours de la phase décroissante pour les cellules FLY2 (**Tableau IV.4**).

Les cellules de diatomées HFL rencontrées au cours de la phase de début de bloom étaient caractérisées par une taille moyenne plus grande et un niveau de fluorescence rouge plus élevé que celles rencontrées au cours des autres phases (**Tableau IV.4**).

Tableau IV.4: Moyennes (\pm écart-type) et valeurs minimales et maximales [min. – max.] des caractéristiques physiologiques définies par la longueur du FWS (μm) et l'intégrale de la FLR (10^3 U.A.) des groupes cytométriques rencontrés au cours des suivis à court terme. L'absence de données est signifiée par un X.

Groupe	Signal	P1	P2	P3	P4
Cell col	FWS	$6,75 \pm 0,92$ [4,59 – 7,59]	$6,32 \pm 0,28$ [5,85 – 6,59]	$7,70 \pm 0,78$ [6,96 – 9,19]	$9,08 \pm 0,14$ [8,90 – 9,21]
	FLR	$8,53 \pm 2,75$ [5,26 – 15,30]	$15,65 \pm 2,74$ [12,00 – 19,70]	$9,65 \pm 1,27$ [7,93 – 12,20]	$13,33 \pm 0,40$ [13,00 – 13,90]
Flag LFL	FWS	$1,94 \pm 0,11$ [1,81 – 2,08]	$2,81 \pm 0,09$ [2,68 – 2,94]	$4,83 \pm 0,20$ [4,48 – 5,10]	$3,23 \pm 0,09$ [3,16 – 3,37]
	FLR	$0,19 \pm 0,01$ [0,18 – 0,20]	$0,76 \pm 0,20$ [0,44 – 0,98]	$0,63 \pm 0,11$ [0,50 – 0,77]	$0,30 \pm 0,01$ [0,29 – 0,31]
Flag HFL	FWS	$2,95 \pm 0,12$ [2,79 – 3,14]	$3,65 \pm 0,21$ [3,27 – 3,87]	$5,01 \pm 0,19$ [4,72 – 5,32]	$4,97 \pm 0,10$ [4,89 – 5,11]
	FLR	$1,38 \pm 0,03$ [1,35 – 1,46]	$3,88 \pm 0,37$ [3,30 – 4,28]	$2,54 \pm 0,57$ [1,58 – 3,15]	$1,62 \pm 0,10$ [1,55 – 1,77]
Cyano	FWS	$2,20 \pm 0,08$ [2,09 – 2,33]	X	X	X
	FLR	$2,69 \pm 0,14$ [2,54 – 2,94]	X	X	X
Parti FLY1	FWS	$1,90 \pm 0,22$ [1,70 – 2,45]	$3,07 \pm 0,33$ [2,79 – 3,60]	$6,91 \pm 0,68$ [5,64 – 7,86]	$5,88 \pm 0,96$ [4,81 – 6,65]
	FLR	$0,53 \pm 0,04$ [0,46 – 0,60]	$1,00 \pm 0,02$ [0,97 – 1,02]	$0,70 \pm 0,08$ [0,62 – 0,85]	$0,90 \pm 0,66$ [0,51 – 1,66]
Parti FLY2	FWS	X	$9,31 \pm 2,41$ [7,72 – 14,10]	$12,21 \pm 1,08$ [10,60 – 13,60]	$12,20 \pm 0,37$ [11,80 – 12,70]
	FLR	X	$0,70 \pm 0,24$ [0,37 – 0,90]	$0,92 \pm 0,19$ [0,69 – 1,22]	$0,79 \pm 0,24$ [0,54 – 1,06]
Crypto	FWS	$8,44 \pm 0,25$ [7,96 – 8,71]	$9,97 \pm 0,70$ [8,95 – 11,00]	$14,99 \pm 4,06$ [10,60 – 23,40]	$8,83 \pm 0,17$ [8,72 – 9,09]
	FLR	$4,13 \pm 0,27$ [3,67 – 4,54]	$9,37 \pm 0,77$ [8,31 – 10,30]	$9,27 \pm 3,13$ [3,09 – 12,50]	$3,06 \pm 0,09$ [2,94 – 3,15]
Diat LFL	FWS	$26,66 \pm 3,81$ [23,00 – 34,00]	$33,65 \pm 10,11$ [22,60 – 51,10]	$47,08 \pm 7,60$ [35,80 – 63,00]	$35,55 \pm 1,61$ [33,8 – 37,2]
	FLR	$3,23 \pm 1,00$ [1,44 – 4,67]	$11,61 \pm 4,28$ [7,46 – 19,40]	$8,86 \pm 2,02$ [6,05 – 12,60]	$6,39 \pm 0,45$ [5,90 – 6,85]
Diat HFL	FWS	$82,66 \pm 20,07$ [58,60 – 109,00]	$53,22 \pm 9,09$ [38,80 – 61,70]	$64,56 \pm 17,68$ [37,60 – 88,60]	$51,10 \pm 9,14$ [40,5 – 62,3]
	FLR	$304,44 \pm 89,27$ [189,00 – 434,00]	$110,27 \pm 27,38$ [68,90 – 146,00]	$155,80 \pm 49,31$ [90,20 – 240,00]	$83,60 \pm 26,22$ [48,9 – 112,00]

II.4. Relations entre les groupes phytoplanctoniques et les conditions environnementales

L'étude de la variabilité à court terme des paramètres environnementaux et des groupes phytoplanctoniques au cours de différentes situations caractéristiques du bloom printanier 2007, laisse supposer l'existence, non systématique, de variations marquées (§ II-1 et II-2).

Afin de déterminer le rôle des paramètres environnementaux sur le développement des groupes phytoplanctoniques, le coefficient de corrélation de Spearman (ρ) a été calculé pour chaque suivi sur les données biologiques, hydrologiques et environnementales.

Au cours des phases de début et de croissance du bloom (P1 et P2), une corrélation négative a été observée entre les groupes de flagellés LFL et HFL de *Phaeocystis globosa*. Les flagellés LFL covariaient alors positivement avec les concentrations en DIN ($\rho = 0,75$ en P1 et $\rho = 1,00$ en P2 ; $p > 0,05$), tandis que les flagellés HFL covariaient négativement ($\rho = -0,82$ en P1 et $\rho = -0,89$ en P2; $p > 0,05$).

Des corrélations positives entre les cellules coloniales de *Phaeocystis globosa* et la vitesse du vent ont été observées au cours des deux phases de bloom ($\rho = 0,83$ en P2 et $\rho = 0,68$ en P3 ; $p < 0,05$), ainsi qu'une corrélation négative avec l'indice de stabilité de la colonne d'eau (cD) en phase de précédent le bloom ($\rho = -0,73$; $p < 0,05$).

Aucune relation n'a été observée entre les cellules coloniales et les cellules flagellées de *Phaeocystis globosa*. Cependant, des covariations entre les groupes de cellules fluorescentes jaunes et les groupes de cellules de *Phaeocystis globosa* ont parfois été observées.

- (i) en phase de croissance du bloom P2, les cellules coloniales covariaient positivement avec les cellules FLY2 ($\rho = 0,83$; $p < 0,05$) ;
- (ii) en phase suivant le bloom P4, une forte corrélation positive a été observée entre les flagellés LFL et les cellules FLY1 ($\rho = 1,00$; $p < 0,05$).

Aucune corrélation positive n'a été relevée entre l'intensité lumineuse et les groupes phytoplanctoniques.

II.5. Essai d'étude de variabilité journalière des groupes phytoplanctoniques

Une étude à plus court terme des groupes phytoplanctoniques a été réalisée au cours d'un essai de suivi lagrangien de 24 h (suivi d'une même masse d'eau). Ce type de suivi a été appliqué dans le cadre de cette étude, pour suivre en temps réel les variations d'abondance des groupes phytoplanctoniques. Il a été effectué entre le 15/05 à 18h et le 16/05 à 18h au cours de la phase de décroissance du bloom printanier, à une fréquence d'échantillonnage moyenne de 4 heures. Il faut noter qu'un seul prélèvement correspond à la phase nocturne.

Une augmentation de l'abondance des cellules coloniales de *Phaeocystis globosa* a été observée à partir de 8:00, cependant le moment ainsi que la valeur du maximum atteint au cours de la journée, différait selon la profondeur (**Fig. IV.11-A1**). En surface, une abondance maximale de $1300 \text{ cell.mL}^{-1}$ a été atteinte vers 12:00. En profondeur, la concentration maximale a été deux fois plus importante qu'en surface et a été relevée plus tard vers 18:00. Une augmentation des paramètres FWS et FLR des cellules coloniales a été observée à partir de 12:00, pour atteindre des valeurs maximales en fin d'après-midi (**Fig. IV.11-A2 et A3**). Cette augmentation semblait être précédée d'une diminution préalable au cours de la nuit jusqu'en matinée.

Les abondances des cellules FLY 1 et FLY 2 ont présenté globalement la même dynamique que les cellules coloniales avec des concentrations maximales atteintes vers 14:00 (**Fig. IV.11-C1 et D1**). Cependant l'évolution des abondances n'était pas suivie de variations similaires des paramètres FWS et FLR. La longueur du signal de FWS des cellules FLY1 a augmenté (**Fig. IV.11-C2**) tandis que la fluorescence rouge a diminué tout au long du suivi (**Fig. IV.11-C3**). Le niveau de la fluorescence des cellules FLY2 a sensiblement augmenté (**Fig. IV.11-D3**) mais la longueur du FWS s'est avérée très variable entre la surface et le fond (**Fig. IV.11-D2**).

Les diatomées LFL ont présenté une variation journalière marquée de l'abondance et des paramètres de FWS et de FLR, cependant l'évolution a été différente de celle observée pour les cellules coloniales. L'évolution des abondances des diatomées LFL a consisté en une augmentation qui a commencé avant 8:00 à 12:00, suivie d'une diminution l'après-midi (**Fig. IV.11-E1**). Les paramètres de FWS et de FLR ont suivi les variations de l'abondance avec des valeurs maximales atteintes vers 12:00, cependant ils ont commencé à augmenter plus tard à partir de 8:00 (**Fig. IV.11-E2 et E3**). Une variation journalière de l'abondance des flagellés HFL de *Phaeocystis globosa* et des diatomées HFL n'a pu être clairement identifiée au cours de ce suivi (**Fig. IV.11 B1 et F1**).

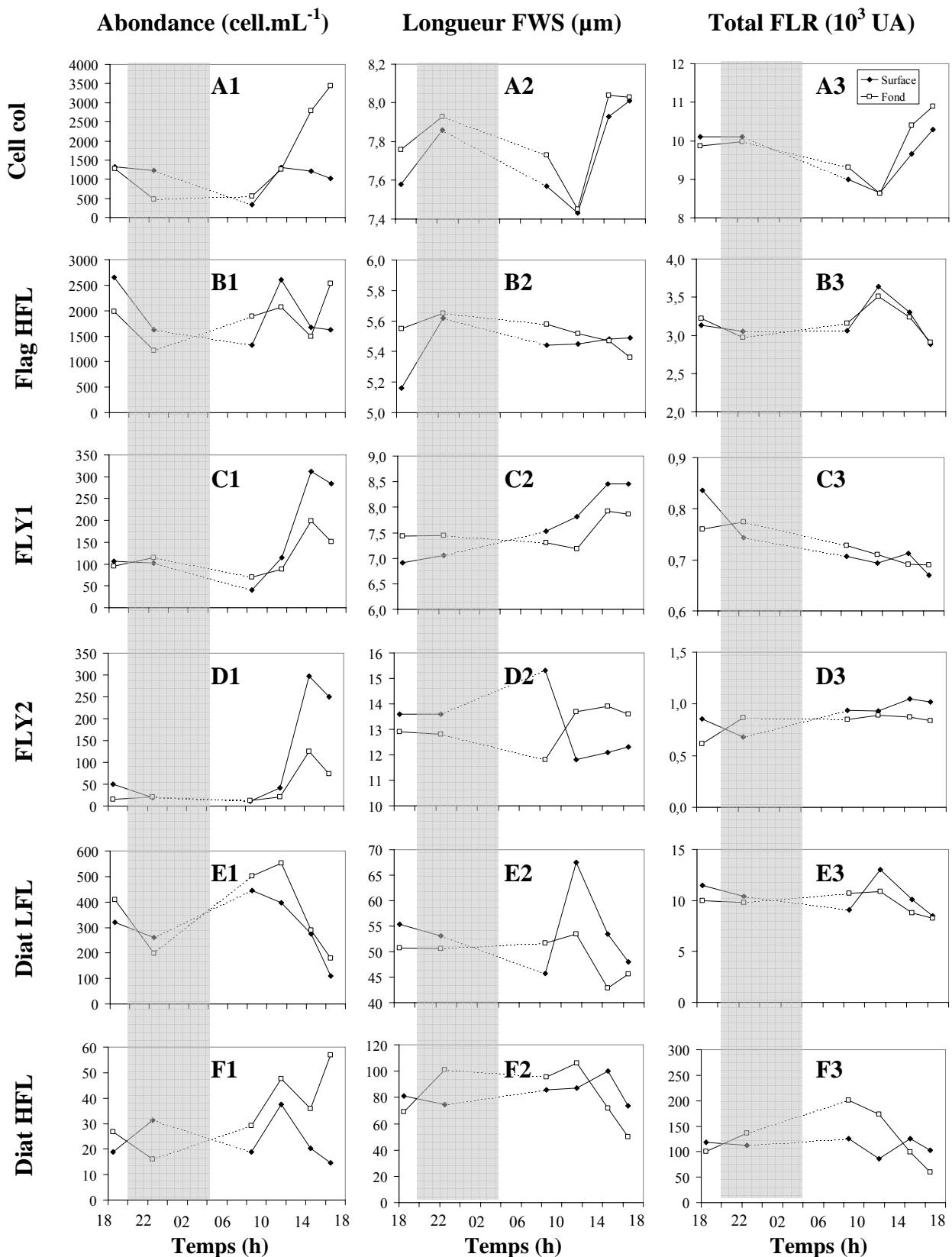


Figure IV.11: Variations journalières en surface et en profondeur au cours d'un suivi lagrangien du 15 au 16 Mai 2007, sur le site d'Ambleteuse de (1) l'abondance (cell.mL^{-1}), (2) la longueur du FWS (μm) et (3) l'intégrale de FLR (10^3 U.A.) (A) des cellules coloniales de *Phaeocystis globosa*; (B) des flagellés HFL de *Phaeocystis globosa*; (C) des cellules FLY1 ; (D) des cellules FLY2 ; (E) des diatomées LFL et (F) des diatomées HFL.

Discussion

Les études actuelles de reconnaissance des cellules phytoplanctoniques utilisant des technologies basées sur l'excitation par laser et détection des propriétés optiques des cellules reposent sur l'analogie à partir de profils d'espèces cultivées ou dominantes dans le milieu (Buskey et Hyatt, 2006 ; Takabayashi et al., 2006 ; Anglès et al., 2008). A notre connaissance, les résultats de cette étude représentent les premières observations de groupes phytoplanctoniques (ultra-, nano- et microplanctoniques) résolus par cytométrie en flux de « scanning » (CytoSense) en zone côtière eutrophisée.

Résolution des groupes phytoplanctoniques et estimation de l'abondance

Au cours des différents suivis à court terme, le CytoSense a permis de discriminer neuf groupes phytoplanctoniques grâce à l'analyse des profils optiques : quatre groupes ultraphytoplanctoniques ($2\text{-}5 \mu\text{m}$; G2, G3, G4 et G5), trois groupes nanophytoplanctoniques ($5\text{-}20 \mu\text{m}$; G1, G6 et G7) et deux groupes microphytoplanctoniques ($20\text{-}200 \mu\text{m}$; G8 et G9).

Concernant les groupes de taille inférieure à $20 \mu\text{m}$, nos résultats sont en accord avec des études réalisées en milieu oligotrophe tels qu'en Méditerranée (Thyssen et al., 2008) ou en Atlantique nord-est (Thyssen et al., 2009) à l'aide d'un CytoSub, version submersible du CytoSense. La résolution de 7 groupes ultraphytoplanctoniques à nanophytoplanctoniques, là où les cytomètres en flux conventionnels n'en discriminent que 4 ou 5, suggère l'efficacité de l'analyse des profils optiques.

Les analyses cytométriques réalisées dans cette étude confirment la présence d'une fraction microphytoplanctonique ($>20 \mu\text{m}$) plus importante que dans les milieux oligotropes. En zone côtière de la Baie Sud de la Mer du Nord, Rutten et al. (2005) ont observé à l'aide d'un cytomètre en flux conventionnel basé sur la détection de signaux intégrés, deux groupes ultraphytoplanctoniques de type *Synechococcus*, trois groupes nanophytoplanctoniques de cellules de *Phaeocystis globosa* et des cellules microphytoplanctoniques telles que des diatomées et des colonies de *P. globosa* de taille maximale $> 1000 \mu\text{m}$.

Concernant les groupes de cellules de *Phaeocystis globosa*, nos résultats sont particulièrement en accord avec les observations de Rutten et al. (2005). Le cycle de vie de *P. globosa* est relativement complexe consistant en l'alternance de cellules flagellées et de cellules coloniales caractérisées par des propriétés morphologiques et physiologiques différentes (Riegman et Van Boekel, 1996 ; Peperzak et al., 2000 ; Rousseau et al., 2007). Trois groupes

de cellules de *Phaeocystis globosa* ont été identifiés sur la base du contenu pigmentaire et de la taille (**Fig. IV.2 et IV.3**). Un groupe (G1) a été identifié comme étant des cellules coloniales de taille plus grande (5-10 µm) et de fluorescence rouge élevée. Les cellules coloniales de *P. globosa* se caractérisent par un rapport FLR/FWS relativement élevé, signifiant qu'en dépit de leur petite taille, elles contiennent un taux important de chlorophylle *a*. Les deux autres groupes (G2 et G3) diffèrent légèrement par leur taille mais surtout par leur niveau de fluorescence rouge. Peperzak et al. (2000) a identifié trois groupes de taille similaire de cellules à partir d'une analyse par compteur de particules (Coulter-counter) d'une culture de *P. globosa*. Il a ainsi mis en évidence deux types de flagellés haploïdes appelés respectivement microflagellés ($3,1 \pm 0,1$ µm) et mesoflagellés ($4,2 \pm 0,1$ µm). Les tailles observées des flagellés LFL et HFL sont en accord avec celles des flagellés de Peperzak et al. (2000). Les flagellés diploïdes observés dans le cadre du Chapitre III n'ont pu être identifiés par les analyses cytométriques en raison (i) de caractéristiques cellulaires similaires aux cellules coloniales et (ii) de leur faible concentration.

Les cellules du groupe G4 présentent une taille relativement petite (< 2 µm), une forte fluorescence orange caractéristique de la phycocyanine et une forte fluorescence jaune caractéristique de la phycoérythrine (**Tableau IV.1**). Il s'agit des principales caractéristiques de cyanobactéries de type *Synechococcus*. D'après Grattepanche (2007) dans une étude réalisée à partir des mêmes prélèvements, les observations microscopiques confirmeraient la présence de cyanobactéries coccoïdes de type *Synechococcus* dans les premiers prélèvements du suivi. Cependant, la taille des cellules déterminée par notre cytomètre est plus grande que celle habituellement admise pour les espèces de *Synechococcus* (~1 µm ; Partensky et al., 1999). Cependant, bien que l'estimation de la taille par le CytoSense puisse être biaisée pour des cellules inférieures à 5 µm (Cf Chapitre I § III.3.1.1.), certaines espèces de cyanobactéries de taille supérieure à 1 µm ont déjà été observées (Neveux et al., 1999). Les cyanobactéries du genre *Synechococcus* sont ubiquistes mais elles sont particulièrement dominantes dans les milieux oligotrophes où leur abondance est de l'ordre de 10^3 cell.mL⁻¹ (Lovejoy et al., 1996 ; Grégori et al., 2001). En comparaison, les abondances des cyanobactéries rencontrées au cours de cette étude ont été relativement faibles (cell.mL⁻¹). Cependant, il est généralement admis que l'abondance de petites cellules telles que les cyanobactéries ou les picoeucaryotes diminue au cours des périodes où l'abondance des cellules de grande taille augmente.

Les cellules des groupes G8 et G9 ont été identifiées comme étant des diatomées mais appartenant à deux groupes différent selon leurs propriétés optiques : les diatomées HFL et LFL. Les profils optiques composant ces groupes sont très divers cependant ils présentent un

critère morphologique commun. Les diatomées HFL présentent surtout des profils de diatomées centriques, tandis que les diatomées LFL présentent des profils de diatomées pennées. Le regroupement de cellules selon leur forme introduit la notion de groupes fonctionnels (Thyssen et al., 2008). Cette définition de groupes fonctionnels, comme déjà évoquée dans le Chapitre III, permet de simplifier l'étude des assemblages phytoplanctoniques en l'absence d'identification d'espèces.

D'autres groupes tels que les cellules fluorescentes jaunes FLY1 et FLY2 se distinguaient par leur forte signature de fluorescence jaune. Ce type de fluorescence est reconnu chez certains ciliés et parfois chez des cellules lysées, après ingestion par du zooplancton (Laval-Peuto et Rassoulzadegan, 1988). L'étude de Grattepanche (2007) a également permis d'évaluer l'impact du broutage sur les cellules nanoplanctoniques. Les ciliés semblent être les principaux prédateurs des cellules nanoplanctoniques autotrophes telles que les cellules libres de *Phaeocystis globosa*, et peuvent ingérer jusqu'à 11% du stock par jour. Cependant, les cellules fluorescentes jaunes FLY2, suspectées d'être des ciliés apparaissent 10 fois plus abondantes au cytomètre ($10^2 \text{ cell.mL}^{-1}$) qu'au microscope à épifluorescence (Grattepanche, 2007). Ce phénomène peut être dû au fait que la fixation des ciliés peut entraîner des pertes cellulaires (Karayanni et al., 2004).

Les diatomées présentaient les niveaux les plus élevés de fluorescence rouge (**Tableau IV.1**). Bien qu'il s'agisse de cellules microplanctoniques, les groupes de diatomées peuvent atteindre des concentrations comparables à celles de certains groupes de cellules nanoplanctoniques (**Tableau IV.3**). Cependant il résulte encore une erreur d'estimation d'abondance au cytomètre de 10% des cellules microplanctoniques ($> 20 \mu\text{m}$), alors que l'erreur communément admise est inférieure à 3% (Grégori et al., 2001 ; Thyssen et al., 2008).

Pour le moment, le comptage au niveau de l'espèce ne peut être réalisé avec précision que pour les espèces facilement identifiables (*Pseudo-nitzschia spp.*) et les espèces dominantes numériquement. Le taux de reconnaissance des espèces est de 60% (Wacquet, 2008), toutefois les comparaisons préliminaires avec les comptages microscopiques sont encourageantes (**Fig. IV.6**). L'approche automatisée sur la reconnaissance de forme des signaux (DTW ; Caillault et al., 2009) à partir d'une base d'apprentissage de profils d'espèce permettra une amélioration considérable dans la discrimination d'espèce (**Fig. IV.7**).

Un autre problème de sous-estimation de comptage concerne les diatomées formant des colonies et des chaînes (**Fig. IV.6-F et E**). Il est encore difficile d'appréhender le nombre de cellules par colonie, ce travail restant manuel et aussi laborieux que les comptages microscopiques. L'utilisation de la durée moyenne du signal d'une cellule permet une

meilleure estimation (**Fig. IV.7**). Cependant, cette approche nécessite une calibration manuelle pour chaque espèce formant des chaînes et reste dépendant des changements de taille des cellules individuelles (Olson et Sosik, 2007).

Variabilité à court terme en relation avec les facteurs environnementaux

La fréquence d'échantillonnage est cruciale pour suivre la dynamique du phytoplancton (Dubelaar et al., 2004). Les variations à court terme s'échelonnent d'une échelle horaire à plusieurs jours et ne sont pas observables lorsque l'échantillonnage est de l'ordre d'une fois par semaine ou par mois. Les suivis réalisés à fréquence de l'ordre d'une fois par jour avec le CytoSense ont permis de suivre l'évolution de groupes phytoplanctoniques et de rendre compte de la succession de certains de ces groupes, en particulier des cellules de *Phaeocystis globosa*.

Le chapitre III de cette étude a permis de souligner la rapidité de certains développements phytoplanctoniques (de l'ordre de 15 à 30 jours). Les périodes échantillonnées à plus court terme, au cours du printemps 2007, correspondaient aux quatre changements de structure répertoriés au chapitre III (§ III). La première période (P1) correspondait à un premier bloom de diatomées, en particulier de l'espèce *Chaetoceros socialis*. La seconde période (P2) était associée à la phase exponentielle du bloom de *Phaeocystis globosa*. La troisième période (P3) correspondait à la phase de décroissance du bloom de *Phaeocystis globosa* et au bloom de la diatomée, *Pseudo-nitzschia delicatissima*. La quatrième période (P4) coïncidait avec un second bloom de *Chaetoceros socialis*. Ainsi, la dynamique du groupe des diatomées HFL était davantage représentative des développements de *Chaetoceros socialis* tandis que le groupe de diatomées LFL était représentatif des développements de *Pseudo-nitzschia delicatissima*.

Certains groupes présentaient des pics successifs d'abondance au cours des différents suivis à court terme, en particulier durant les phases de bloom P2 et P3 (**Fig. IV. 10**). Ce phénomène était principalement observé pour les cellules coloniales de *Phaeocystis globosa*, ainsi que pour les groupes de diatomées.

D'après Pannard et al. (2008a), les événements de mélange et les mouvements advectifs de l'eau influencent les fluctuations de la biomasse du phytoplancton total et la concentration des espèces dominantes, tandis que les processus locaux influencent les changements de structure de la communauté. Les événements de mélange peuvent également entraîner des changements

dans la structure de la communauté lorsqu'ils sont associés à des changements de limitation en lumière et/ou en sels nutritifs.

En Manche orientale, le vent induit des courants qui peuvent être supérieurs au courant résiduel de la marée (Salomon et Breton, 1993), entraînant un mélange vertical de la colonne d'eau et une dispersion de la masse d'eau côtière vers le large (Brylinski et al., 1991). En particulier, les sels nutritifs azotés peuvent augmenter dans les eaux de surface à partir du mélange vertical. Au cours de la phase de décroissance du bloom P3, l'événement de vent fort ($> 6 \text{ m.s}^{-1}$ pendant une semaine) a pu entraîner des augmentations de sels nutritifs par mélange avec les eaux profondes (**Fig. IV.9-B3 et C3**). Des augmentations de concentrations en ammonium et en nitrate ont ainsi été observées 4 à 5 jours après la période de vent maximal. Cependant au cours de cette période, une succession de proliférations de groupes s'est mise en place dès deux jours après la période de vent maximal (**Fig. IV.10**). En accord avec Thyssen et al. (2008), les événements de fort vent persistant induisent une recolonisation du milieu par succession. Les proliférations successives ont pu être soutenues par des concentrations élevées en phosphates qui après consommation, ont atteint des valeurs inférieures à $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (**Fig. IV.9-C3**).

Les premières cellules à proliférer ont été les cellules coloniales de *Phaeocystis* (**Fig. IV.10-A3**). La corrélation positive observée entre la vitesse du vent et les cellules coloniales (**Tableau IV.5**) suggère (i) une influence des conditions de mélange sur la concentration cellulaire et (ii) que les augmentations résulteraient d'une advection. Il a par ailleurs été mis en évidence que la taille des colonies augmentait avec la turbulence jusqu'à un certain seuil au-delà duquel la taille diminuerait (Schapira et al., 2005).

En dehors de l'événement de fort vent, les changements de dominance d'espèces sont reliés aux changements physiques et chimiques. L'alternance entre les flagellés LFL et les flagellés HFL apparaît reliée aux changements de concentrations en nitrate. Cependant, il est particulièrement reconnu dans la littérature que les flagellés sont de meilleurs compétiteurs pour le phosphore (Riegman et Van Boekel, 1996). L'augmentation des flagellés HFL concomitante à la diminution des flagellés LFL indiquerait une transformation. Ainsi, l'observation d'un passage de flagellés LFL vers des flagellés HFL au cours des premières phases du bloom, pourrait être liée au passage des flagellés haploïdes vers les flagellés diploïdes (Peperzak et al., 2000 ; Rousseau et al., 2007), même s'ils n'ont pas pu être détectés en cytométrie au cours de notre étude, car très peu abondants. L'augmentation des paramètres cellulaires de taille et de fluorescence de la chlorophylle *a* enregistrées au cours des phases de bloom, révèlent l'intense activité cellulaire des cellules coloniales de *Phaeocystis globosa*.

(Tableau IV.4). Les paramètres des cellules coloniales ont montré de plus fortes variations que ceux des cellules flagellées, indiquant d'importants changements physiologiques au cours des différentes semaines du bloom.

...vers la variabilité intra-journalière

De premières observations de variations intra-journalières à l'aide d'un suivi lagrangien ont également été montrées dans le cadre de cette étude.

La co-occurrence d'une augmentation de l'abondance et du FWS est caractéristique d'une division cellulaire (Thyssen et al., 2008 ; DuRand et Olson, 1996). En particulier, la périodicité de la FLR et du FWS permet de définir le cycle cellulaire des cellules coloniales de *Phaeocystis globosa* (Veldhuis et al., 2005). L'évolution de ces deux paramètres consiste en une diminution au cours de la première période de la phase lumineuse suivie d'une augmentation au cours de la seconde période de la phase lumineuse. Cette période d'augmentation correspond à la phase de réPLICATION de l'ADN. D'après Veldhuis et al. (2005), cette phase est suivie d'une diminution correspondant à la division cellulaire ayant lieu à la fin de la phase lumineuse et au début de la phase obscure. Les cellules coloniales de *P. globosa* se caractérisent par plusieurs divisions par jour (taux de croissance maximal de $2,0\text{ j}^{-1}$). La croissance en phase obscure est alors facilitée par l'apport énergétique provenant de la dégradation des polysaccharides organiques du mucus.

La concomitance de l'augmentation des cellules FLY1 et FLY2 pouvant correspondre à des cellules lysées, dégradées ou ingérées par des ciliés révèlent la pression de broutage exercée par le microzooplancton sur les cellules libres de *Phaeocystis globosa*. Les cellules FLY1 et FLY2 sont plus nombreuses en surface ce qui montre que le broutage s'y effectuerait préférentiellement. En conséquence, l'abondance des cellules coloniales de *P. globosa* est plus faible en surface (23% de réduction par rapport à la profondeur). La gamme de taille des cellules FLY1 est similaire à celle des cellules coloniales (7-8 μm). Ces observations révèlent l'impact journalier du microzooplancton, en particulier des ciliés sur les cellules libres de *Phaeocystis globosa* (Grattepanche, 2007).

Les diatomées LFL présentent également un cycle journalier de l'abondance concomitant à celui des paramètres de FLR et de FWS. D'après les observations microscopiques en accord avec les analyses cytométriques des cultures, ce groupe était dominé exclusivement par l'espèce *Pseudo-nitzschia delicatissima*. La croissance de cette espèce diffère de celle de *Phaeocystis globosa* avec un rythme proche de celui de la luminosité (rythme circadien).

Cette croissance consiste en (i) une augmentation des paramètres au cours de la première partie de la phase lumineuse, (ii) des valeurs maximales atteintes au moment du maximum de radiation solaire (vers 12:30) et (iii) une diminution des paramètres au cours de la seconde période de la phase lumineuse. Pour une photopériode de 16 h de lumière- 8 h d'obscurité, le taux de croissance de *Pseudo-nitzschia delicatissima* peut atteindre $0,9 \text{ j}^{-1}$ (Fehling et al., 2004).

D'autres groupes, telles que les flagellés de *Phaeocystis globosa* et les diatomées HFL, ne montrent pas de synchronicité des paramètres. Le groupe des diatomées HFL est composé de plusieurs espèces pouvant être caractérisées par des taux de croissance différents. Cependant, les tendances inverses des abondances des diatomées HFL entre le fond et la surface au cours de la seconde période de la phase lumineuse peuvent être attribuées à la sédimentation et à la migration verticale de ces cellules. En revanche, les variations observées pour les flagellés seraient davantage dues à un processus sexué. L'apparition des flagellés de *P. globosa* résulte d'une méiose à partir de la division des cellules coloniales (Rousseau et al., 2007). Veldhuis et al. (2005) ont observé un état haploïde de l'ADN au cours d'une brève période entre deux cycles de réplication des cellules coloniales.

En conclusion, au cours des blooms phytoplanctoniques, les réponses sont d'autant plus rapides que les taux de croissance peuvent être supérieurs à la journée. Dans cette étude, nous avons examiné les variations des communautés phytoplanctoniques à court terme au cours de différentes phases d'un bloom (cf. Chapitre III). L'énumération et l'analyse de la composition des communautés phytoplanctoniques ont été réalisées à l'aide d'un nouvel instrument Cytosense et de logiciels Cytoclus et Python. Cette approche avec une technique alternative à la microscopie à inversion utilisée au cours des deux chapitres précédents nous a permis d'obtenir certaines informations sur la composition mais également sur l'état physiologique des cellules. On a pu ainsi remarquer que les espèces dominantes étaient contrôlées à des échelles de temps saisonnière et hebdomadaire (les cellules de *P. globosa*), alors que certaines autres espèces parfois plus rares (diatomées LFL) étaient indicatrices de changements à très court terme et répondaient aux événements de vent (Pannard et al., 2008b). Le premier essai de suivi lagrangien a permis d'identifier les variations journalières de certaines cellules (cellules coloniales et les diatomées LFL). Cependant, l'intensification de ce type de suivi à d'autres périodes du bloom est nécessaire pour confirmer ces observations. Ces suivis, prévus à l'origine pendant une quinzaine de jours au milieu du printemps, n'ont pu avoir lieu que

pendant une seule journée, étant donné les mauvaises conditions météorologiques du mois de mai 2007. De plus, sur la base de telles données cytométriques, il est difficile d'appréhender les taux de croissance des cellules phytoplanctoniques. Des apports techniques plus importants tels que des marquages d'ADN seraient alors nécessaires pour caractériser les cycles cellulaires en milieu naturel (Thyssen et al., 2008). Enfin, comme l'échantillonnage à partir d'un bateau est limité par les contraintes logistiques et parfois par les conditions météorologiques, la solution appropriée serait l'utilisation d'un cytomètre en flux submersible de type CytoSub ou FlowCytobot en un point fixe associé à une bouée de type MAREL (Iremer), permettant de prélever et d'analyser automatiquement le phytoplancton dans le milieu pour réaliser un suivi eulérien à haute fréquence (Sosik et al., 2003 ; Olson et Sosik, 2007 ; Thyssen, 2008). Des bateaux pourraient être équipés de cytomètre dans des systèmes de type Ferrybox, pour des suivis transmanche.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La Manche orientale constitue un site d'étude d'un grand intérêt pour la recherche scientifique. Il s'agit d'un écosystème particulièrement dynamique, d'une richesse biologique importante et d'une zone d'interface productive.

Le phytoplancton est constitué d'une grande diversité d'organismes dont la dynamique reste encore mal connue en raison de problèmes liés aux méthodes d'observation. A l'échelle spécifique, le phytoplancton possède un important potentiel d'adaptation qui en fait un bon bio-indicateur des conditions du milieu. Il est donc important de cibler les études sur cette diversité du phytoplancton. De plus, la variabilité du phytoplancton s'exprime à différentes échelles temporelles (i. e. journalière à interannuelle). Une mesure ponctuelle ne peut en aucun cas rendre compte de l'étendue des variations phytoplanctoniques.

Le travail exposé ici représente un grand intérêt pour mieux comprendre le rôle des communautés phytoplanctoniques en zone côtière de la Manche orientale. Il a permis de définir la composition spécifique du phytoplancton, de décrire sa dynamique temporelle, de définir de nouveaux outils pour suivre et décrire en détails sa variabilité. La conclusion générale reprendra les points principaux des questions posées et discutera de certains aspects qui sont apparus intéressants au cours de ce travail. Enfin, la conclusion débouchera sur quelques éléments de perspectives de recherche découlant de ce travail.

Cette étude repose sur une analyse descriptive à différentes échelles temporelles d'observation tenant compte des paramètres physiques, chimiques et biologiques susceptibles d'exercer un forçage sur la variabilité temporelle du phytoplancton.

Quelle est la la dynamique du compartiment phytoplancton?

Variabilité à long terme

Cette étude représentait une première approche globalisée de la dynamique des principaux groupes et espèces phytoplanctoniques de l'écosystème Manche orientale. Elle nous a permis de définir les variations saisonnières et les tendances pluriannuelles globales des communautés phytoplanctoniques en relation avec les concentrations en sels nutritifs. L'impact de la ressource nutritive sur la dynamique phytoplanctonique est clairement apparu au niveau des deux échelles d'observation : saisonnière et interannuelle.

En accord avec les études antérieures réalisées à l'échelle saisonnière (Brunet et al., 1996 ; Breton et al., 2000 ; Seuront et Vincent, 2006 ; Schapira et al., 2008), la période productive, entre mars et juillet, est principalement dominée par les diatomées et la Prymnésiophycée *Phaeocystis globosa*. Il a été défini trois assemblages dont la succession apparaissait contrôlée par la disponibilité en sels nutritifs (Estrada et al., 1988).

A l'échelle annuelle, la fréquence des blooms apparaissait reliée aux concentrations hivernales en concentrations nutritives. Les blooms relevés à partir de la fin des années 1990 étaient dominés par des espèces exceptionnelles, en particulier estivales. Ces changements coïncident avec une diminution des apports en phosphate, reconnue pour altérer la structure sur le long terme (Tyrrell, 1999). Cependant, le statut nutritif ne peut être suffisant pour expliquer à lui seul la variabilité interannuelle. Les forçages hydro-climatiques seraient responsables des brusques changements d'intensité de développement de blooms d'année en année (Seuront et Souissi, 2002 ; Breton et al., 2006) par l'intermédiaire notamment d'une modification des conditions de lumière.

- (i) L'étude à long terme a permis de définir la période productive et de situer le contexte écologique en Manche orientale.
- (ii) Elle a également montré l'importante variabilité interannuelle des blooms qui seraient influencées par les conditions hydro-climatiques.
- (iii) Elle a souligné l'intérêt d'augmenter la fréquence d'échantillonnage pour l'observation des conditions écologiques et des mécanismes régissant les blooms.

Variabilité à moyen terme

L'étude des blooms a nécessité la définition de la structure des communautés et des niches écologiques avant d'appréhender la variabilité interannuelle. Trois assemblages spécifiques ont été définis du printemps et ont été considérés comme des assemblages fonctionnels (Reynolds, 2001). Les résultats ont mis en évidence des assemblages hétérogènes en terme de stratégie, dont la succession dépendait des conditions nutritives et de stratification de la colonne d'eau. Cette hétérogénéité des assemblages a souligné l'existence d'une variabilité à plus faible échelle temporelle et révélée par une fréquence d'échantillonnage plus fine.

Cette étude a également montré l'importante variabilité interannuelle entre les blooms chaque année. Les conditions environnementales particulières des années 2005, 2006 et 2007 ont joué un rôle important dans le calendrier des blooms phytoplanctoniques. Si l'année 2006 fait état d'un bloom précoce de *Phaeocystis globosa* (mars) par rapport à sa période habituelle

d'apparition (avril), l'année 2005 a été caractérisée par un bloom de faible amplitude. L'établissement d'une stratification sous contrôle hydro-climatique influencerait les conditions de lumière à l'origine de l'apparition de *Phaeocystis globosa*.

Une autre variabilité interannuelle concerne la fréquence de blooms. Elle reflète le succès et l'opportunisme de certaines espèces. Certains de ces blooms apparaissent induits par *Phaeocystis globosa* via la production de matière organique, alors que d'autres blooms semblent soutenus par des apports ponctuels en sels nutritifs.

Variabilité à court terme

La présente étude constitue une première approche par cytométrie en flux de la caractérisation des communautés phytoplanctoniques en zone côtière tempérée et eutrophisée. La majorité des études antérieures réalisées en cytométrie en flux en milieu oligotrophe ou en culture, l'ont en effet été..

L'analyse des profils optiques, scannés par le cytomètre en flux CytoSense, permet d'obtenir les principales informations qualitatives sur la morphologie des cellules et de traiter une quantité suffisante de données pour analyser la dynamique phytoplancton à une fréquence plus élevée. Toutes ces observations ont permis de définir neuf groupes de taille cellulaire comprise entre 2 et $> 50 \mu\text{m}$. Cependant, la validation statistique du comptage des cellules de grande taille reste sous la dépendance de leur concentration et l'identification des espèces reste sous l'appréciation de l'opérateur.

Les groupes définis en fonction de leurs propriétés optiques apportent des informations complémentaires par rapport aux groupes définis en fonction de leur origine taxonomique, de leur morphologie et/ou de leur occurrence. Des concordances ont été trouvées entre les groupes optiques et les groupes phylogénétiques, sur la base des propriétés de fluorescence des pigments (i.e. Cyanobactéries, Cryptophycées, diatomées). Cependant l'analyse des attributs de profils a permis de différencier un plus grand nombre de groupes particulièrement. Deux principaux critères ont été à l'origine de cette discrimination. Le niveau de fluorescence a notamment permis de distinguer des cellules dégradées, des espèces de diatomées contenant moins de pigments chlorophylliens, et les différents types de flagellés de *Phaeocystis globosa*. La taille a, quant à elle, permis de mettre en évidence des cellules de petite taille telles que des cyanobactéries, difficilement observables par microscopie.

L'échelle temporelle utilisée pour suivre la dynamique à court terme de ces groupes a permis d'identifier deux mécanismes principaux de variabilité: (i) une variabilité induite par les

conditions locales (nutritive et lumineuse) et (ii) une variabilité induite par le mélange de la colonne d'eau.

Quelle est la structure phytoplanctonique au sein de l'écosystème Manche orientale ?

Les caractéristiques des groupes fonctionnels sont variables d'une étude à l'autre (Claustre, 1994 ; Falkowski et al., 1998 ; Bouman et al., 2003). Leur définition dépend de l'objectif scientifique posé. Les groupes taxonomiques sont souvent hétérogènes au regard des paramètres physiologiques des espèces.

Trois assemblages saisonnier ont été définis au cours des échelles à long et moyen terme. Ces assemblages saisonniers confirment, en général, ceux reconnus dans la littérature et définis souvent au cours d'études annuelles isolées (Muylaert et al. ; 2006 ; Seuront et Vincent, 2008). Cependant, il a été décelé une occurrence nouvelle des espèces de *Pseudo-nitzschia* dans les assemblages printaniers et estivaux par rapport aux études antérieures aux années 2000 (Rousseau et al., 2002). Ces espèces apparaissent particulièrement liée à *Phaeocystis globosa*; soit par association directe de *Pseudo-nitzschia* sur les colonies (Sazhin et al., 2007), soit indirectement par utilisation de la matière organique relarguée lors de la sénescence des colonies (Loureiro et al., 2008).

Trois groupes de diatomées à partir d'espèces cultivées ont été également définis par cytométrie en flux. Ces groupes de cellules se regroupent en fonction de leur contenu pigmentaire et de leur taille (Matériels et Méthodes ; Cf III.5.2.). Cette définition introduit la notion de groupes fonctionnels à partir des critères physiologiques des cellules. L'étude des espèces par groupes fonctionnels apparaît non seulement plus pertinente d'un point de vue écologique, mais également plus simple à mettre en œuvre grâce à cette technique de cytométrie en flux.

L'analyse des groupes fonctionnels a également permis de mettre en évidence des groupes de cellules à un niveau intra-spécifique, par exemple composés de différents morphotypes de *Phaeocystis globosa*. La définition de groupes à partir des propriétés optiques des cellules a permis de valider l'existence d'un nouveau morphotype de *P. globosa*, dont l'existence était soupçonnée par des observations optiques. Ainsi un nouveau morphotype de *Phaeocystis* a été révélé conforme à d'autres observations par méthode optique (Peperzak et al., 2000 ; Rutten et al., 2005).

Quelle est la méthodologie appropriée pour le suivi de la dynamique phytoplanctonique ?

Le temps d'analyse, avec un Cytosense, dépend de la densité des cellules présentes dans l'échantillon et n'excède en général pas 15 min. Ce type de technique peut ainsi être opérée *in situ* dans le cadre de suivis à haute fréquence spatio-temporelle (Thyssen, 2008). Le temps d'analyse est à supplémenter d'1 heure pour le traitement des données, ce qui reste 3 fois inférieur au temps nécessaire à l'analyse par microscopie.

La cytométrie en flux apporte une meilleure estimation et reproductivité des comptages des petites cellules (jusqu'à 0,5 µm). Cependant, l'estimation de la taille des cellules inférieures à la largeur du faisceau laser (5 µm) est à prendre avec précaution. Le CytoSense est néanmoins plus sensible pour la détection des plus petites cellules que d'autres cytomètres tels que le FlowCAM et permettent de discriminer des groupes phytoplanctoniques sur la base de la fluorescence des pigments et de la diffusion de la lumière comme indice de taille.

La reconnaissance des espèces constitue la principale limite de la cytométrie en flux. La compagnie CytoBuoy a développé un instrument capable de fournir le profil des signaux optiques générés. L'exploitation de tels profils par le biais de méthodes mathématiques a été engagée au cours de ce travail et fournit des premiers résultats prometteurs dans le suivi d'espèces. Ces méthodes mathématiques reposent sur un apprentissage du logiciel de reconnaissance à poursuivre et à partager. Le couplage entre les profils optiques et des images prises par une caméra permettra un meilleur apprentissage et une meilleure reconnaissance des cellules microplanctoniques.

La cytométrie donne des informations sur la fonctionnalité du phytoplancton en regroupant les cellules possédant les mêmes propriétés optiques. Cette approche fournit un moyen simplifié d'étudier les assemblages phytoplanctoniques en l'absence d'identification d'espèces. Le CytoSense fournit une importante quantité d'informations sur les propriétés optiques des particules et permet d'établir de nombreux critères fonctionnels. Ceux-ci dépendent directement de la question scientifique posée et constitueraient une information suffisante dans le cadre de suivis réglementaires. Cependant, des analyses ponctuelles par microscopie pour plus de précision sur la composition spécifique et connaître les espèces responsables des blooms restent indispensables. Le degré de reconnaissance dépend de l'objectif posé lors d'un suivi (Rutten et al., 2005). Lorsqu'elle est couplée à un examen rapide par microscopie, la cytométrie en flux permet de suivre les proliférations d'espèces dominantes mais ne permet pas de détecter des espèces plus rares et de prévenir de manière précoce, les proliférations.

L'analyse de particules de grande taille ($> 20 \mu\text{m}$) est rendue possible grâce à des vitesses de flux plus élevées et une plus grande capacité de mémoire (comparé notamment au FlowCytoBot). Ces capacités à analyser des cellules de plus grande taille et des diatomées formant des chaînes ont pour le moment été expérimentées dans des études en culture et en milieu clos (Takabayashi et al., 2006). Ce développement permet de diminuer considérablement les limites de détection.

Pour le moment, il existe encore d'importantes sous-estimations des particules de grande taille (CVp $> 10\%$) et la reconnaissance des profils optiques reste dépendante de l'opérateur, ce qui représente une tâche aussi fastidieuse que la reconnaissance par microscopie. Des procédures d'automatisation de la reconnaissance ont été engagées au cours de cette étude et apportent des premiers résultats prometteurs. En particulier, cette méthode permet d'automatiser l'estimation, jusque là manuelle, des cellules en colonie (Takabayashi et al., 2006). Cependant, cette méthode demande un apprentissage important. De plus, de nouveaux développements tels que l'ajout d'une caméra, permettront d'améliorer la reconnaissance au cours de l'analyse cytométrique (Buskey et Hyatt, 2006).

Tableau 1 : Spécificités techniques des deux méthodes de comptages phytoplanctoniques utilisées dans cette étude : la cytométrie en flux 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 $> 1000 \mu\text{m}$	Concentration de toutes les espèces entre 5 et $> 1000 \mu\text{m}$
Coût de l'instrument	Onéreux	Modéré
Coût total d'analyse (analyse + traitement des données + contrôle qualité)	1 h	4 h

La microscopie optique est une méthode donnant facilement accès à la diversité taxonomique. Elle offre une vue intéressante sur le statut écologique d'un écosystème depuis que le niveau taxonomique est considéré comme le plus précis en terme de relation entre la population et l'environnement, cependant il n'explique pas la fonctionnalité des espèces observées qui est une information intéressante à collecter (Reynolds, 2002; Pena, 2003; Hood et al., 2006).

La présente étude montre que la cytométrie en flux pourrait être utilisée en analyse de routine de manière automatisée et que des observations par microscopie optique ponctuelles viendraient compléter l'interprétation du comportement de la communauté phytoplanctonique.

Les perspectives

Même si de nombreux éléments de réponse ont été amenés au cours de ce travail, certains aspects restent à éclaircir.

En premier lieu, il s'agirait d'affiner encore les études de variabilité phytoplanctonique à court terme et de les étendre à toute l'année. Il existe déjà des stations de mesure automatiques qui réalisent des mesures hydrologiques, chimiques, biologiques et météorologiques à haute fréquence temporelle. Par exemple, la bouée MAREL Carnot gérée par l'Ifremer de Boulogne-sur-mer mesure toutes les 30 min. différents paramètres dans la colonne d'eau depuis 2004 (<http://www.ifremer.fr/difMarelCarnot/>; Lefebvre et Repecaud, 2006).

Un cytomètre en flux pourrait être utilisé sous forme immergée soit en un point fixe comme le cytomètre CytoSub (Thyssen, 2008), soit en bouée comme CytoBuoy ou FlowCytobot (Olson et Sosik, 2007). Ces types d'instrument permettraient de pallier aux difficultés rencontrées en milieu naturel (i) par automatisation des mesures en les couplant à des bouées fixes (MAREL) ou mobiles, (ii) par extension de la base de données aux périodes en dehors des blooms et aux eaux du large, peu accessibles en bateau.

La méthode de cytométrie en flux devrait être comparée à une autre méthode reproductible donnant une signature plus globale, telle que l'HPLC. Cette comparaison permettrait notamment d'apporter certains éclaircissements sur le statut physiologique des groupes phytoplanctoniques. D'autres expériences physiologiques pourraient notamment être testées au cytomètre en flux, par marquage fluorescent ou digestion enzymatique, pour évaluer le cycle cellulaire ou la viabilité des cellules.

La variabilité spatiale n'a pas été abordée dans cette étude. Bien que des mesures au cytomètre en flux aient été effectuées à méso-échelle en Mer du Nord et à micro-échelle en Manche orientale, les analyses n'ont pu être traitées dans le cadre de cette thèse faute de temps. Cette approche spatiale pourrait permettre une comparaison avec d'autres données optiques acquises par télédétection depuis l'espace. Une nouvelle méthode a été publiée à partir de la couleur des eaux de surface (PHYSAT ; Alvain et al., 2005) et a déjà permis de suivre la dynamique de groupes dominants à l'échelle globale de l'océan (Alvain et al., 2008). D'autres méthodes de télédétection utilisent des algorithmes définis des propriétés bio-optiques du phytoplancton telles que la diffusion. (Loisel et al., 2007 ; Lubac et al., 2008). Il serait intéressant d'élargir le concept des groupes cytométriques à la détection par satellite. De même, la constitution de la base de données cytométriques acquises en milieu naturel pourrait fournir une source d'informations intéressantes pour les modèles écologiques. Certains modèles ont déjà été spécifiquement élaborés pour mieux comprendre le cycle de vie et l'impact de *Phaeocystis globosa* sur les processus géochimiques (Whipple et al., 2007). Certains facteurs de contrôle semblent avoir affecté la dynamique phytoplanctonique de manière directe ou indirecte tels que la lumière, le broutage ou la compétition interspécifique. Il serait intéressant et nécessaire de poursuivre ces observations dans le cadre d'études expérimentales.

Les mésocosmes sont des outils particulièrement intéressants pour étudier le développement de blooms phytoplanctoniques sous différentes conditions environnementales. Ces perspectives semblent réalisables à court terme puisque ce genre d'expérimentation est régulièrement mené au sein du laboratoire par la réalisation de mésocosme au cours des blooms de *Phaeocystis globosa*, en particulier concernant la phase de décroissance des blooms. Les premières études sur les blooms de *P. globosa* ont montré la disparition soudaine de l'espèce dans la colonne d'eau, le déclin des blooms a par ailleurs un impact important sur la structure et le fonctionnement du réseau trophique. Les cellules solitaires de petite taille peuvent être contrôlées par le broutage du microzooplancton (Weisse et al., 1994; Tang et al., 2001), alors que le broutage du mésozooplancton sur les colonies de *P. globosa* tend à être faible (Tang et al., 2001; Turner et al., 2002; Nejstgaard et al., 2007). Après le broutage, la lyse cellulaire est une source importante de mortalité en particulier celle d'origine virale (Brussard et al., 2005 ; Brussard et al., 2004).

Conclusion générale et perspectives

Il a été démontré dans cette thèse, l'intérêt de poursuivre les suivis à long terme des communautés phytoplanctoniques. L'occurrence de blooms d'espèces exceptionnelles depuis la fin des années 90 coïnciderait avec un potentiel changement hydroclimatique (Weijerman et al., 2005). Les études à plus court terme permettent de comprendre le succès d'une espèce par rapport à une autre. Les connaissances sur la dynamique phytoplanctonique s'inscrivent naturellement dans une gestion durable de l'écosystème, en particulier et plus que jamais, dans le contexte climatique actuel. Les prédictions climatiques à moyen terme correspondent à l'augmentation d'événements jusque là exceptionnels. Les résultats de cette étude semblent pouvoir constituer une base scientifique pour approfondir les connaissances actuelles et définir des initiatives de développement durable (DCE, 2000).

BIBLIOGRAPHIE

A

- Agawin SR, Duarte CM, Agusti S (1998).** Growth and abundance of *Synechococcus sp.* in a Mediterranean Bay: seasonality and relationship with temperature. *Marine Ecology Progress Series*. 170: 45-53.
- Alvain S, Moulin C, Dandonneau Y, Bréon FM (2005).** Remote sensing of phytoplankton groups in case 1 waters from global SeaWiFS imagery. *Deep Sea Research I*. 52: 1989-2004.
- 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*. 22.
- Alves-De-Souza C, Gonzalez MT, Iriarte JL (2008).** Functional groups of marine phytoplankton assemblages dominated in fjords of southern Chile. *Journal of Plankton Research*. 11: 1233-1243.
- Aminot A, Chaussepied M (1983).** Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, Brest: 395 pp.
- Aminot A, Kérouel R (2004).** Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Ifremer: 336 pp.
- Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (1998).** Physiological ecology of harmful algal blooms, NATO ASI series, vol G41. Springer-Verlag, Berlin: 662 pp.
- Anglès S, Jordi A, Garcés E, Masó M, Basterretxea G (2008).** High-resolution spatio-temporal distribution of a coastal phytoplankton bloom using laser in situ scattering and transmissometry (LISST). *Harmful Algae*. 7: 808-816.
- Anonyme (1988).** Courants de mare dans le Pas-de-Calais. Service Hydrographique et océanographique de la Marine, Paris.

B

- Baretta-Becker JG, Loeb M, Colijn F, Lancelot C, Philppart CJM, Rousseau V, Wiltshire KH (2009).** Recent patterns in potential phytoplankton limitation along the Northwest European continental coast. *Journal of Sea Research*. 61: 34-43.
- Bates SS, Garrison DL, Horner RA (1998).** Bloom dynamics and physiology of domoic-acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. In: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, Berlin: pp. 268-292.
- Barbault R (1992).** Ecologie des peuplements. Masson, Paris: 273 pp.
- Bendschneider K, Robinson RJ (1952).** A new spectrophotometric determination of nitrate in seawater. *Journal of Marine Research*. 11: 87-96.
- Bertho M-L (1998).** Le plomb associé aux aérosols atmosphériques dans le Détrict du Pas de Calais : sources, flux et devenir à l'interface air-mer. Thèse de Doctorat de l'Université du Littoral-Côte d'Opale: 275 pp.
- Bougis P (1974).** Ecologie du plancton marin. I. Le phytoplancton. Masson et Cie, Paris: 196 pp.
- Bouman H, Platt T, Sathyendranath S, Li WKW, Stuart V, Fuentes-Yaco C, Maass H, Horne EPW, Ulloa O, Lutz V, Kyewalyanga M (2003).** Temperature as indicator of optical properties and community structure of marine phytoplankton: implications for remote sensing. *Marine Ecology Progress Series*. 258: 19-30.

- Breton E (2000).** Qualité du pool nutritif et nutrition des copépodes pélagiques en Manche orientale. Thèse de doctorat, Université du Littoral-Côte d'Opale: 282 pp.
- Breton E, Brunet C, Sautour B, Brylinski J-M (2000).** Annual variations of phytoplanktonic biomass in the Eastern English Channel: comparison by pigment signatures and microscopic counts. *Journal of Plankton Research*. 22: 1423-1440.
- Breton E, Rousseau V, Parent J-Y, Ozer J, Lancelot C (2006).** Hydroclimatic modulation of diatom/*Phaeocystis* blooms in the nutrient-enriched Belgian coastal waters (North Sea). *Limnology and Oceanography*. 51: 1401-1409.
- Brunet C, Brylinski J-M, Frontier S (1992).** Productivity, photosynthetic pigments and hydrology in the coastal front of the eastern English Channel. *Journal of Plankton Research*. 14: 1541-1552.
- Brunet C, Brylinski J-M, Bodineau L, Thoumelin G, Bentley D, Hilde D (1996).** Phytoplankton dynamics during the spring bloom in the South-Eastern English Channel. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 43: 469-483.
- Brussaard CPD, Gast GJ, van Duyl FC, Riegman R (1996).** Impact of phytoplankton bloom magnitude on a pelagic microbial food web. *Marine Ecology Progress Series*. 144: 211-221.
- Brussaard CPD, Thyrhaug R, Marie D, Bratbak G (1999).** Flow cytometric analyses of viral infection in two marine phytoplankton species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) and *Phaeocystis pouchetii* (Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology*. 35: 941-948.
- Brussaard CPD, Kuipers B, Veldhuis MJW (2005).** A mesocosm study of *Phaeocystis globosa* population dynamics. I. Regulatory role of viruses in bloom control. *Harmful Algae*. 4: 859-874.
- Brylinski J-M (1993).** Ecohydrodynamique pélagique en Manche orientale. Habilitation à diriger des recherches, Université de Lille I: 270 pp.
- Brylinski J-M, Lagadeuc Y, Gentilhomme V, Dupont J-P, Lafite R, Dupeuble P-A, Huault M-F, Auger Y, Puskaric E, Wartel M, Cabioch L (1991).** Le "fleuve Côtier": un phénomène hydrologique important en Manche Orientale. Exemple du Pas de Calais. *Oceanologica Acta*. 11: 197-203.
- Brylinski JM, Brunet C, Bentley D, Thoumelin G, Hilde D (1996).** Hydrography and phytoplankton biomass in the Eastern English Channel in spring 1992. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 43: 507-519.
- Brzezinski MA (1985).** The Si:N:P ratio of marine diatoms: interspecific variability and the effect of some environmental variables. *Journal of Phycology*. 21: 347-357.
- Burkhard AH, Gais P, Jütting U, Scherb H, Rodenacker K (2008).** Use of fluorescence information for automated phytoplankton investigation by image analysis. *Journal of Plankton Research*. 30: 587-606.
- Burkholder JM, Glibert PM, Skelton HM (2008).** Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*. 8: 77-93.
- Buskey EJ, Hyatt CJ (2006).** Use of the FlowCAM for semi-automated recognition and enumeration of red tide cells (*Karenia brevis*) in natural plankton samples. *Harmful Algae*. 5: 685-692

C

- Cadée GC (1986).** Recurrent and changing seasonal patterns in phytoplankton of the westernmost inlet of the Dutch Wadden Sea from 1969 to 1985. *Marine Biology*. 93: 281-289.
- Cadée GC, Hegeman J (2002).** Phytoplankton in the Marsdiep at the end of the 20th century; 30 years of monitoring biomass, primary production, and *Phaeocystis globosa*. *Journal of Sea Research*. 48: 97-110.

Bibliographie

Caillault E, Hébert P-A, Guiselin N, Artigas LF (2009). Classification de cytogrammes par appariement élastique: vers la discrimination automatique du phytoplankton marin par cytométrie en flux. L'objet-8/2009. LMO'2009: 1-15.

Cassayas JEG (2000). Analysis of the effect of small-turbulence on the phytoplankton dynamics in the open ocean. Modeling and numerical simulation in the vertical dimension. Ph.D. Dissertation, Universitat Politècnica de Catalunya: 171 pp.

Cassou C (2004). Du changement climatique aux régimes de temps : l'oscillation nord atlantique. La Météorologie. 45: 21-32.

Cauwet G (1994). HTCO method for dissolved organic carbon analysis in sea water: influence of catalyst on blank estimation. Marine Chemistry. 47: 55-64.

Chen YQ, Wang N, Zhang P, Zhou H, Qu LH (2002). Molecular evidence identifies bloom-forming *Phaeocystis* (Prymnesiophyta) from coastal waters of south-east China as *Phaeocystis globosa*. Biochemical Systematics and Ecology. 20: 15-22.

Claustre H (1994) Phytoplankton pigment signatures of the trophic status in various oceanic regimes. Limnology and Oceanography. 39: 1206-1211.

Cloern JE (1996). Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: a review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. Reviews of Geophysics. 34: 127-168.

Cloern JE (1999). The relative importance of light and nutrient limitation of phytoplankton growth: a simple index of coastal ecosystem sensitivity to nutrient enrichment. Aquatic Ecology. 33: 3-16.

Cloern JE (2001). Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. Marine Ecology Progress Series. 210: 223-253.

Colijn F (1998). The temporal variability of plankton and their physico-chemical environment. ICES Journal of Marine Sciences. 55: 557-561.

Colijn F, Cadée GC (2003). Is phytoplankton growth in the Wadden Sea light or nitrogen limited? Journal of Sea Research. 49: 83-93.

Cotonnec G (2001). Les lipides, marqueurs des relations trophiques planctoniques dans les écosystèmes pélagiques côtiers. Thèse de doctorat, Université du Littoral Côte d'Opale: 324 pp.

Cusack C, Raine R, Patchin JW (2004). Occurrence of species from the genus *Pseudo-nitzschia* Peragallo in Irish waters. In: Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy, vol. 104B: pp. 55-74.

D

D'Andrea F (2003). Entre le temps et le climat, la variabilité intra saisonnière de l'atmosphère. La Météorologie, 8ième série. 41: 30-37.

Del Amo Y, Quéguiner P, Tréguer P, Breton H, Lampert L (1997). Impact of high-nitrate freshwater inputs on macrotidal ecosystems. II. Specific role of the silicic pump in the year-round dominance of diatoms in the bay of Brest (France). Marine Ecology Progress Series. 161: 225-237.

Del Amo Y, Brzezinski MA (1999). The chemical form of dissolved Si taken up by marine diatoms. Journal of Phycology. 35: 1162-1170.

Devreker D, Souissi S, Seuront L (2005). Effects of chlorophyll concentration and temperature variation on the reproduction and survival of *Temora longicornis* (Copepoda, Calanoida) in the eastern English Channel. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 318: 145-162.

Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Communities EN, 22.12.2000L327/1.

Drebess GV (1974). Marines phytoplankton. Eine Auswahl der Helgoländer Planktonalgen (Diatomeen, Peridineen). George Thieme Verlag, Stuttgart: 186 pp.

Drinkwater KF, Belgrano A, Borja A, Conversi A, Edwards M, Greene CH, Ottersen G, Pershing AJ, Walker H (2003). The response of marine ecosystems to climate variability associated with the North Atlantic Oscillation. In: Hurrell JW, Kushnir Y, Ottersen G, Visbeck M (Eds.), *The North Atlantic Oscillation*. American Geophysical Union, Washington: pp. 211–234.

Dubelaar GBJ, Gerritzen PL, Beeker AER, Jonker RR, Tangen K (1999). Design and first results of the CYTOBUOY: an autonomous flow cytometer with wireless data transfer for in situ analysis of marine and fresh waters. *Cytometry*. 37: 247-254.

Dubelaar GBJ, Gerritzen PL (2000). CytoBuoy: a step forwards using flow cytometry in operational oceanography. *Scientia Marina*. 64: 255-265.

Dubelaar GBJ, Geerders PJF, Jonker RR (2004). High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics. *Journal of Environmental Monitoring*. 6: 946-952.

Durand MD, Olson RJ (1996). Contributions of phytoplankton light scattering and cell concentration changes to diel variations in beam attenuation in the Equatorial Pacific from flow cytometric measurements of pico-, ultra- and nanoplankton. *Deep Sea Research II*. 43: 891–906.

E

Edwards M, Reid PC, Planque B (2001). Long-term and regional variability of phytoplankton biomass in the northeast Atlantic (1960–1995). *ICES Journal of Marine Science*. 58:39–49.

Edwards M, Beaugrand G, Reid PC, Rowden AA, Jones MB (2002). Ocean climate anomalies and the ecology of the North Sea. *Marine Ecology Progress Series*. 239: 1-10.

Edwards M, Richardson AJ (2004). The impact of climate change on the phenology of the plankton community and trophic mismatch. *Nature*. 430: 881-884.

Egge JK, Asknes DL (1992). Silicate as regulating nutrient in phytoplankton competition. *Marine Ecology Progress Series*. 83: 281–289.

Escaravage V, Peperzak L, Prins TC, Peeters JCH, Joordens JCA (1995). The development of a *Phaeocystis* sp. bloom in a mesocosm experiment in relation to nutrients, irradiance and coexisting algae. *Ophelia*. 42: 55-74.

Estrada M (2000). Persistence and variability of phytoplankton assemblages. Implications for monitoring. In: Fisher J, Baretta J, Colijn F, Flemming N (Eds.), *Bio-ecological Observations in Operational Oceanography*. EuroGOOS Publication, Southampton: pp. 14-15.

Estrada M, Marrasé C, Alcaraz M (1988). Phytoplankton response to intermittent stirring and nutrient addition in marine microcosms. *Marine Ecology Progress Series*. 48: 225-234.

F

Falkowski PG, Barber RT, Smetacek V (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*. 281: 200-206.

Fehling J, Davidson K, Bates SS (2004). Growth dynamics of non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima* and toxic *P. seriata* (Bacillariophyceae) under simulated spring and summer photoperiods. *Harmful Algae*. 4: 763-769.

- Fehling J, Davidson K, Bolch CJ, Tett P (2006).** Seasonality of *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) in western Scottish waters. *Marine Ecology Progress Series*. 323: 91-105.
- Finkel ZV (2001).** Light absorption and size scaling of light-limited metabolism in marine diatoms. *Limnology and Oceanography*. 46: 86-94.
- Finkel ZV, Irwin AJ, Schofield O (2004).** Ressource limitation alter the $\frac{3}{4}$ size scaling of metabolic rates of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*. 273: 269-279.
- Frontier S (1976).** Utilisation des diagrammes rangs-fréquences dans l'analyse des écosystèmes. *Journal de Recherche Océnographique*. 1: 35-48.
- Frontier S (1985).** Diversity and structure in aquatic ecosystems. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*. 23: 253-312.
- Frontier S, Le Fèvre J, Pichod-Viale D (1992).** Hiérarchies, dépendances d'échelles et transferts d'échelles en océanographie. In : Auger P, Baudry J, Fournier F, Cahors F (Eds.), *Hiérarchies et échelles en écologie*. Naturalia publications, Paris: pp. 187-223.
- Frontier S, Pichod-Viale D (1998).** Ecosystèmes : Structures, Fonctionnement, Evolution. 2e ed. Dunod, Paris: 447 pp.
- Furnas MJ (1991).** Net in situ growth rates of phytoplankton in an oligotrophic, tropical shelf ecosystem. *Limnology and Oceanography*. 36: 13-29.

G

- Gentilhomme V, Lizon F (1998).** Seasonal cycle of nitrogen and phytoplankton biomass in a well-mixed coastal system (Eastern English Channel). *Hydrobiologia*. 361: 191-199.
- GEOHAB (2001).** Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, Science Plan. In: Glibert P, Pitcher G (Eds.). SCOR and IOC, Baltimore and Paris: 87 pp.
- Gieskes WWC, Kraay GW (1975).** The phytoplankton spring bloom in Dutch coastal waters of the North Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*. 9:166-196.
- Gieskes WWC, Leterme SC, Peletier H, Edwards M, Reid C (2007).** *Phaeocystis* colony distribution in the North Atlantic Ocean since 1948, and interpretation of long-term changes in the *Phaeocystis* hotspot in the North Sea. *Biogeochemistry*. 83: 49-60.
- Goffart A, Catalano G, Hecq J-H (2000).** Factors controlling the distribution of diatoms and *Phaeocystis* in the Ross Sea. *Journal of Marine Systems*. 27: 161-175.
- Gomez F, Souissi S (2007).** Unusual diatoms linked to climatic events in the northeastern English Channel. *Journal of Sea Research*. 58: 283-290.
- Gomez F, Souissi S (2008).** The impact of the 2003 summer heat wave and the 2005 late cold wave on the phytoplankton in the north-eastern English Channel. *Ecology*. 331: 678-685.
- Granéli E, Weberg M, Salomon PS (2008).** Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species : The role of eutrophication. *Harmful Algae*. 8: 94-102.
- Grattepanche J-D (2007).** Distribution et rôle trophique du nano- et microzooplancton lors des efflorescences phytoplanctoniques. Rapport de stage de 2^{ème} année de Master Recherche, Université du Littoral-Côte d'Opale: 40 pp.
- Grégori G, Colosimo A, Denis M (2001).** Phytoplankton group dynamics in the Bay of Marseilles during a 2-year survey based on analytical flow cytometry. *Cytometry*. 44: 247-256.

Bibliographie

Grossel H (1985). Le milieu marin, un milieu vivant et fluctuant: perception par les populations littorales du nord de la France d'un phénomène planctonique caractérisé. Anthropologie Maritime Paris. 2 : 93-97.

Guillard RRL, Hellebust JA (1971). Growth and the production of extracellular substances by two strains of *Phaeocystis pouchetii*. Journal of Phycology. 7: 330-338.

Guillard RRL (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley, MH (Eds.), Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York: pp. 26-60.

Guiselin N, Courcot L, Artigas LF, Le Jéroux A, Brylinski J-M (2009). An optimised protocol to prepare *Phaeocystis globosa* morphotypes for scanning electron microscopy observation. Journal of Microbiological Methods. 77: 119-123.

H

Hamm CE (2000). Architecture, ecology and biogeochemistry of *Phaeocystis* colonies. Journal of Sea Research. 43: 307-315.

Hasle GR, Lange CB, Syvertsen EE (1996). A review of Pseudo-nitzschia, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. Helgoland Marine Research. 50: 131-175.

Hasle GR, Syvertsen EE (1997). Marine diatoms. In: Tomas CR (Ed.), Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press, San Diego: pp. 335-337.

Hedin-Bougart M (1980). Hydrologie littorale: phytoplancton (région de Dunkerque – Mer du Nord). Thèse de doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille I: 204 pp.

Hickel W (1998). Temporal variability of micro- and nanoplankton in the German Bight in relation to hydrographic structure and nutrient changes. ICES Journal of Marine Science. 55: 600-609.

Hoch T, Garreau P (1998). Phytoplankton dynamics in the English Channel: a simplified three dimensional approach. Journal of Marine Systems. 16: 133-150.

Howard MDA, Cochlan WP, Ladizinsky N, Kudela RM (2007). Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. Harmful Algae. 6: 206-217.

I

Ibanez F, Fromentin JM, Castel J (1993). Application de la méthode des sommes cumulées à l'analyse des séries chronologiques en océanographie. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris. 316: 745-748.

Iriarte A, Purdie DA (2004). Factors controlling the timing of major spring bloom events in an UK south coast estuary. Estuarine, Coastal and Shelf Science. 61: 679-690.

Irigoiien X, Harris RP, Head RN, Harbour D (2000). North Atlantic Oscillation: regional temperatures and precipitations. Science. 269: 676-679.

J

Jacobsen A, Bratbak G, Heldal M (1996). Isolation and characterization of a virus infecting *Phaeocystis pouchetii* (Prymnesiophyceae). Journal of Phycology. 32: 923-927.

Jacobsen A (2000). New aspects of bloom dynamics of *Phaeocystis pouchetii* (Haptophyta) in Norwegian waters. Ph.D. Dissertation, University of Bergen: 138 pp.

Jakobsen HH, Tang KW (2002). Effects of protozoan grazing on colony formation in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) and the potential costs and benefits. Aquatic Microbial Ecology. 27: 261-273.

Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (1997). Phytoplankton pigments in oceanography. Unesco, Paris: 661 pp.

Jordan MB, Joint I (1998). Seasonal variation in nitrate:phosphate ratios in the English Channel 1923-1987. Estuarine, Coastal and Shelf Science. 46: 157-164.

K

Kaczmarska I, Martin JL, Ehrman JM, LeGresley MM (2007). *Pseudo-nitzschia* species population dynamics in the Quoddy Region, Bay of Fundy. Harmful Algae. 6: 861-874.

Kaiser MJ, Attrill MJ, Jennings S, Thomas DN, Barnes DKA, Brierley AS, Polunin NVC, Raffaelli D, William PJ (2005). Marine ecology, processes, systems and impacts. Oxford University Press, Cambridge: 557 pp.

Karayanni H, Christaki U, Van wambeke F, Dalby A (2004). Evaluation of double formalin-Lugol's fixation in assessing number and biomasses of ciliates: an example of estimations at mesoscale in NE Atlantic. Journal of Microbiological Methods. 56: 349-358.

Kiorboe T (1995). Small-scale turbulence, marine snow formation, and planktivorous feeding. Scientia Marina. 61: 141-158.

Kornmann P (1955). Beobachtungen an *Phaeocystis*-Kulturen. Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen. 5: 218-233.

Koroleff F (1969). Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. International Council for the exploration of the sea. C.M. 1969/C:9 Hydr. Comm.

Kristiansen S (1998). Impact of increased river discharge on the phytoplankton community in the outer Oslofjord, Norway. Hydrobiologia. 363: 169-177.

Kudela RM, Cochlan WP (2000). Nitrogen and carbon uptake kinetics and the influence of irradiance for a red tide bloom off Southern California. Aquatic Microbial Ecology. 21: 31-47.

L

Labry C, Herband A, Delmas D, Laborde P, Lazure P, Froidefond JM, Jegou AM, Sautour B, (2001). Initiation of winter phytoplankton blooms within the Gironde Plume waters in the Bay of Biscay, Marine Ecology Progress Series. 212: 117-130.

Labry C, Herband A, Delmas D (2002). The role of phosphorus on planktonic production of the Gironde plume waters in the Bay of Biscay. Journal of Plankton Research. 24: 97-117.

Lacroix G, Ruddick K, Gypens N, Lancelot C (2007). Modelling the relative impact of rivers (Scheldt/Rhine/Seine) and Western Channel waters on the nutrient and diatoms/*Phaeocystis* distributions in Belgian waters (Southern North Sea). Continental Shelf Research. 27: 1422-1446.

Lagadeuc Y, Brylinski J-M, Aelbrecht D (1997). Temporal variability of the vertical stratification of a front in a tidal Region Of Freshwater Influence (ROFI) system. Oceanologica Acta. 23: 687-699.

Lamy D (2006). Dynamique bactérienne en Manche orientale. Relation avec les poussées de *Phaeocystis globosa*. Thèse de doctorat, Université du Littoral-Côte d'Opale : 320 pp.

Lamy D, Artigas LF, Jauzein C, Lizon F, Cornille V (2006). Coastal bacterial viability and production in the eastern English Channel: a case study during a *Phaeocystis globosa* bloom. Journal of Sea Research. 56: 227-238.

- Lamy D, Obernosterer I, Laghdass M, Artigas LF, Breton E, Grattepanche J-D, Lecuyer E, Degros N, Lebaron P, Christaki U (2009).** Temporal changes of major bacterial groups and bacterial heterotrophic activity during a *Phaeocystis globosa* bloom in the eastern English Channel. Aquatic Microbial Ecology. 58: 95-107.
- Lancelot C, Billen G (1984).** Activity of heterotrophic bacteria and its coupling to primary production during the spring phytoplankton bloom in the Southern Bight of the North Sea. Limnology and Oceanography. 29: 721-30.
- Lancelot C, Mathot S (1987).** Dynamics of a *Phaeocystis*-dominated spring bloom in Belgian coastal waters. I. Phytoplankton activities and related parameters. Marine Ecology Progress Series. 37: 239-248.
- Lancelot C, Billen G, Barth H (1991).** The dynamics of *Phaeocystis* blooms in nutrient enriched coastal zones. Water Pollution Research Report 23.
- Lancelot C, Rousseau V (1994).** Ecology of *Phaeocystis*-dominated ecosystems: the key role of colony forms. In: Leadbeater BSC, Green JC (Eds.), The Haptophyte algae systematics association, vol 51. Clarendon Press, Oxford: pp. 229-245.
- Lancelot C, Keller MD, Rousseau V, Smith WO, Mathot S (1998).** Autecology of the marine haptophyte *Phaeocystis sp.* In: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (Eds.), Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms, NATO ASI series, vol G41. Springer-Verlag, Berlin: pp. 209-224.
- Larsen A, Fonnes Flaten GA, Sandaa RA, Castberg T, Thyraug R, Rune Erga S, Jacquet S, Bratbak G (2004).** Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: microbial community succession and diversity. Limnology and Oceanography. 49: 180-190.
- Laval-Peuto M, Rassoulzadegan F (1988).** Autofluorescence of marine planktonic Oligotrichina and other ciliates. Hydrobiologia 159: 99-110.
- Lefebvre A, Repecaud M (2006).** MAREL Carnot-Partie 1: Bilan de la mise en place d'un système de mesures automatisées à haute fréquence en zone côtière de Boulogne-sur-Mer. Rapport IFREMER RST.LER.BL/06.09. Ifremer, Boulogne-sur-Mer: 18 pp.
- Legendre P, Legendre L (1998).** Numerical Ecology, Developments in environmental modelling. Elsevier, Amsterdam. 20: 853 pp.
- Lewis W (1978).** Dynamics and succession of the phytoplankton in a tropical lake: lake Lanao, Philippines. Journal of Ecology. 66: 849-880.
- Loebl M, Colijn F, Van Beusekom JEE, Baretta-Bekker J, Lancelot C, Philippart CJM, Rousseau V, Wiltshire KH (2009).** Recent patterns in potential phytoplankton limitation along the Northwest European continental coast. Journal of Sea Research. 61: 34-43.
- Loisel H, Mériaux X, Berthon J-F, Poteau A (2007).** Investigation of the optical backscattering to scattering ratio of marine particles in relation to their biogeochemical composition in the eastern English Channel and southern North Sea. Limnology and Oceanography. 52: 739-752.
- Loquet N, Rybarczyk H, Elkaim B (2000).** Echanges de sels nutritifs entre la zone côtière et un système estuaire intertidal: la baie de Somme (Manche, France). Oceanologica Acta. 23: 47-64.
- Lorenzen C (1966).** A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. Deep Sea Res. 13: 223-227.
- Loureiro S, Jauzein C, Garcés E,-Collos Y, Camp J, Vaqué D (2008).** The significance of organic nutrients in the nutrition of *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). Journal of Plankton Research. 23: 399-410.
- Lovejoy C, Legendre L, Klein B, Tremblay J-E, Ingrain RG, Therriault J-C (1996).** Bacterial activity during early winter mixing (Gulf of St Laurence, Canada). Aquatic Microbial Ecology. 10 : 1-13.

Lubac B, Loisel H, Guiselin N, Astoreca R, Artigas LF, Mériaux X (2008). Hyperspectral versus multispectral remote sensing approach to detect phytoplankton blooms in coastal waters: application to a *Phaeocystis globosa* bloom. Journal of Geophysical Research. 113.

Lund JWG, Kipling C, Crenne D (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. Hydrobiologia. 11: 143-170.

M

Malej A, Mozetic P, Malacic V, Terzic S, Ahel M (1995). Phytoplankton responses to freshwater inputs in a small semi-enclosed gulf (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). Marine Ecology Progress Series. 120: 111–121.

Mann KH, Lazier JRN (1996). Dynamics of marine ecosystems: biological-physical interactions in the oceans. 2d ed. Blackwell Science, Oxford: 480 pp.

Mantoura RFC, Llewellyn CA (1983). The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. Analytica Chimica Acta. 151: 297-314.

Mantoura RFC, Martin J-M, Wollast R (1991). Ocean margin processes in global change. Wiley-Interscience, New York: 469 pp.

Margalef R (1978). Life forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. Oceanologica Acta. 1: 493-509.

Menden-Deuer SE, Lessard EJ (2000). Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms and other protist plankton. Limnology and Oceanography. 45: 569-579.

Ménesguen A, Aminot A, Belin C (2001). L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France. Rapport IFREMER DEL/EC/01.02 pour la Commission Européenne – DG.ENV.B1. Ifremer, Brest: 59 pp.

Miller CB (2004). Biological Oceanography. Blackwell Publishing, Oxford: 402 pp.

Mullin JB, Riley JP (1955). The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters. Analytica Chimica Acta. 12: 162-176.

Murphy J, Riley JP (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica Chimica Acta. 12 : 31-36.

Muylaert K, Gonzales R, Frack M, Lionard M, Van der Zee C, Cattrijssse A, Sabbe K, Chou L, Vyverman W (2006). Spatial variation in phytoplankton biomass dynamics in the Belgian coastal zone of the North Sea studied by microscopy, HPLC-CHEMTAX and underway fluorescence recordings. Journal of Sea Research. 55: 253-265.

N

Nejstgaard JC, Tang KW, Steinke M, Dutz J, Koski M, Antajan E, Long J (2007). Zooplankton grazing on *Phaeocystis*: a quantitative review and future challenges. Biogeochemistry. 83: 137-145.

Neveux J, Lantoine F, Marie D, Vaulot D, Blanchot J (1999). Phycoerythrins in the southern tropical and equatorial Pacific Ocean: evidence for new cyanobacterial types. Journal of Geophysical Research. 104: 3311-3321.

O

- Olson RJ, Sosik HM (2007).** A submersible imaging-in-flow instrument to analyze nano- and microplankton. *Imaging FlowCytobot. Limnology and Oceanography: Methods.* 5: 195-203.
- Olson RJ, Shalapyonok A, Sosik HM (2003).** An automated submersible flow cytometer for analyzing pico- and nanophytoplankton: *FlowCytobot. Deep Sea Research I.* 50: 301–315.

P

- Paerl HW (1995).** Coastal eutrophication in relation to atmospheric nitrogen deposition: Current perspectives. *Ophelia.* 41: 237-259.
- Pannard A, Clauquin P, Klein C, Le Roy B, Véron B (2008a).** Short-term variability of the phytoplankton community in coastal ecosystem in response to physical and chemical conditions' changes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 80: 212-224.
- Pannard A, Bormans M, Lagadeuc Y (2008b).** Phytoplankton species turnover controlled by physical forcing at different time scales. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 65: 47-60.
- Parsons ML, Dortch Q, Turner RE (2002).** Sedimentological evidence of an increase in *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) abundance in response to coastal eutrophication. *Limnology and Oceanography.* 47: 551-558.
- Partensky F, Blanchot J, Vaulot D (1999).** Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. In: Charpy L, Larkum AWD (Eds.), *Marine Cyanobacteria.* Musée océanographique, Monaco: pp. 457-475.
- Paulmier G (1997).** Atlas des Diatomophycées des côtes françaises et des aires océaniques adjacentes. IFREMER-DRV-RST, 94-14. Ifremer, L'Houmeau: 187 pp.
- Peperzak L (1993).** Daily irradiance governs growth rate and colony formation of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *Journal of Plankton Research.* 15: 809-821.
- Peperzak L, Colijn F, Gieskes WWC, Peeters JCH (1998).** Development of the diatom-*Phaeocystis* spring bloom in the Dutch coastal zone (North Sea): the silicon depletion versus the daily irradiance hypothesis. *Journal of Plankton Research.* 20: 517-537.
- Peperzak L, Colijn F, Vrieling EG, Gieskes WWC, Peeters JCH (2000).** Observations of flagellates in colonies of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae): a hypothesis for their position in the life cycle. *Journal of Plankton Research.* 22: 2181-2203.
- Philippart CJM, Cadée GC, van Raaphorst W, Riegman R (2000).** Long-term phytoplankton-nutrient interactions in a shallow coastal sea: algal community structure, nutrient budgets and denitrification potential. *Limnology and Oceanography.* 45: 131-144.
- Phlips EJ, Badylak S, Bledsoe E, Cichra M (2006).** Factors affecting the distribution of *Pyrodinum bahamense* var. *Bahamense* in coastal waters of Florida. *Marine Ecology Progress Series.* 322: 99-115.
- Pingree RD, Holligan PM, Head RN (1977).** Survival of dinoflagellate blooms in the western English Channel. *Nature* 265: 266-269.
- Pingree RD, Griffiths KD (1980).** Currents driven by a steady uniform windstress on the shelf seas around the British Isles. *Oceanologica Acta.* 3: 227–235.
- Pinkas L, Oliphant MS, Iverson ILK (1971).** Food habitats of albacore, blue-fin tuna, and bonito in California waters. *Fishery Bulletin.* 152: 1-105.
- Prygiel J, Caby B, Carpentier P, Leprêtre A (2000).** Evaluation des flux en nutriments, matières en suspension et matières organiques, au littoral de la Manche du bassin Artois-Picardie pour la période 1980-2000. *Actes de colloque, Qualité des eaux du littoral régional : objectifs atteints?* Wimille.

R

- Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA (1963).** The influence of organisms on composition of seawater. *The Sea.* 2: 26-77.
- Rees AP, Joint I, Donald KM (1999).** Early spring bloom phytoplankton-nutrient dynamics at the Celtic Sea Shelf Edge. *Deep Sea Research Part I.* 46: 483-510.
- Reid PC, Lancelot C, Gieskes WWC, Hagmeier E, Weichert G (1990).** Phytoplankton of the North Sea and its dynamics: a review. *Netherlands Journal of Sea Research.* 26: 295-331
- Reid PC (2005).** Atlantic wide regime shift? *Globec Internation Newsletter,* October 2005. 9-10.
- Reul A, Rodriguez V, Jimenez-Gomez F, Blanco JM, Bautista B, Sarhan T, Guerrero F, Ruiz J, Garcia-Lafuente J (2005).** Variability in the spatio-temporal distribution and size-structure of phytoplankton across an upwelling area in the NW-Alboran Sea (W-Mediterranean). *Continental Shelf Research.* 25: 589–608.
- Reynolds CS (1988).** Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater phytoplankton. In: Sandgren CD (Ed.), *Growth and survival strategies of freshwater phytoplankton.* Cambridge University Press, Cambridge: pp. 388-433.
- Reynolds CS (1996).** Plant life of the pelagic. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie.* 26: 97-113.
- Reynolds CS, (1997).** Vegetative Processes in the Pelagic: A Model for Ecosystem Theory. Ecology Institute, Oldendorf/Luhe, Germany.
- Reynolds CS (2001).** Emergence in pelagic communities. *Scientia Marina.* 65: 5–30.
- Reynolds CS, Smayda TJ (1998).** Principles of species selection and community assembly in the phytoplankton: beyond the Mandala. In: Requera B, Blanco J, Fernández ML, Wyatt T (Eds.), *Harmful Algae.* Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 1998: pp. 8–10.
- Reynolds CS, Huszar V, Kruk C, Naselli-Flores L, Melo S, (2002).** Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research.* 24: 417–428.
- Ricquier L (2008).** Développement méthodologique du CytoSense: caractérisation et dynamique des micro-organismes en Manche orientale. Rapport de stage de 2ème année de Master Recherche, Université du Littoral-Côte d'Opale: 36 pp.
- Riegman R, Van Boeckel W (1996).** The ecophysiology of *Phaeocystis globosa*: a review. *Journal of Sea Research.* 35: 235-242.
- Riley GA (1957).** Phytoplankton of the north-central Sargasso Sea. *Limnology and Oceanography.* 2: 252-270.
- Rousseau V, Mathot S, Lancelot C (1990).** Calculating carbon biomass of *Phaeocystis sp.* from microscopic observations. *Marine Biology.* 107: 305-314.
- Rousseau V, Vaulot D, Casotti R, Carcou V, Lenz J, Gunkel J, Baumann M (1994).** *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae) life cycle: evidence and hypotheses. In: Lancelot C, Wassmann P (Eds.), *Ecology of Phaeocystis-dominated ecosystems.* *Journal of Marine Systems.* 55: 23-40.
- Rousseau V, Leynaert A, Daoud N, Lancelot C (2002).** Diatom succession, silicification and availability in Belgian coastal waters (southern North Sea). *Marine Ecology Progress Series.* 236: 61-73.
- Rousseau V, Chrétiennot-Dinet M-J, Jacobsen A, Verity PG, Whipple S (2007).** The life cycle of *Phaeocystis*: state of knowledge and presumptive role in ecology. *Biogeochemistry.* 83: 29-47.

Rutten TPA, Sandee B, Hofman ART (2005). Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: a successful approach? *Cytometry*. 64: 16-26.

S

Sakoe H, Chiba S (1978). Dynamic Programming Algorithm Optimization for Spoken Word Recognition. *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, vol. ASSP-26. 1: 43–49.

Salomon J-C, Breton M (1991). Courants de marée et courants résiduels dans la Manche. *Oceanologica Acta*. 11: 47-53.

Salomon J-C, Breton M (1993). An atlas of long-term currents in the Channel. *Oceanologica Acta*. 16: 439-448.

Sazhin AF, Artigas LF, Nejstgaard JC, Frischer ME (2007). The colonization of two *Phaeocystis* species (Prymnesiophyceae) by pennate diatoms and others protists: a significant contribution to colony biomass. *Biogeochemistry*. 83: 137-145.

Schapira M (2005). Dynamique spatio-temporelle de *Phaeocystis globosa* en Manche orientale : effets de la turbulence et des apports sporadiques en sels nutritifs. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques de Lille: 228 pp.

Schapira M, Seuront L, Gentilhomme V (2006). Effects of small-scale turbulence on *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) growth and life cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 335: 27-28.

Schapira M, Vincent D, Seuront L, Gentilhomme V (2008). Temporal patterns of phytoplankton assemblages, size spectra and diversity during the wane of a *Phaeocystis globosa* spring bloom in hydrologically contrasted coastal waters. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom*. 88: 649-662.

Schoemann V, Becquevort S, Stefels J, Rousseau V, Lancelot C (2005). *Phaeocystis* blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: a review. *Journal of Sea Research*. 53: 43-66.

SCOR-Unesco (1966). Determination of photosynthetic pigments in seawater. Monographs on oceanographic methodology 1. Unesco, Paris: pp. 11-18.

Seuront L, Vincent D, Mitchell JG (2006). Biologically-induced modification of seawater viscosity in the eastern English Channel during a *Phaeocystis globosa* bloom. *Journal of Marine Systems*. 6 : 118-133.

Seuront L, Vincent D (2008). Increased seawater viscosity, *Phaeocystis globosa* spring bloom and *Temora longicornis* feeding and swimming behaviours. *Marine Ecology Progress Series*. 363: 131-145.

Seuront L, Souissi S (2002). Climatic control of *Phaeocystis* spring bloom in the eastern English Channel (1991-2000). *La Mer*. 40: 41-51.

Shannon CE, Weaver W (1949). The mathematical theory of communication. University of Illinois press, Urbana: 144 pp.

Shapiro HM (2003). Practical flow cytometry. 4th ed. Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey: 736 pp.

Sieracki CK, Sieracki ME, Yentsch CS (1998). An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Marine Ecology Progress Series*. 168: 285–296.

Smayda TJ (1990). Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. In: Toxic marine phytoplankton: Proceedings of the 4th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier: pp. 29-40.

Smayda TJ (1997). Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography*. 42: 1137-1153.

- Smayda TJ (1998).** Patterns of variability characterizing marine phytoplankton, with examples from Narragansett Bay. ICES J. Mar. Sci. 55: 562-573.
- Smayda TJ (2004).** Eutrophication and phytoplankton. In: Wassmann P, Olli K (Eds.), Drainage basin inputs and eutrophication: an integrated approach. University of Tromsø, Norway: pp. 89–98
- Smayda TJ, Reynolds CS, (2001).** Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. J. Plankton Res. 23: 447– 461.
- Smith VH, Tilman GD, Nekola JC (1999).** Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. Environmental Pollution. 100: 179-196.
- Smith WO Jr, Dennett MR, Mathot S, Caron DA (2003).** The temporal dynamics of the flagellated and colonial stages of *Phaeocystis antarctica* in the Ross Sea. Deep Sea Research II. 50: 605-618.
- Sosik HM, Olson RJ, Neubert MG, Shalapyonok A, Solow AR (2003).** Growth rates of coastal phytoplankton from time-series measurements with a submersible flow cytometer. Limnology and Oceanography. 48: 1756–1765.
- Stelfox-Widdicombe CE, Archer SD, Burkill PH, Stefels J (2004).** Microzooplankton grazing in Phaeocystis and diatom-dominated waters in the southern North Sea in spring. Journal of Sea Research. 51: 37– 51.
- Strickland JDH, Parsons TR (1972).** A practical handbook of seawater analysis. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada. 167: 311 pp.
- Sugimura Y, Suzuki Y (1988).** A high temperature catalytic oxidation method for the determination of non-volatile dissolved organic carbon in sea water by direct injection of a liquid sample. Marine Chemistry. 24: 105-131.
- Sun J, Liu D (2003).** Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. Journal of Plankton Research. 25: 1331-1346.

T

- Takabayashi M, Lew K, Johnson A, Marchi A, Dugdale R, Wilkerson FP (2006).** The effect of nutrient availability and temperature on chain lenght of the diatom, *Skeletonema costatum*. Journal of Plankton Research. 9: 831-840.
- Tang KW (2003).** Grazing and colony size development in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae): the role of a chemical signal. Journal of Plankton Research. 25: 831-842.
- Taylor J, Taylor NJ, Walsby JR (1985).** A bloom of the planktonic diatom, *Cerataulina pelagica*, off the coast of northeastern New Zealand in 1983, and its contribution to an associated mortality of fish and benthic fauna. 70: 773-795.
- Ter Braak CJF (1986).** Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. Ecology. 67: 1167-1179.
- Ter Braak CJF, Smilauer P (1998).** CANOCO Reference Manual and User's Guide to Canoco forWindows: Software for Canonical Community Ordination (version 4). Microcomputer Power, New York: 352 pp.
- Thingstad F, Skjoldal E, Bohne RA (1993).** Phosphorus cycling and algal-bacterial competition in Sandsfjord, western Norway. Marine Ecology Progress Series. 99: 239-259.
- Throndsen J (1978).** Preservation and Storage. In: Sournia, A.(Ed.), Phytoplankton Manual. Monographs on oceanographic methodology 6. Unesco, Paris: pp. 69-74.

Thyssen M (2008). Analyse à haute fréquence spatiale et temporelle du phytoplancton à l'aide de la cytométrie en flux automatisée et immergée. Thèse de doctorat, Université de la Méditerranée: 203 pp.

Thyssen M, Mathieu D, Garcia N, Denis M (2008). Short-term variations of the phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged flow cytometer. Journal of Plankton Research. 30: 1027-1040.

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. Biogeosciences. 6: 569-583.

Tréguer P., Le Corre P. (1974). Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (utilisation de l'autoanaliseur II Technicon®). Rapport de l'Université de Bretagne Occidentale: 59 pp.

Tukey JW (1977). Exploratory Data Analysis. Reading, Mass: Addison-Wesley Publishing Co.

Tungaraza C, Rousseau V, Brion N, Lancelot C, Gichuki J, Baeyens W, Goeyens L (2003). Contrasting nitrogen uptake by diatom and *Phaeocystis*-dominated phytoplankton assemblages in the North Sea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 292: 19-41.

Tyrrell T (1999). The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. Nature. 400: 525-531.

U

Utermöhl H (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie. 9: 1-39.

V

Valero M, Richerd S, Perrot V, Destombe C (1992). Evolution of alternation of haploid and diploid phases in life cycles. Trends in Ecology and Evolution 7: 25-29.

Van Beusekom J, Diel-Christiansen S (2009). Global change and the biogeochemistry of the North Sea: the possible role of phytoplankton and phytoplankton grazing. International Journal of Earth Science. 98: 269-280.

Van Boeckel WHM (1991). Ability of *Phaeocystis* sp. to grow on organic phosphates; direct measurement and prediction with the use of an inhibition constant. Journal of Plankton Research. 13 : 959-970.

Van Boeckel WHM, Veldhuis MJC (1990). Regulation of alkaline phosphatase synthesis in *Phaeocystis* sp. Marine Ecology Progress Series. 61: 281-289.

Van der Zee C, Chou L (2004). Seasonal cycling of phosphorus in the southern bight of the North Sea. Biogeosciences Discuss. 1: 681-707.

Van Rijssel M, Hamm CE, Gieskes WWC (1997). *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) colonies: hollow structures built with small amount of polysaccharides. European Journal of Phycology. 32: 185-192.

Vantrepotte V (2003). Caractérisation Bio-Optique des eaux côtières en Manche orientale pour l'estimation de la production primaire et le suivi des poussées phytoplanctoniques : application à la télédétection satellitaire « couleur de l'eau » en milieu côtier. Thèse de doctorat, Université du Littoral-Côte d'Opale: 272 pp.

Vaulot D, Birrien J-L, Marie D, Casotti R, Veldhuis MJW, Kraay GW, Chrétiennot-Dinet M-J (1994). Morphology, ploidy, pigment composition, and genome size of cultured strains of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). Journal of Phycology. 30: 1022-1035.

- Vegter F, De-Visscher PR (1987).** Nutrients and phytoplankton primary production in the marine tidal Oosterschelde estuary (The Netherlands). *Hydrobiological Bulletin*. 21: 149–158.
- Veldhuis MJW, Admiraal W (1987).** Influence of phosphate depletion on growth and colony formation of *Phaeocystis pouchetii*. *Marine Biology*. 95: 47-54.
- Veldhuis MJW, Colijn F, Admiraal W (1991).** Phosphate Utilization in *Phaeocystis pouchetii* (Haptophyceae). *Marine Ecology*. 12: 53-62.
- Veldhuis MJW, Brussaard CPD, Noordeloos AAM (2005).** Living in a *Phaeocystis* colony: a way to be a succesful algal species. *Harmful Algae*. 4: 841-858.
- Veldhuis MJW, Wassmann P (2005).** Bloom dynamics and biological control of a high biomass HAB species in European coastal waters: a *Phaeocystis* case study. *Harmful Algae*. 4: 805-809.
- Verity PG, Villareal TA, Smayda TJ (1988).** Ecological investigations of blooms of colonial *Phaeocystis pouchetii*. 1. Abundance, biochemical composition, and metabolic rates. *Journal of Plankton Research*. 10: 219-248.
- Verity PG, Smayda TJ, Sakshaug E (1991).** Photosynthesis, excretion, and growth rates of *Phaeocystis* colonies and solitary cells. *Polar Research*. 10: 117-128.
- Verity PG, Medlin LK (2003).** Observations on colony formation by the cosmopolitan phytoplankton genus *Phaeocystis*. *Journal of Marine Systems*. 43: 153-164.
- Verity PG, Whipple SJ, Nejstgaard JC, Alderkamp AC (2007a).** Colony size, cell number, carbon and nitrogen contents of *Phaeocystis pouchetii* from western Norway. *Journal of Plankton Research*. 29: 359-367.
- Verity PG, Brussaard CP, Nejstgaard JC, van Leeuwe MA, Lancelot C, Medlin LK (2007b).** Current understanding of *Phaeocystis* ecology and biogeochemistry, and perspectives for future research. *Biogeochemistry*. 83: 311-330.
- Vollenweider RA (1992).** Coastal marine eutrophication: principles and control. In: Vollenweider RA, Marchetti R, Viviani R (Eds.), *Marine coastal eutrophication*. Elsevier, London: pp. 1–20.

W

- Wacquet G (2008).** Classification de signaux issus de mesures cytométriques. Rapport de stage de 2ème année de Master INS3I, Université du Littoral-Côte d'Opale: 47 pp.
- Wafar MVM, Le Corre P, Birrien JL (1983).** Nutrients and primary production in permanently well-mixed temperate coastal waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 17: 431-446.
- Wassmann P, Ratkova T, Reigstad M (2005).** The contribution of single and colonial cells of *Phaeocystis pouchetii* to spring and summer blooms in the north-eastern North Atlantic. *Harmful Algae*. 4: 823-840.
- Weijerman M, Lindeboom H, Zuur AF (2005).** Regime shifts in marine ecosystems of the North Sea and Wadden Sea. *Marine Ecology Progress Series*. 298: 21-39.
- Weisse T, Tande K, Verity P, Hansen F, Gieskes W (1994).** Their trophic significance of *Phaeocystis* blooms. *Journal of Marine Systems*. 5: 67-79.
- Whipple SJ, Patten BC, Verity PG, Frischer ME, Long JD, Nejstgaard JC, Anderson JT, Jacobsen A, Larsen A, Martinez-Martinez J, Borrett SR (2007).** Gaining integrated understanding of *Phaeocystis spp.* (Prymnesiophyceae) through model-driven laboratory and mesocosm studies. *Biogeochemistry*. 83: 293-309.
- Woods ED, Armstrong FAJ, Richards FA (1967).** Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom*. 47: 23-31.

Y

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

ANNEXE 1



Note

An optimised protocol to prepare *Phaeocystis globosa* morphotypes for scanning electron microscopy observation

Natacha Guiselin*, Lucie Courcot, Luis Felipe Artigas, Aude Le Jéroux, Jean-Michel Brylinski

LOG - UMR CNRS 8187 - Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) - Maison de la Recherche en Environnement Naturel (MREN), 32 Avenue Foch, 62930 Wimereux, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2008

Accepted 3 January 2009

Available online 6 January 2009

Keywords:

Phaeocystis globosa morphotypes

SEM preparation method

Air-drying

Phytoplankton fixatives and preservatives

Intra colonial cells

ABSTRACT

A preparation protocol for scanning electron microscopy (SEM) was adapted and tested to the observation of *Phaeocystis globosa* morphotypes. For extra colonial cells, critical point drying (CPD) gave satisfactory results while for intra colonial cells, preservation with Lugol's iodine and/or glutaraldehyde followed by air-drying appeared as the most suitable method.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Phaeocystis is a widespread cosmopolitan genus of marine phytoplankton (Schoemann et al., 2005 for a review) driving global geochemical cycles (Verity et al., 2007 for a review) and ecosystem functioning (Nejstgaard et al., 2007 for a review). It has a polymorphic life cycle, where free-living flagellated cells alternate with gelatinous colonies reaching up to several cm (Riegman and Van Boeckel, 1996; Chen et al., 2002). Three *Phaeocystis* species are known to form large blooms of gel-like colonies namely *P. antartica*, *P. pouchetii* in cold waters and *P. globosa* in temperate coastal waters (Lancelot et al., 1998). Based on field and batch culture observations, four distinct cell types characterizing the life cycle of *Phaeocystis* were recorded (Rousseau et al., 2007 for a review): (i) two types of small haploid flagellates (3–6 µm) observed before colony formation, with one producing star-forming filaments and the other lacking filaments and stars; (ii) a diploid colonial cell (4–8 µm) embedded in the mucilaginous matrix formed by colonies and (iii) a large diploid flagellate (4–9 µm) appearing after colony disruption. However, many aspects of this complex life cycle such as morphotypes number and succession are still under debate. It therefore encourages target studies on *Phaeocystis* morphology (Verity et al., 2007), particularly field investigations since most of the studies carried out so far are based on batch culture observations. Conventional methods for SEM analysis of phytoplankton involve dehydration using either chemical compounds (e.g. osmium tetroxide) or freeze drying (Hasle and Syvertsen, 1997). Among the latter, critical point drying (CPD) gives the most

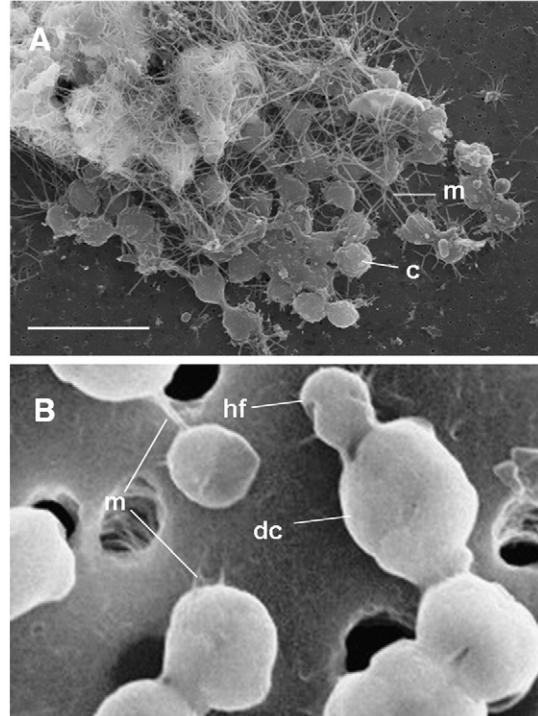


Fig. 1. SEM micrographs of two *Phaeocystis globosa* colonies: A) the first one was prepared with critical point drying. Due to the collapsing effect of the matrix, the colony membrane disappeared and mucous filaments were retracted binding cells together. Cell volume shrunk by 75% and cell shape was drastically distorted; B) the second one was prepared with 10% Lugol/glutaraldehyde and air-drying. Cell shape was well preserved and two types of cells were visible: c = cell; dc = diploid colonial cell; hf = haploid flagellate; m = mucus; scale bar = 5 µm.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 21 99 64 31; fax: +33 3 21 99 64 01.

E-mail address: natacha.guiselin@univ-littoral.fr (N. Guiselin).

reliable results (Cohen et al., 1968) and is also successfully applied to the observation of *Phaeocystis* free-living cells outside colonies in culture (Vaulot et al., 1994; Antajan et al., 2004). While drying procedures allow a good preservation of ultrastructural details, first tests of CPD on *P. globosa* colonies showed an important alteration of the mucilaginous matrix and cell shrinkage (Fig. 1A). An alternative method is therefore needed to study in details cells inside colonies. To answer this question, we improved and adapted the existing SEM methodology to the *Phaeocystis* species, *P. globosa*. Two methods for SEM preparation were applied according to the two *P. globosa* cell types encountered during its life cycle: (i) extra colonial cells corresponding to morphotypes observed outside mucilaginous colonies and (ii) intra colonial cells corresponding to morphotypes located inside the colonial matrix. The first method carried out corresponds to the CPD and was applied to extra-colonial cells. The second method, based on fixation followed by air-drying of intracolonial cells needed improvement. Thirty samples were analysed and originated from a coastal survey carried out in spring 2006 in the eastern English Channel ($50^{\circ}46'N$, $1^{\circ}34'E$). Surface seawater was collected at 1 m depth (from 250 to 1000 mL) and samples were slightly prefixed on board with a solution comprising 50:50 of acid Lugol's iodine (Throndsen, 1978) and glutaraldehyde (Baker, Normapur; 37%) at 2% final concentration (v/v).

For the observation of extra colonial cells ($\geq 3 \mu\text{m}$), 25 to 50 mL of prefixed samples were filtered through 0.8 μm polycarbonate filters (Isopore, Millipore) previously soaked with a 0.01% (w/v) poly-L-lysine solution (Sigma-Aldrich, Normapur), thus allowing a better adhesion of cells to the filter (Antajan et al., 2004). The filters were then rinsed with ultrapure water (Millipore) to eliminate salt crystals. Dehydration was carried out by transferring the specimens through a graded absolute ethanol series (30, 50, 70, 80, 90 and 100%) and cells were then critical-point dried in liquid CO₂ using a BAL-TEC CPD 030 critical-point drying apparatus. For intra-colonial cells, we followed a fixation procedure recommended by Chrétiennot-Dinet (pers. comm.) based on high concentration (10% v/v) of a solution mixing Lugol and glutaraldehyde added in equal proportion (50:50). This fixative treatment was added for 10 min to 25 to 50 mL of prefixed samples. Samples were then filtered through 3- μm polycarbonate filters (Isopore Millipore) to preserve and concentrate colonies and their intra colonial cells. This filtration step also permitted to eliminate a large proportion of small ($<3 \mu\text{m}$) extra colonial cells which could produce visual noise on SEM photographs. Samples were then rinsed with ultrapure water and air-dried under a laminar flow hood. Before SEM observations, all dried filters were mounted onto SEM stubs and coated with gold-palladium in a sputter-cotter (Polaron SC7620). Micrographs were taken with a SEM LEO 438VP (tungsten filament). The microscope was equipped for imaging with a secondary electron

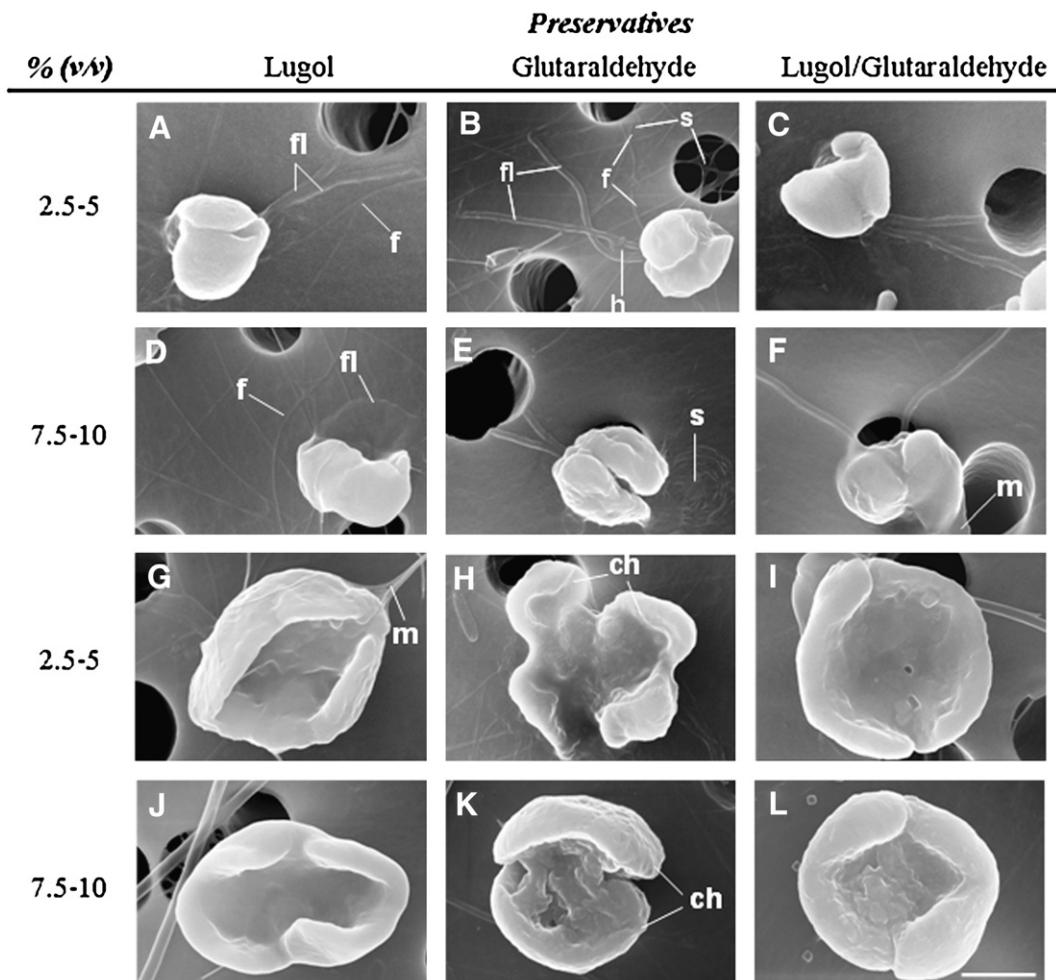


Fig. 2. SEM micrographs of haploid flagellates (A–F) and diploid colonial cells (G–L) belonging to colonies prepared for observation with different preservatives: Lugol, glutaraldehyde and a mixing of Lugol/glutaraldehyde at low concentrations (2.5–5% v/v) corresponding to A–C and G–I micrographs; and at high concentrations (7.5–10% v/v) corresponding to D–F and J–L micrographs. Micrographs presented here were also representative of the dominant cell morphology (>80%); ch = chloroplast; fl = flagella; f = filament; h = haptoneema; m = mucus; s = star; scale bar = 2 μm .

detector (Everhart-Thornley type). Images were acquired at accelerating voltage of 30 keV with a beam current of 10 pA.

Air-drying, which is rarely used in SEM, was paradoxically well adapted to intra colonial cell observations when carried out after a high Lugol/glutaraldehyde fixation (7.5–10%). No apparent collapse

effect of the matrix was observed (Fig. 1B). These intra colonial cells corresponded to (i) large diploid colonial cells (3.5–9.0 μm in length; $5.9 \pm 1.0 \mu\text{m}$; $n = 112$) and (ii) small haploid flagellates (2–5 μm ; $3.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$; $n = 48$). No apparent cell alteration or shrinkage was triggered by our method and cell size distribution was highly

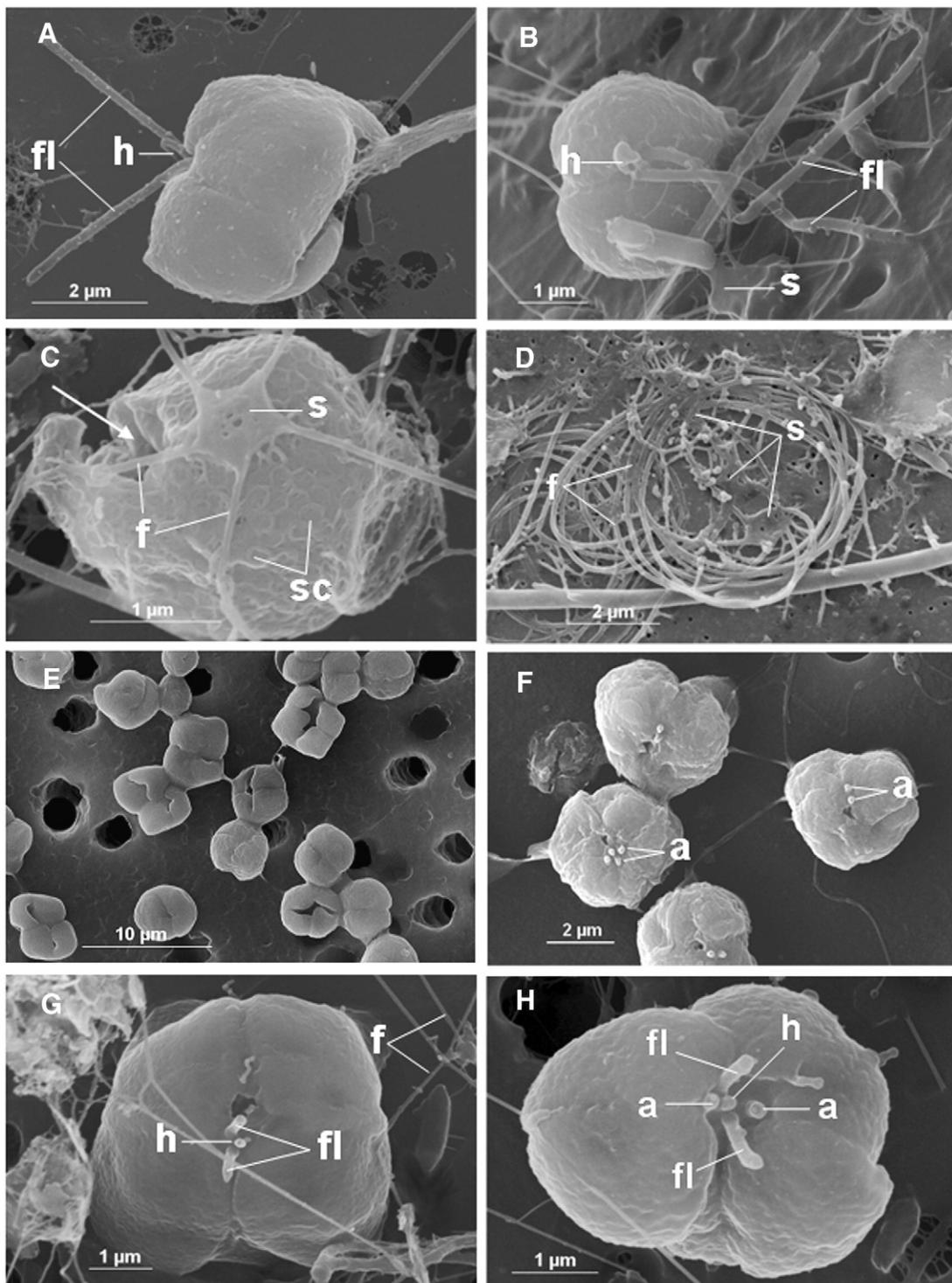


Fig. 3. SEM micrographs of the different *Phaeocystis globosa* morphotypes observed in the field outside colonies obtained from CPD (A–D) and inside colonies prepared with 10% L/G followed by air-drying (E–H): A) a diploid flagellate with two flagella and a haptonema devoid of scales and filaments; B) a haploid flagellate with two flagella and a haptonema accompanied by a star; C) a magnification of a haploid flagellate cell walls with rounded scales and a star with spread filaments and presenting a disruption at the apical pole (arrow) due to a recent release of stars; D) three stars with coiled filaments; E) diploid cells originating from a colony sampled at the beginning of colony formation; F) diploid colonial cells with small appendages (2 to 4) originating from a colony sampled at the exponential phase of colony formation; G) and H) focus on appendages showing a concomitant growth of two appendages. fl = flagella; h = haptonema; s = star; f = filament; sc = scale; a = appendage.

homogeneous resulting in a low standard deviation around the mean size value. The impact of fixation and air-drying on intra colonial cells morphology was assessed by testing separately an acid Lugol solution (L), glutaraldehyde (G) and a mixing of both Lugol/glutaraldehyde (L/G). Each fixative effect was evaluated at low (2.5 and 5.0% v/v) and high concentrations (7.5 and 10% v/v) on more than 150 SEM micrographs (111 diploid colonial cells and 48 haploid flagellates; Fig. 2). Evaluated criteria for a good cell preservation relied on cell size (μm), integrity (e.g. chloroplast separation evaluated from the distance between chloroplasts, cell shrinkage inferred from standard deviation around a mean cell size value), number and size of visible appendages (especially flagella for haploid flagellates) and cell wall aspect (wrinkled, smooth and disrupted).

None of the fixatives triggered any changes in cell size (t -test; $p>0.05$). Lugol treatments allowed the best preservation of haploid flagellates as 95% of this morphotype ($n=19$) responded to the criteria of cell integrity and cell wall aspect. With glutaraldehyde and Lugol/glutaraldehyde treatments this percentage of good preserved cells dropped down to 50% ($n=18$) and to 55% ($n=11$), respectively. Haploid flagellates preservation was improved at low concentration (2.5–5.0% v/v) and for all fixatives, whereas increasing Lugol concentration seemed to trigger the loss of the flagella. In fact, 50% of the observed haploid cells whether lacked flagella under Lugol preservation or SEM photography revealed low contrast for this appendage (Fig. 2A and D). By contrast flagella was always clearly distinguished under glutaraldehyde preservation for all concentrations (Fig. 2B-E-C-F). Regarding diploid colonial cells, all fixatives permitted to correctly preserve 50 to 60% of total cells ($n=32$ to 51; Fig. 2 G-L). Conversely at low Lugol concentration diploid colonial cells were altered since 40% of total diploid cells observed were highly deformed. This resulted in cell wall disruption and chloroplasts separation (distance between chloroplasts increased from 0.3 μm to 1.6 μm in badly preserved cells; Fig. 2H). A good fixation compromise for SEM observation of *P. globosa* morphotypes consists in high Lugol concentration for diploid colonial cells and low glutaraldehyde concentrations for haploid flagellates observation.

CPD appears to be a suitable method for observing extra colonial cells of *P. globosa*. Thus, morphological details such as appendages (i.e. flagella, haptoneema), star-forming filaments or scales covering extra colonial cells were clearly visible (Fig. 3A-D). Although the suitability of this method was previously proven in cultures (Vaulot et al., 1994; Antajan et al., 2004), only few studies have focused on field samples of *P. globosa* (Rousseau et al., 2007). The application of our optimised methods for SEM observation to field samples allowed the observation of *P. globosa* morphotypes (Fig. 3) and their morphological features as described by Rousseau et al. (2007). In fact, large diploid flagellates devoid of typical flagellate elements such as scales, filaments and stars and having the same shape and size than diploid colonial cells (5–7 μm) were occasionally observed. Small haploid flagellates (2–5 μm), both observed in free-living state and inside colonies, were associated with rounded scales, coiled filaments and stars (Fig. 3B-C). Nevertheless, we seemed to have 'missed' the second small flagellate lacking stars and filaments reported by Peperzak et al. (2000). This may be due to the context of observation as Peperzak et al. (2000) worked on batch culture of *P. globosa* i.e. conditions that likely favoured the development of all morphotypes. To our knowledge, no data has so far revealed the existence of this second flagellate type in the field.

Our methodology coupled to SEM observation permitted to give new insights into *P. globosa* morphology. Intra colonial diploid cells with three to five appendages were observed (Fig. 3G-H) whereas only two appendages have been reported for this cell stage so far (Rousseau et al., 2007). These appendages are located at the apical pole and could be considered as outline of flagella in symmetrical position around a central appendage, seen as a haptoneema. They

varied in size from 0.1 μm to 1.5 μm for colonies measuring between 250 μm and 1500 μm . Two small appendages were already recorded for *P. globosa* and its congeneric species namely *P. antartica* and *P. jahnii* (Rousseau et al., 2007) but their role is still unknown. Our field observations suggest that they can appear in greater number and grow according to colony maturation. We thus assume that appendages indicate a potential cellular activity leading to flagellate formation (mitosis or meiosis). However the issue of this process, i.e. whether diploid or haploid flagellates are formed after colonial cell division, is still unknown. Thus colonial cells carrying three to five appendages can be considered as key transitional stages in the *P. globosa* life cycle drawing the link between non motile cells and flagellates.

The simple two step methodology presented here can be considered as unconventional and unsuitable for most biological samples given the number of references highlighting cell alteration under air drying procedure and under high preservative concentration. However, it appears to be very effective on *P. globosa* because of its compatibility with the unique chemical and structural properties of colonies. It is a rapid technique allowing the visualization of sufficient surface features. It also offers the opportunity to observe cells inside mucilaginous colonies and could be applied to other congeneric species of *Phaeocystis*.

Acknowledgements

We thank the crew of the NO "Sepia II" and V. Cornille for their assistance during the sampling survey. The authors wish to thank Dr. D. Vincent, Pr. U. Christaki and Dr. E. Breton (Université du Littoral Côte d'Opale) for their constructive comments and discussion. Thanks are due to Mrs. Marie-Josèphe Chrétiennot-Dinet for her valuable advices concerning the preservation and observation of *Phaeocystis* cells. The authors are also very grateful to three anonymous reviewers for their suggestions and comments on an earlier version of the manuscript. This study was supported by the Université du Littoral Côte d'Opale, the French National Program PNEC (Programme National d'Environnement Côtier), the regional program CPER (Contrat de Plan Etat-Région, financed by both the Nord Pas de Calais Region and the European ERDF funds) and the regional Water Agency 'Agence de l'Eau Artois-Picardie', through a PhD grant (contract n° 5306500).

References

- Antajan, E., Chrétiennot-Dinet, M.J., Leblanc, C., Daro, M.H., Lancelot, C., 2004. 19'-hexanoyloxyfucoxanthin may not be the appropriate pigment to trace occurrence and fate of *Phaeocystis*: the case of *P. globosa* in Belgian coastal waters. *J. Sea Res.* 52, 165–177.
- Chen, Y.Q., Wang, N., Zhang, P., Zhou, H., Qu, L.H., 2002. Molecular evidence identifies bloom-forming *Phaeocystis* (Prymnesiophyta) from coastal waters of south-east China as *Phaeocystis globosa*. *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 15–22.
- Cohen, A.L., Marlow, D.P., Garner, G.E., 1968. A rapid critical-point method using fluorocarbons ("Freons") as intermediate and transitional fluids. *J. Microsc.* 7, 331–342.
- Hasle, G.R., Syvertsen, E.E., 1997. Marine diatoms. In: Tomas, C.R. (Ed.), Identifying marine phytoplankton. Academic Press, San Diego, pp. 335–337.
- Lancelot, C., Keller, M.D., Rousseau, V., Smith Jr., W.O., Mathot, S., 1998. Autecology of the marine haptophyte *Phaeocystis* sp. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), Physiological ecology of harmful algal blooms. NATO ASI series, vol. G41. Springer-Verlag, Berlin, pp. 209–224.
- Nejstgaard, J.C., Tang, K.W., Steinke, M., Dutz, J., Koski, M., Antajan, E., Long, J.D., 2007. Zooplankton grazing on *Phaeocystis*: a quantitative review and future challenges. *Biogeochemistry* 83, 147–172.
- Peperzak, L., Colijn, F., Vrieling, E.G., Gieskes, W.W.C., Peeters, J.C.H., 2000. Observations of flagellates in colonies of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae): a hypothesis for their position in the life cycle. *J. Plankton Res.* 22, 2181–2203.
- Riegman, R., Van Boekel, W., 1996. The ecophysiology of *Phaeocystis globosa*: a review. *J. Sea Res.* 35, 235–242.
- Rousseau, V., Chrétiennot-Dinet, M.J., Jacobsen, A., Verity, P.G., Whipple, S., 2007. The life cycle of *Phaeocystis*: state of knowledge and presumptive role in ecology. *Biogeochemistry* 83, 29–47.

- Schoemann, V., Becquevort, S., Stefels, J., Rousseau, V., Lancelot, C., 2005. *Phaeocystis* blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: a review. *J. Sea Res.* 53, 43–66.
- Throndsen, J., 1978. Preservation and storage. In: Sournia, A. (Ed.), *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris, pp. 69–74.
- Vaulot, D., Birrien, J.L., Marie, D., Casotti, R., Veldhuis, M.J., Kraay, G.W., Chrétiennot-Dinet, M.J., 1994. Morphology, ploidy, pigment composition and genome size of cultured strains of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* 30, 1022–1035.
- Verity, P.G., Brussaard, C.P.D., Nejstgaard, J.C., Van Leeuwe, M.A., Lancelot, C., Medlin, L.K., 2007. Current understanding of *Phaeocystis* ecology and biogeochemistry, and perspectives for future research. *Biogeochemistry* 83, 311–330.

ANNEXE 2

Classification de cytogrammes par appariement élastique

Vers la discrimination automatique du phytoplancton marin par cytométrie en flux

Émilie Caillault* — Pierre-Alexandre Hébert* — Natacha Guiselin**
— L. Felipe Artigas**

* Laboratoire d'Analyse des Systèmes du Littoral (LASL),
Université du Littoral Côte d'Opale, 50 rue Ferdinand Buisson, Fr-62228 CALAIS.
Emilie.Caillault ; Pierre-Alexandre.Hebert@lasl.univ-littoral.fr

** Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG), UMR CNRS 8187
Université du Littoral Côte d'Opale,
Felipe.Artigas ; Natacha.Guiselin@univ-littoral.fr

RÉSUMÉ. Le papier propose une approche de détermination automatique de la composition phytoplanctonique d'un prélèvement marin à partir de cytogrammes, ie. d'un ensemble de signaux de fluorescence et de diffusion acquis à l'aide d'un Cytomètre. Actuellement, la discrimination se fait de façon visuelle, par confrontation à des cytogrammes de référence obtenus sur des cultures cellulaires de quelques espèces. L'approche proposée s'appuie sur une comparaison des courbes cytométriques entre cellules, basée sur une méthode d'appariement élastique de signaux temporels. Nous montrons l'utilité de cette mesure dans l'automatisation de la tâche de classification, en comparaison à des approches plus classiques basées attributs.

ABSTRACT. This paper describes an automatic approach for determining phytoplanktonic composition in a marine sample from cytometric profiles, ie. a set of fluorescence and scatter signals scanned by a flow cytometer. Up to date, the classification of these signals is made by visual comparison of the obtained profiles on natural water samples with the ones issued from single species analysis on cultures. The proposed approach aims at making this comparison as automatic as possible, by applying a dynamic time warping of time data series. We show the relevance of this measure in the automatic classification task and compare it with classical methods based on features.

MOTS-CLÉS : Appariement élastique, mesure de similarité, reconnaissance automatique, composition phytoplanctonique, signaux cytométriques.

KEYWORDS: Elastic matching, similarity measure, automatic recognition, phytoplankton composition, flow cytometry profiles.

1. Introduction

L'étude des écosystèmes marins est d'une importance capitale sur les plans écologique (biodiversité, production, protection), climatique (compréhension des cycles biogéochimiques, circulation globale), ainsi qu'économique (tourisme, ressources exploitables, transport). Dans les écosystèmes pélagiques côtiers, le phytoplancton (micro-algues dérivant au gré des courants) constitue un des compartiments biologiques les plus dynamiques, responsable de la majeure partie de la production primaire à la base de l'alimentation des organismes marins. Il est capable de répondre très rapidement aux forçages environnementaux, à différentes échelles spatio-temporelles, aussi bien en terme d'abondance, de biomasse, que de composition ([CLO 96]). L'apparition d'événements nuisibles, voire toxiques, a contribué au regain d'intérêt vis-à-vis des études concernant les réponses spécifiques et la phylogénétique ([SMA 97]). Ainsi, le phytoplancton a été retenu dans le cadre de la mise en oeuvre de la Directive Européenne Cadre sur l'Eau (DCE, 2000[Dir00]), comme paramètre biologique pour la classification de l'état écologique des masses d'eau, notamment sa biomasse (à travers la concentration de chlorophylle a), mais également l'abondance totale et relative des cellules phytoplanctoniques.

La technique de référence pour déterminer la composition planctonique d'un échantillon marin est le comptage en microscopie optique à inversion après sédimentation, dite technique d'Utermöhl [LUN 58]. Cette méthode est coûteuse en temps d'analyse et demande du personnel spécialisé en taxonomie phytoplanctonique. Les techniques classiques dans ce domaine ne permettent pas de détecter les changements de l'écosystème marin à micro-échelle spatio-temporelle, combinant la haute fréquence et la qualité des informations obtenues, sans qu'il n'y ait une participation humaine compétente considérable pour classifier et prélever des échantillons (citation de Thyssen, 2005¹). Cependant, il existe aujourd'hui des méthodes alternatives à la microscopie qui réduisent les temps d'analyse, augmentent la précision des comptages, permettent un grand nombre de mesures et offrent ainsi la possibilité pour les microbiologistes d'avoir de nouveaux aperçus dans le fonctionnement des communautés planctoniques. Parmi ces techniques alternatives, la cytométrie en flux offre non seulement la possibilité d'étudier les petites cellules nano- et picoplanctoniques, mais depuis peu permet également l'étude des cellules de grande taille ($> 20\mu m$). L'établissement de signatures caractéristiques de chaque type de phytoplancton rencontré dans les eaux naturelles par cytométrie est une perspective intéressante qui devrait permettre de suivre leur dynamique à haute résolution temporelle et spatiale en temps réel.

L'objectif de nos travaux est de déterminer automatiquement la composition phytoplanctonique d'un prélèvement marin à partir des signaux bruts en sortie du cytomètre, avec trois préoccupations : la diminution du temps d'analyse global (acquisition et identification), un système semi-automatisé dont la manipulation ne nécessite pas d'expertise taxonomique spécifique et l'exploitation de toutes les informations disponibles. Si un nombre important de travaux sont dédiés à l'utilisation de la cyto-

1. <http://www.com.univ-mrs.fr/PRECYM/spip.php?article13>

métrie en flux en domaine marin, peu ou pas de travaux statistiques sont consacrés à l'étude du phytoplancton dans son intégralité (en raison de son grand spectre de tailles allant de moins de $1\mu m$ à plusieurs $100\mu m$). On dénote récemment des méthodes de reconnaissance semi-automatisée couplant la cytométrie et l'analyse d'image (appareil FlowCam, [BUS 06],[BLA 05]) dans le cadre de l'étude du microplancton de diamètre $20 - 200\mu m$ dédié spécifiquement à reconnaître un rang taxonomique supérieur ("genre") ou une unique espèce (*Alexandrium tamarensis*, [LEP 04]). Les outils de reconnaissance utilisés sont des outils classiques de reconnaissance de forme (approches modèles ou statistiques, perceptron MLP, plus proche voisin kppv, réseau bayesien, machine à vecteur support SVM, etc.) et sont appliqués sur des attributs extraits de l'image ou du logiciel embarqué. En terme de performances connues, dans [SIE 05] une expérience a été menée sur 13 groupes (au total 982 images) avec des taux de reconnaissance de l'ordre de 70%.

Dans notre étude, nous disposons d'une bibliothèque de signaux d'espèces différentes présentes en Manche Orientale acquis à l'aide du CytoSense (CytoBuoy)², et étiquetés par des biologistes à partir de leur isolement du milieu naturel. Les données seront présentées et analysées dans la section 2.

Dans l'objectif d'identifier le phytoplancton à partir de signatures caractéristiques connues, nous avons tout d'abord utilisé une méthode de comparaison de signaux basée sur la notion d'appariement élastique, proposée par Sakoe et Chiba (DTW, Dynamic Time Warping [SAK 78]). Puis nous en avons dérivé une mesure de similarité, également basée sur la quantification des déformations à apparier deux signaux temporels entre eux. Les différentes mesures et méthodes permettant de les calculer sont présentées à la section 3. Ces mesures sont ensuite utilisées comme entrées d'un classifieur de type plus proche voisins (k-ppv). Les résultats associés aux différentes mesures et méthodes sont présentés et analysés à la section 4.

2. Positionnement du problème

Un échantillon marin naturel contient une multitude d'organismes phytoplanctoniques de différentes espèces parfois nouvelles par rapport au milieu étudié. L'analyse de ces échantillons par la méthode actuelle est longue et fastidieuse même pour un expert du phytoplancton. Notre objectif est donc de faciliter cette tâche tout en permettant une optimisation des capacités analytiques. Dans cette optique, nous avons axé nos travaux sur trois points :

- Apporter une mesure complémentaire aux informations déjà offertes par le logiciel d'analyse du CytoSense et facilement interprétable par l'expert : une mesure de similarité d'un individu par rapport à une base de référence ;
- Mesurer le taux d'impact de cette nouvelle mesure indépendamment des autres ;
- automatiser la tâche de confrontation de deux cytogrammes.

2. produit de Cytobuoy : <http://www.cytobuoy.com/>

Pour étudier la faisabilité de notre objectif, nous nous sommes placés dans le cadre de l'analyse d'échantillons de culture avec un nombre déterminé d'espèces soit dans un cadre supervisé avec un nombre de classes connu et un ensemble de signatures caractéristiques donné par espèce. Les données à traiter sont issues d'un cytomètre en flux expliqué ci-dessous.

2.1. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules (cellules, bactéries ...) entraînées par un flux liquide à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. Elle permet l'acquisition, illustrée à la figure 2.1, de nombreuses mesures optiques et physiques caractérisatrices des particules : la diffusion vers l'avant (Forward Scatter, FWS) qui est dépendante de la taille de la particule, la diffusion à 90° (Sideward Scatter, SWS) plutôt dépendante de la structure interne de la cellule, enfin les différentes longueurs d'onde de fluorescence, fonction du type de pigments photosynthétiques existant au sein des micro-algues et de la longueur d'onde d'excitation du laser utilisé. Ces signaux sont séparés par des filtres optiques, puis collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés dans un ordinateur. Un logiciel propose alors le calcul de données statistiques associées aux distributions des signaux mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (pour chaque attribut calculé) ou de cytogrammes (pour les signaux temporels acquis).

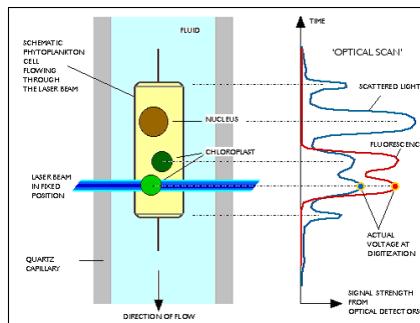


Figure 1. Signaux envoyés par le cytomètre, image issue du site CytoBuoy

La cytométrie apporte une approximation concernant la taille des cellules, leur structure interne et l'émission de fluorescence des pigments qu'elles possèdent. Ces informations sont ponctuelles, c'est-à-dire, chaque signal émis par la cellule lorsqu'elle intercepte le laser se résume à un pic de lumière dont on récupère soit le maximum soit l'intégration. Beaucoup de cellules ont une intensité ou un contenu pigmentaire identique alors qu'elles n'appartiennent pas du tout à la même catégorie. Cela oblige le regroupement des différentes cellules phytoplanctoniques en fonction de l'intensité des différentes fluorescence ou en fonction de l'intensité des signaux de

diffusion ou de diffraction. Les données traitées ici sont les cytogrammes issus d'un Cytomètre de paillasse, CytoSense, couplé à un logiciel d'analyse de données cytométriques (Cytoclus). Le CytoSense ne permet pas de donner le nom de l'espèce ni même la famille cependant il facilite la tâche de l'expert en apportant une information bien plus qualitative des assemblages phytoplanctoniques, ceci en récupérant le signal du profil entier de chaque cellule rencontrée.

2.2. Présentation et analyse des cytogrammes

Dans le cadre de la bibliothèque de signaux, à chaque particule détectée sont associés 7 signaux bruts temporels acquis dans les mêmes conditions d'expérimentations (fréquence d'échantillonnage, seuil de détection, etc.) :

- un signal pour la longueur FWS (taille de la cellule) ;
- deux signaux SWS (structure et composition), en haute et basse sensibilité (SWS_HS, SWS_LS) ;
- deux signaux de longueur de fluorescence rouge FLR ($\lambda_{em} > 620nm$) en haute et basse sensibilité (FLR_HS, FLR_LS), caractéristique des pigments chlorophylliens, recueillie au travers d'un miroir dichroïque et d'un filtre passe-haut ;
- un signal de longueur de fluorescence FLO ($565nm < \lambda_{em} < 592nm$) en basse sensibilité FLO_HS, recueillie à 90° grâce à un miroir dichroïque qui la transmet sur un photomultiplicateur via un filtre passe-bande ;
- deux signaux de fluorescence FLY, ($545nm < \lambda_{em} < 570nm$) en haute et basse sensibilité (FLY_HS, FLY_LS), recueillie comme FLO.

Nous disposons d'une base de données étiquetées provenant d'un même échantillon de culture. Cette base est constituée de sept espèces phytoplanctoniques isolées des eaux côtières de Manche Orientale et identifiées par microscopie optique : *Chaetoceros socialis*, *Emiliania Huxleyi*, *Lauderia annulata*, *Leptocylindrus minimus*, *Phaeocystis globosa*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira rotula*.

Les figures du tableau 1 illustrent des exemples de cytogrammes pour les espèces *E. huxleyi* et *L. annulata*. Pour la première espèce, nous avons sélectionné deux individus particulièrement proches, et un troisième de profil plus éloigné. Malgré une forte similarité de profil, on constate une variabilité non négligeable des cytogrammes intra-espèce. On peut en particulier noter que les fronts montants et descendants des courbes de forte intensité de l'espèce *E. huxleyi* ne sont pas exactement synchrones.

La difficulté de la discrimination réside dans le fait que les microalgues phytoplanctoniques présentent une grande diversité de taille et de contenu pigmentaire (qualité et quantité), fonction du groupe auquel elles appartiennent mais également fonction de leur état physiologique et des conditions du milieu, comme en témoignent les fluctuations enregistrées pour un même groupe d'algues à haute résolution des travaux de Takabayashi et al. [TAK 06]. La méthode d'identification d'une espèce devra donc être robuste aux variabilités d'amplitudes et de formes inter et intra espèce.

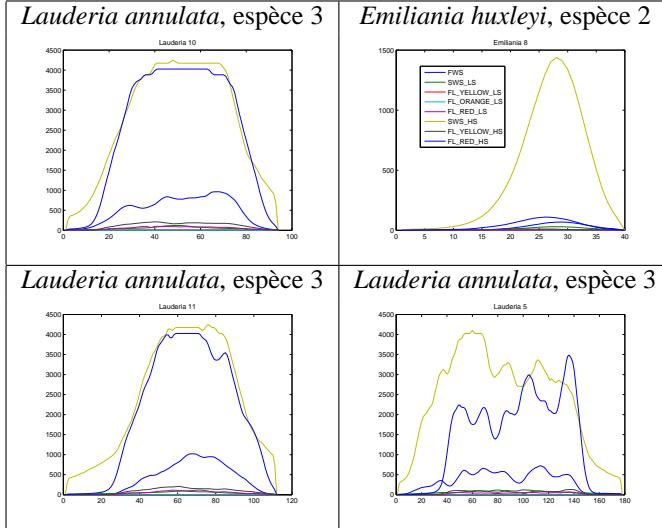


Tableau 1. Exemples de cytogrammes de deux espèces

2.3. Méthode d'identification proposée

Le procédé d'identification proposé pour une espèce phytoplanctonique donnée à partir de cytogrammes est basée sur l'approche naturelle des biologistes qui consiste à étiqueter un cytogramme à partir de la mise en correspondance visuelle de courbes cytométriques de référence. La mise en correspondance automatique la plus simple est la méthode d'appariement linéaire. Hors celle-ci ne paraît pas a priori adaptée aux courbes cytométriques. En effet, la structure interne - noyau et chloroplastes - est très variable pour une même espèce selon son état (cellule, colonie, cycle de vie, etc.). Ceci se traduit notamment au niveau des courbes par une position des pics d'absorption non constante par rapport au début de la cellule et des intensités variables du signal de fluorescence pour une même espèce. Par ailleurs, les instants de détection de début et fin de la cellule par les capteurs du cytomètre, inhérents à la précision des capteurs et au chevauchement éventuel de cellules, peuvent introduire des décalages temporels des signaux.

Pour pallier ces déformations, nous avons opté pour une technique d'appariement souple. Cette méthode a largement été éprouvée initialement dans le cadre de la reconnaissance de la parole [SAK 78] en comparant les spectrogrammes associés aux sons/phonèmes puis dans le cadre de la reconnaissance de l'écrit ou du scripteur : identification de lettres ou signatures dynamiques ou numérisées [NIE 05]).

Le système d'identification proposé permet d'établir une mesure de similarité de toute nouvelle espèce X_{test} et d'étiqueter l'individu (*Classe*). Il peut être représenté schématiquement selon la figure 2.3, et est décomposé en trois étapes classiques : une

étape d'extraction d'un ou plusieurs attributs de mesure, une phase de réduction ou fusion de ces attributs puis l'étape de classification.

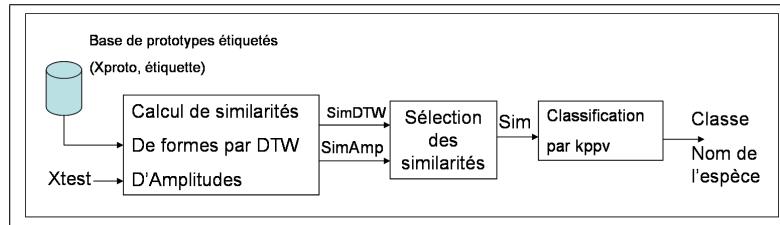


Figure 2. Synoptique du système de reconnaissance de cellules phytoplanctoniques

La première étape consiste à extraire deux similarités d'information complémentaires : une similarité de forme géométrique (*SimDTW*) obtenue par appariement élastique décrit en 3.1 et une similarité d'amplitude (*SimAmplitude*). La similarité de forme géométrique est une matrice de similarité synthétique qui réalise un appariement conjoint de chacune des courbes, afin de respecter la composition interne de la cellule, elle est décrite à la section 3.

La deuxième mesure, *SimAmplitude* donnée à l'équation 1 pour un individu inconnu et un prototype j , est une moyenne des similarités d'amplitude $\overline{SimAmplitude}[var]$ définies ci-dessus avec $var \in [1, 8]$ le numéro de la courbe considérée et $A(var)$ la valeur moyenne de la courbe d'indice var . Ce ratio pour une paire d'individus est égal à la valeur de l'amplitude moyenne minimale entre des signaux des deux individus sur le nombre maximal. Lorsque que deux individus sont de même amplitude moyenne, ce ratio est égal à 1.

$$SimAmplitude(X_{test}, X_j, var) = \frac{\min(\overline{A}(var), \overline{A_j}(var))}{\max(\overline{A}(var), \overline{A_j}(var))} \quad [1]$$

La deuxième étape du processus global de reconnaissance est une étape de sélection des similarités soit de forme géométrique soit d'amplitude.

La dernière étape est la phase de classification, elle est basée sur la recherche du prototype le plus proche (1-ppv) au sens de la similarité définie en entrée du reconnaissleur. L'individu X_{test} prend l'étiquette du prototype X_k le plus similaire. Soient $j \in [1, J]$ l'indice des prototypes et J le nombre de prototypes.

$$Etiquette(X_{test}) = Etiquette(X_k) \text{ tel que } k = \max_{j \in [1, J]} (Similarite(X_{test}, X_j)); \quad [2]$$

3. Mesure de dissimilarités et similarités entre signaux temporels par appariement élastique conjoint

Le problème de reconnaissance spécifique d'une cellule phytoplanctonique associé à un cytogramme se résume à une comparaison de plusieurs signaux temporels décrits

vant un individu par rapport à des profils de référence, ces profils sont spécifiques à une espèce donnée. La mesure décrite ci-dessous est généralisable à tout individu décrit par une série de mesures temporelle multi-dimensionnelle avec une signature caractéristique propre.

3.1. Comparaison de deux signaux par la méthode DTW classique

La méthode *Dynamic Time Warping (DTW)* proposée par Sakoe et Chiba [SAK 78] permet de calculer une mesure de dissimilarité entre deux séquences de mesures temporelles, de durées distinctes. Cette mesure traduit la quantité de distorsion géométrique nécessaire à la superposition des deux courbes, en tolérant des déformations temporelles locales.

Pour cela, elle fait correspondre au mieux les points de l'un et l'autre signal, puis définit leur dissimilarité comme la moyenne des distances entre points appariés. Par exemple, dans le cas idéal où les points appariés se confondent, l'appariement est parfait, et la dissimilarité obtenue nulle. La souplesse de l'algorithme provient de sa capacité à apparier des points décalés dans le temps.

Notons $X = \{(x_i), i = 1, \dots, n_x\}$ et $Y = \{(y_j), j = 1, \dots, n_y\}$ les deux signaux à comparer, avec i et j leurs indices temporels. L'algorithme permet d'obtenir un appariements $P = \{(i_k, j_k), k = 1, \dots, n_k\}$ (matrice de mise en correspondance) entre les points des signaux X et Y , soumis à certaines contraintes temporelles. Cet appariement optimal minimise une distance moyenne pondérée entre points appariés, basée sur une distance d quelconque :

$$C(X, Y, P) = \frac{\sum_{k=1}^{n_k} d(x_{i_k}, y_{j_k}) \cdot w(k)}{\sum_{k=1}^{n_k} w(k)} \quad [3]$$

$$= \frac{Dist(X, Y, P)}{\sum_{k=1}^{n_k} w(k)}, \quad [4]$$

avec $w(k)$ le poids associé à chaque paire k de l'appariement.

Voici les contraintes imposées à l'appariement, dans la variante de l'algorithme que nous avons choisie :

- 1) Contrainte aux limites : les premiers et derniers points des signaux sont appariés : $(1, 1) \in P$ et $(n, m) \in P$;
- 2) Contrainte de continuité : tout point est apparié au minimum une fois ;
- 3) Contrainte de monotonie : deux points d'un signal donné sont nécessairement appariés à des points identiquement ordonnés temporellement : si $(i_a, i_b) \in P$ et $(i_c, i_d) \in P$, alors $c > a$ implique $d \geq b$.

S'appuyant sur ces contraintes, l'algorithme considère chaque appariement comme un chemin dans l'espace bidimensionnel des couples $\{(i, j), i = 1, \dots, n, j = 1, \dots, m\}$, l'ensemble des correspondances possibles entre les points des signaux X et Y . Il re-

cherche alors l'appariement optimal partant de la correspondance initiale $(1, 1)$ et allant jusqu'à la correspondance finale (n, m) (contrainte 1), en assurant la minimisation du coût C (moyenne pondérée des distances entre les points appariés).

Sakoe et Chiba montrent aussi que le critère C ne peut être optimisé par programmation dynamique que si la valeur du dénominateur $\sum_{k=1}^{n_k} w(k)$ est indépendante du choix de l'appariement P . Cela peut-être obtenu par un choix judicieux, de sorte que cette somme de poids soit égale à $n + m$, n ou m , notamment.

Sous réserve que les poids respectent cette contrainte, un chemin optimal correspond alors à un chemin qui minimise la distance cumulée $Dist$.

Si l'on suppose connus les chemins optimaux menant à chacune des trois correspondances $(i - 1, j)$, $(i, j - 1)$ ou $(i - 1, j - 1)$, alors le chemin optimal menant à (i, j) est aisément à définir : il s'agit du moins coûteux des 3 chemins précédents, augmenté de la correspondance (i, j) . Son coût $Dist$ se déduit de la même façon. Or on sait déterminer les chemins optimaux menant aux appariements $(1, \dots)$ et $(\dots, 1)$, complètement déterminés par les contraintes 2 et 3. Il est donc possible, par récurrence, de connaître le chemin réalisant le meilleur appariement entre les signaux X et Y , et son coût $Dist$.

En pratique, la recherche du chemin optimal s'opère à l'aide d'une programmation non pas récursive mais dynamique, en remplissant progressivement une matrice de taille (n, m) de coûts $Dist(i, j)$, dont chaque élément (i, j) contient le coût minimum de l'appariement des points x_i et y_j , et de leurs prédecesseurs. Le coût final (distance cumulée $Dist$) est obtenu dans l'élément (n, m) de la matrice.

Nous présentons ici la partie de l'algorithme (1) permettant un calcul efficace du coût C du chemin optimal. Le chemin lui-même peut ensuite être retrouvé en retracant les appariements de coûts minimum, du dernier (n, m) , jusqu'au premier $(1, 1)$. Cette recherche peut notamment servir à normaliser le coût obtenu $Dist$ pour obtenir le coût de distorsion moyen par couple de points appariés C .

L'optimisation de C a été ramenée à la minimisation de la distance cumulée $Dist$, grâce au choix de poids dit *symétrique* proposé par Sako et Chiba. Soit (i_k, j_k) la paire k de l'appariement P :

- $w(k) = 2$, si $k = 1$, ou si $(i_{(k-1)}, j_{(k-1)}) = (i_k - 1, j_k - 1)$;
- $w(k) = 1$, sinon.

On peut alors vérifier que $\sum_{k=1}^{n_k} w(k) = n + m$ est indépendant de P . L'optimisation de la distance cumulée $Dist$ induit donc bien celle du coût C .

3.2. Contraintes de voisinage dans la méthode DTW

La version précédente de l'algorithme autorise, sans pénalité, des associations extrêmement souples : si les premiers points de chaque signal sont nécessairement appariés, tout comme les derniers, le premier d'un signal peut être apparié au dernier de l'autre.

Algorithm 1 Algorithme *DTW* retournant la distance cumulée du meilleur appariement

```

{Calcul de la matrice d'accumulation des distances}
 $Dist(1,1) = 2.d(x_i, y_j)$ 
for all  $i = 2, \dots, n$  do
     $Dist(i,1) = Dist(i-1,1) + d(x_i, y_1)$ 
end for
for all  $j = 2, \dots, m$  do
     $Dist(1,j) = Dist(1,j-1) + d(x_1, y_j)$ 
end for
for all  $i = 2, \dots, n$  do
    for all  $j = 2, \dots, m$  do
         $Dist(i,j) = \min \{ Dist(i-1,1) + d(x_i, y_j), Dist(i,j-1) + d(x_i, y_j), \dots$ 
         $\dots, Dist(i-1,j-1) + 2.d(x_i, y_j) \}$ 
    end for
end for
return  $Dist(n,m)$ 

```

Cela représente des déformations temporelles extrêmes. Afin de limiter les mises en correspondances de points d'indices temporels trop distants, nous avons également travaillé avec une version de *DTW* restreignant les appariements possibles de chaque point à une fenêtre temporelle réduite et prédéterminée de points du signal opposé.

La contrainte la plus stricte revient à réduire la possibilité d'association de chacun des points du signal le plus long (comportant le plus de points), à un unique point de l'autre signal : le plus proche dans le temps, après ajustement temporel des deux courbes. Il s'agit d'une forme « linéaire » du *DTW*, car l'indice de correspondance est obtenu par une règle de trois. En supposant que X contient plus de points que Y :

$$P = \left\{ (i, j_i^*); i \in \{1, \dots, n\}, j_i^* = E \left(1 + \frac{(i-1)}{(n-1)}(m-1) \right) \right\}, \quad [5]$$

avec E la fonction « arrondi à l'entier le plus proche ».

L'unique déformation autorisée est alors globale : celle qui consiste à ajuster la durée des deux signaux. Le calcul du coût ne nécessite pas d'optimisation.

Afin d'autoriser des déformations temporelles locales, on peut lui préférer une version moins restrictive, qui limite les associations à l'aide d'une fenêtre temporelle, dont la taille est définie comme un pourcentage p de la durée totale :

$$\forall (i, j) \in P, (i, j) \in \{(i, j_i); i \in \{1, \dots, n\}, j_i \in [j_i^* - p.m, j_i^* + p.m]\}, \quad [6]$$

où j_i^* est l'indice de correspondance linéaire défini dans l'équation précédente.

La modification à apporter à l'algorithme initial 1 est faible. Il suffit en effet de rejeter toutes les correspondances (i, j) situées hors d'une bande transversale de la matrice de coût, ce qui peut être réalisé en les forçant à une valeur rédhibitoire.

3.3. Normalisation du coût de déformation

La mesure fournie par l'algorithme *DTW* n'est pas directement interprétable : il s'agit d'une distance moyenne, dépendante des intensités des deux signaux. Dans l'objectif d'approcher le type de réponse d'un expert humain, et d'homogénéiser les mesures utilisées, on souhaiterait plutôt une mesure de similarité bornée entre 0 et 1 pour cela nous proposons de remplacer la distance d par une similarité s , construite comme un rapport de distances borné :

$$s(x_{i_k}, y_{j_k}) = \frac{d(x_{i_k}, y_{j_k})}{\max\{d(x_{i_k}, 0), d(y_{j_k}, 0)\}} \quad [7]$$

Le critère C muni de cette nouvelle mesure s'interprète désormais comme une similarité moyenne entre points appariés, ce qui traduit bien la notion de similarité entre signaux.

3.4. Appariement conjoint de plusieurs courbes

Dans notre application, nous avons considéré que les déformations temporelles devaient se faire conjointement pour chacune des courbes d'un même cytogramme. Nous considérons désormais deux ensembles $\bar{X} = \{(\bar{x}_i), i = 1, \dots, n_x\}$ et $\bar{Y} = \{(\bar{y}_j), j = 1, \dots, n_y\}$ de points, caractérisés chacun par n_c courbes : $\bar{x}_i \in \Re^{+n_c}$, $\bar{y}_i \in \Re^{+n_c}$.

Dans la version classique de *DTW*, nous considérons la distance de *manhattan* :

$$d(\bar{x}_i, \bar{y}_j) = \sum_{c=1}^{n_c} d(x_{ic}, y_{ic}), \quad [8]$$

avec d la distance euclidienne. Cela revient à cumuler les distances d'erreur sur les n_c courbes.

Dans notre version normalisée de *DTW*, nous cumulons les similarités sur les n_c courbes :

$$s(\bar{x}_i, \bar{y}_j) = \sum_{c=1}^{n_c} s(x_{ic}, y_{ic}), \quad [9]$$

La matrice de similarité de forme *SimDTW* est alors définie comme égale au coût C associé à la distance ci-dessus.

3.5. Visualisation des appariements

Afin de rendre compte de l'appariements optimal calculé entre deux courbes simples par la méthode *DTW* classique, il est usuel de superposer l'affichage des deux courbes sur une même figure, et de relier les points appariés par des segments de droite. Seulement cette technique ne permet pas d'apprécier visuellement la valeur de similarité ou dissimilarité obtenue.

Pour cette raison, nous proposons une autre méthode de visualisation de chacun des deux signaux X et Y , qui consiste à associer un point $f(X, P)_k$ (respectivement $f(Y, P)_k$) à chacune des paires $(i_k, j_k), k \in \{1, \dots, n_k\}$ de l'appariement optimal P . Ces paires vérifiant un ordre total suivant l'axe du temps, on espaces linéairement les abscisses de leurs n_k points correspondants, suivant cet ordre, de 1 à n_k . Quant aux ordonnées, elles sont déterminées par les valeurs x_{i_k} (respectivement y_{j_k}).

$$f(X, P)_k = (k, x_{i_k}) \quad ; \quad f(Y, P)_k = (k, y_{j_k}). \quad [10]$$

La représentation de ces points facilite la perception des écarts $d(x_{i_k}, y_{j_k})$ accumulés en chaque association de l'appariement P , puisque à chacun d'eux correspond deux points de même abscisse, dont l'écart (d'ordonnée) traduit cette valeur. Par ailleurs, chacune des deux courbes obtenues rend compte des déformations temporelles réalisées par l'ajustement des courbes initiales. Nous utilisons les pointillés pour différencier ces déformations temporelles induites par l'algorithme DTW, d'évolutions constantes des courbes d'origine.

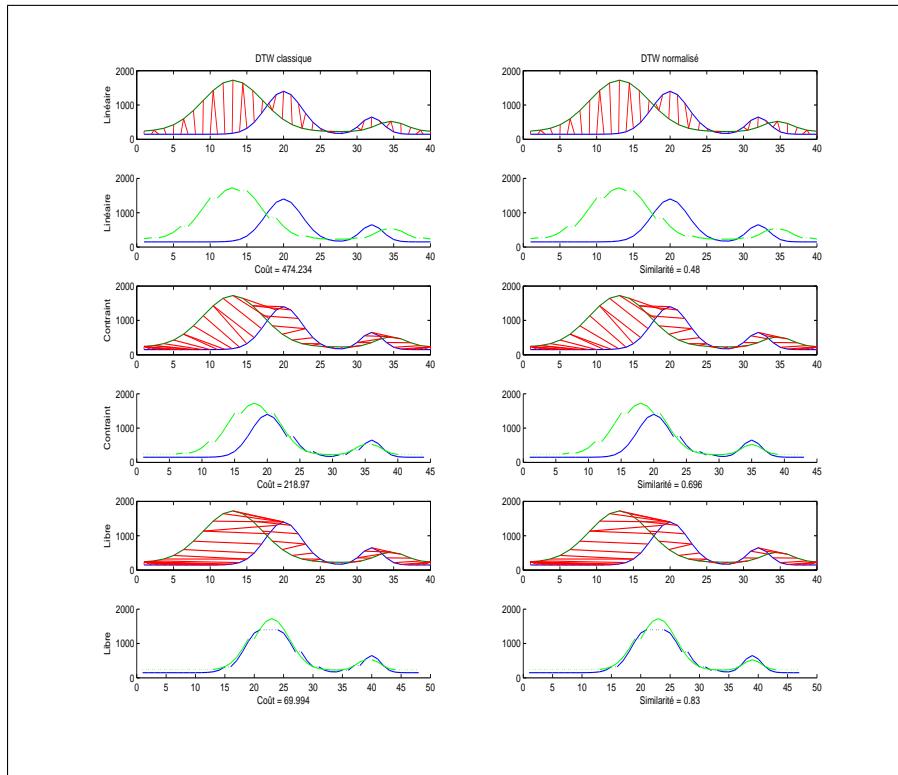


Figure 3. Variantes de DTW appliquées à deux courbes artificielles

La figure 3 présente deux courbes que nous proposons de comparer suivant les différentes versions de *DTW* présentées précédemment, les résultats étant organisés de la façon suivante :

- En colonnes : sur la première, l'algorithme originel de Sakoe et Chiba ; sur la seconde, notre variante normalisée ;
- En lignes : les différentes variantes de restriction du voisinage, le « linéaire » d'abord, puis le voisinage « constraint », enfin la version « libre ». Les résultats de chacune de ces variantes sont représentées suivant la technique usuelle (liaison des points appariés), et suivant notre technique.

Les appariements présentés sur la figure 3 témoignent de la proximité entre l'algorithme original et notre variante. Sur cet exemple, la seule différence appréciable concerne la normalisation de notre score. Par ailleurs, on vérifie le rôle de la contrainte de voisinage, qui autorise plus ou moins de déformations temporelles.

4. Résultats

Nous disposons d'une base de 100×7 cellules phytoplanctoniques différentes (équitablement réparties en 7 espèces) provenant du même échantillon de culture. Ces données ont été étiquetées par microscopie. Nous avons partitionné cette base selon la technique de validation croisée, en 4 sous-ensembles de 25×7 cellules chacun, qui jouent tour à tour le rôle de base de prototypes. Afin d'évaluer l'intérêt de la classification par appariement élastique, nous avons testé deux méthodes de classification basées attributs : 1-plus proche voisin et perceptron à une couche cachée sur le premier jeu de validation. Les 32 attributs fournis en entrée des classificateurs sont composés de 4 caractéristiques (nombre de pics, intégrale, longueur et hauteur) de chacune des 8 courbes. Les résultats des performances de reconnaissance globale et par espèce sont représentés dans le tableau 2.

Taux	Total	esp.1	esp.2	esp.3	esp.4	esp.5	esp.6	esp.7
1ppv	93,7	84	100	94,6	97,3	96	88	96
MLP	95,2	89,3	100	94,6	96	96	90,6	100

Tableau 2. Pourcentage de bonne reconnaissance pour des classificateurs basés attributs

4.1. Résultats associés à l'appariement élastique

Sur ces mêmes bases, nous avons testé les différentes versions de l'algorithme d'appariement élastique d'une part sur la mesure de distance (Sakoe et Chiba) et d'autre part sur la mesure de similarité définies dans la partie 3.4. Ces algorithmes ont été appliqués dans le cas d'un appariement conjoint des 8 courbes cytométriques (cytogramme).

Variant	base 1	base 2	base 3	base 4	Taux moyen	Ecart-type
Critère distance - DTW Sakoe et Chiba						
linéaire	93,3	90,8	94,2	92,1	92,6	1,4
constraint 10%	94,8	92,5	94,8	93,7	94,0	1,0
constraint 20%	96,3	92,9	94,6	93,1	94,2	1,5
non constraint 20%	96,1	90,2	93,5	91,8	92,9	2,5
Critère Similarité - DTW proposé						
lineaire	97,7	94,8	95,0	96,1	95,9	1,3
constraint 10%	97,9	94,6	96,0	96,1	96,1	1,3
constraint 20%	98,2	95,4	96,1	97,1	96,7	1,2
non constraint	97,3	95,6	96,0	96,9	96,4	0,8

Tableau 3. Pourcentage de bonne reconnaissance par appariement de cytogrammes

L'algorithme initial de Sakoe et Chiba est intéressant - 92,9% de bonne reconnaissance - dans le cadre d'un appariement libre sans contrainte de voisinage. Dans sa forme plus contrainte (cf. tableau 3), l'algorithme n'atteint pas cette performance : les taux de reconnaissance tendent à s'accroître avec l'allègement de la contrainte de voisinage, soit avec le degré d'élasticité de la méthode d'appariement. L'écart moyen de 1,5% du taux en faveur des méthodes élastiques conforte notre choix d'appariement souple.

La partie basse du tableau reprend les mêmes expériences avec notre mesure de similarité. La tendance est identique, cependant on constate un gain relativement significatif du taux de reconnaissance par rapport à la mesure de distance de Sakoe et Chiba. Ceci peut s'expliquer par l'intensité élevée des courbes cytométriques de taille et structure interne (SWS) et de fluorescence rouge (FL_RED_HS) de la cellule. La distance de Sakoe et Chiba est en effet très sensible aux écarts d'amplitudes pour les courbes de fortes intensités : quelques écarts élevés sur une seule courbe cytométrique peuvent fortement pénaliser le coût moyen de l'appariement. Ce problème n'affecte pas notre mesure de similarité, car elle normalise chaque écart d'intensité par l'intensité maximale locale.

4.2. Poids de l'amplitude dans la forme des signaux

La similarité d'appariement proposée tient compte à la fois de la forme géométrique de chaque courbe mais aussi de leur amplitude. Nous avons cherché à analyser indépendamment la mesure d'amplitude de celle de structure des signaux sur la base n°1. Pour cela, nous avons appliqué notre mesure de similarité sur les courbes ajustées en moyenne. *SimAmplitude* traduit globalement la similarité des intensités moyennes de fluorescences et de diffusion entre cellules. C'est un facteur important dans l'étape de classification automatique et celles des biologistes. On note que 93,7% des cellules sont correctement classées par ce seul critère. L'expérience montre que sans la notion d'amplitude, le système est capable de reconnaître 88,9% contre 98,2% avec celle-ci.

Le tableau suivant 4 détaille la répartition des échantillons de la base de test 1 en sortie du classifieur 1ppv basé sur la similarité d'amplitude et ceux des classifieurs 1ppv basé appariement constraint avec les courbes brutes ou ajustées en amplitude suivant qu'ils soient bien reconnus ou non. Nous constatons effectivement une complémentarité intéressante entre la forme et l'amplitude : 85,3% d'exemples communs reconnus et 12% (=8,4 + 3,6%) reconnus par l'un ou l'autre exclusivement. Et il est à noter que la mesure DTW constraint réussit à absorber en quasi-totalité les exemples bien reconnus à l'aide de l'amplitude (93%), et que sa prise en compte de la forme permet d'améliorer le score de 5,2%. Ces résultats sont en accord avec la construction de notre mesure de similarité par appariement.

Classifieurs		<i>SimDTW</i> ajusté		<i>SimDTW</i>		Total
		Reconnu	Non-rec.	Reconnu	Non-rec.	
<i>SimAmp</i>	Rec.	85,3	8,4	93,0	0,7	93,7
	Non-rec.	3,6	2,7	5,2	1,1	6,3
	Total	88,9	11,1	98,2	1,8	100

Tableau 4. Répartition croisée des classifieurs de forme et d'amplitude (rec=reconnu)

5. Conclusion

Dans le cadre de ces travaux, nous avons développé une mesure de comparaison conjointe d'ensembles de signaux, visant à automatiser la tâche de confrontation de cytogrammes, jusqu'alors opérée par l'expert biologiste sur la base de comparaisons visuelles avec des références obtenues sur des cultures monospécifiques propres ou existant dans la littérature. Celle-ci permet de rendre compte de la similarité de deux cytogrammes, en tolérant des déformations temporelles contrôlées, par une valeur d'interprétation aisée.

Nous avons ensuite expérimentalement montré l'intérêt d'utiliser cette mesure dans l'objectif de l'identification automatique d'une espèce phytoplanctonique. Nous nous sommes tournés pour cela vers un classifieur simple, de type k plus proche(s) voisin(s). Une validation croisée opérée sur une base étiquetée de 700 cellules phytoplanctoniques, équitablement représentative de 7 espèces différentes, a permis de mesurer un taux moyen de bonne reconnaissance intéressant (96,7%). En outre, les scores de référence obtenus à partir d'attributs plus classiques, extraits des signaux bruts, notamment avec un classifieur de type plus élaboré, se sont montrés plus faibles.

Les perspectives dégagées semblent prometteuses. Cette mesure de similarité pourra être exploitée dans des classifieurs plus perfectionnés, en fusionnant d'autres types d'information, dans des contextes supervisés ou non-supervisés. En outre, des tests de reconnaissance sur un échantillon d'eau de mer contenant différentes espèces phytoplanctoniques permettra de valider l'importance de notre mesure en conditions réelles, avec très probablement une plus grande disparité de cytogrammes, même pour une es-

pèce donnée par rapport à la culture cellulaire, en raison de la plus grande diversité d'états physiologiques.

Remerciements

Les auteurs remercient E. Breton, X. Mériaux et G. Wacquet pour leur aide dans la mise en forme et construction de la base de données. Ces travaux s'inscrivent dans le BQR PhytoClas co-coordonné par le Pr. D. Hamad et le CPER Bloom de Phaeocystis financés par l'ULCO, la Région Nord Pas-de-Calais et l'Europe (FEDER).

6. Bibliographie

- [BLA 05] BLASCHKO M. B., HOLNESS G., MATTAR M. A., LISIN D., UTGOFF P. E., HANSON A. R., SCHULTZ H., RISEMAN E. M., SIERACKI M. E., BALCH W. M., TUPPER B., « Automatic In Situ Identification of Plankton », *WACV-MOTION '05 - Volume 1*, Washington, DC, USA, 2005, IEEE Computer Society, p. 79–86.
- [BUS 06] BUSKEY E. J., HYATTA C. J., « Use of the FlowCAM for semi-automated recognition and enumeration of red tide cells (*Karenia brevis*) in natural plankton samples. », *Harmful Algae*, vol. 5(6), 2006, p. 685–692.
- [CLO 96] CLOERN J., « Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems : a review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. », *Reviews of Geophysics*, vol. 34, 1996.
- [Dir00] « Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. », *Official Journal of the European Communities EN*, vol. 2000/60/EC, 2000.
- [LEP 04] LEPAGE R., « Reconnaissance d'algues toxiques par vision artificielle et réseau de neurones. », PhD thesis, Université du Québec à Rimouski, 2004.
- [LUN 58] LUND J., KIPLING G., CRENN E. L., « The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimation by counting. », *Hydrobiologia*, vol. 11, 1958, p. 143–170.
- [NIE 05] NIELS R., VUURPIJL L., « Introducing Trigraph - trimodal writer identification », in *Proc. European Network of Forensic Handwr. Experts*, 2005.
- [SAK 78] SAKOE H., CHIBA S., « Dynamic Programming Algorithm Optimization for Spoken Word Recognition », *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, vol. ASSP-26, n° 1, 1978, p. 43–49.
- [SIE 05] SIERACKI M. E., « Automated recognition of phytoplankton morphotypes from FlowCAM images. », *ZooImage, GLOBEC / SPACC workshop on image analysis to count and identify zooplankton*, , novembre 2005.
- [SMA 97] SMAYDA T. J., « Harmful algal blooms : their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. », *Limnol. Oceanogr.*, vol. 42, 1997, p. 1137-1153.
- [TAK 06] TAKABAYASHI M., LEW K., JOHNSON A., MARCHI A., DUGDALE R., WILKERSON F. P., « The effect of nutrient availability and temperature on chain length of the diatom, *Skeletonema costatum*. », *Journal of Plankton Research*, vol. 28(9), 2006, p. 831–840.

Classification de cytogrammes par appariement élastique

Vers la discrimination automatique du phytoplancton marin par cytométrie en flux

Émilie Caillault* — Pierre-Alexandre Hébert* — Natacha Guiselin
— L. Felipe Artigas****

* *Laboratoire d'Analyse des Systèmes du Littoral (LASL),
Université du Littoral Côte d'Opale, 50 rue Ferdinand Buisson, Fr-62228 CALAIS.
Emilie.Caillault ; Pierre-Alexandre.Hebert@lasl.univ-littoral.fr*

** *Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG), UMR CNRS 8187
Université du Littoral Côte d'Opale,
Felipe.Artigas ; Natacha.Guiselin@univ-littoral.fr*

RÉSUMÉ. ...

ABSTRACT. ...

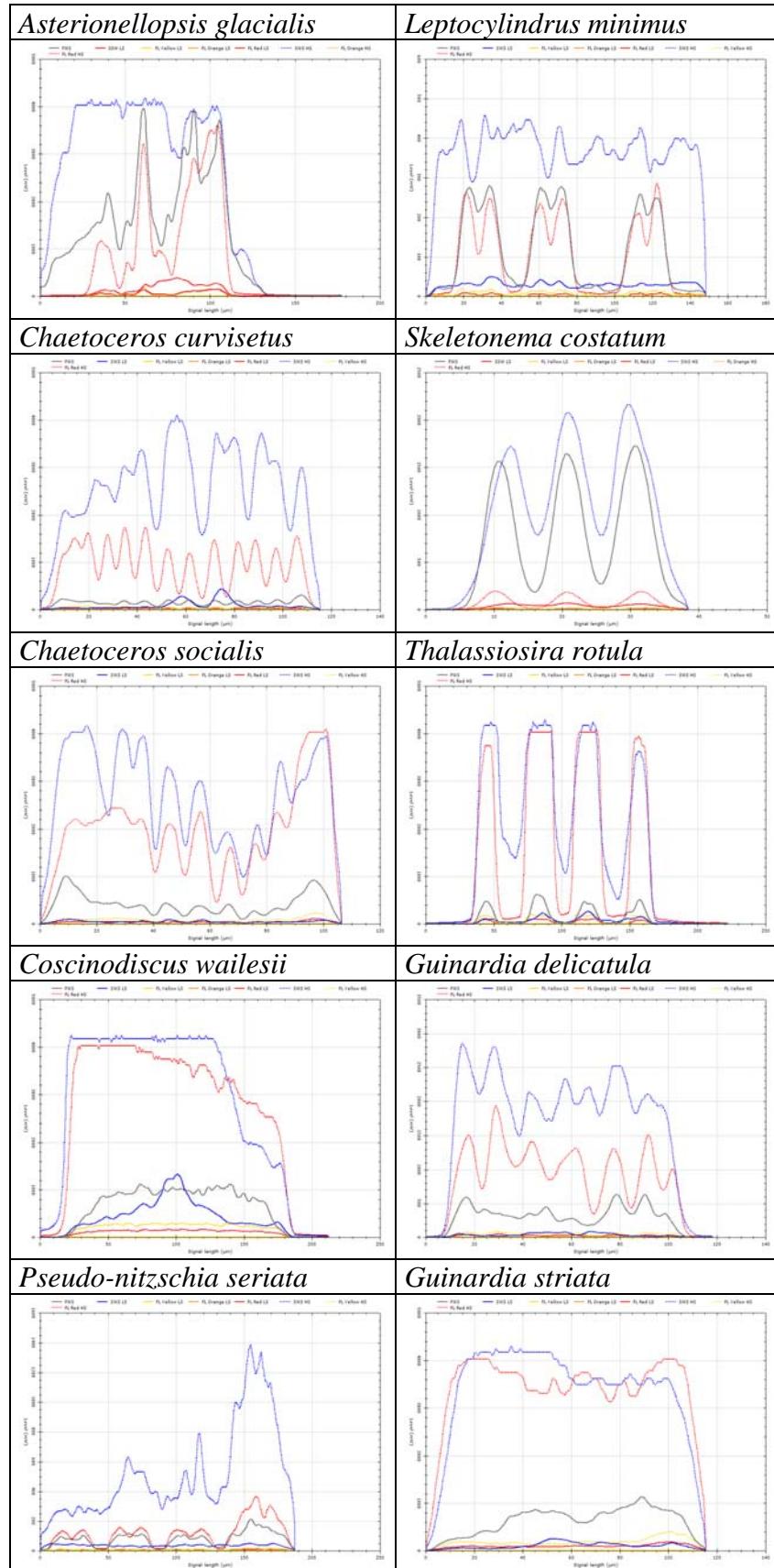
MOTS-CLÉS : ...

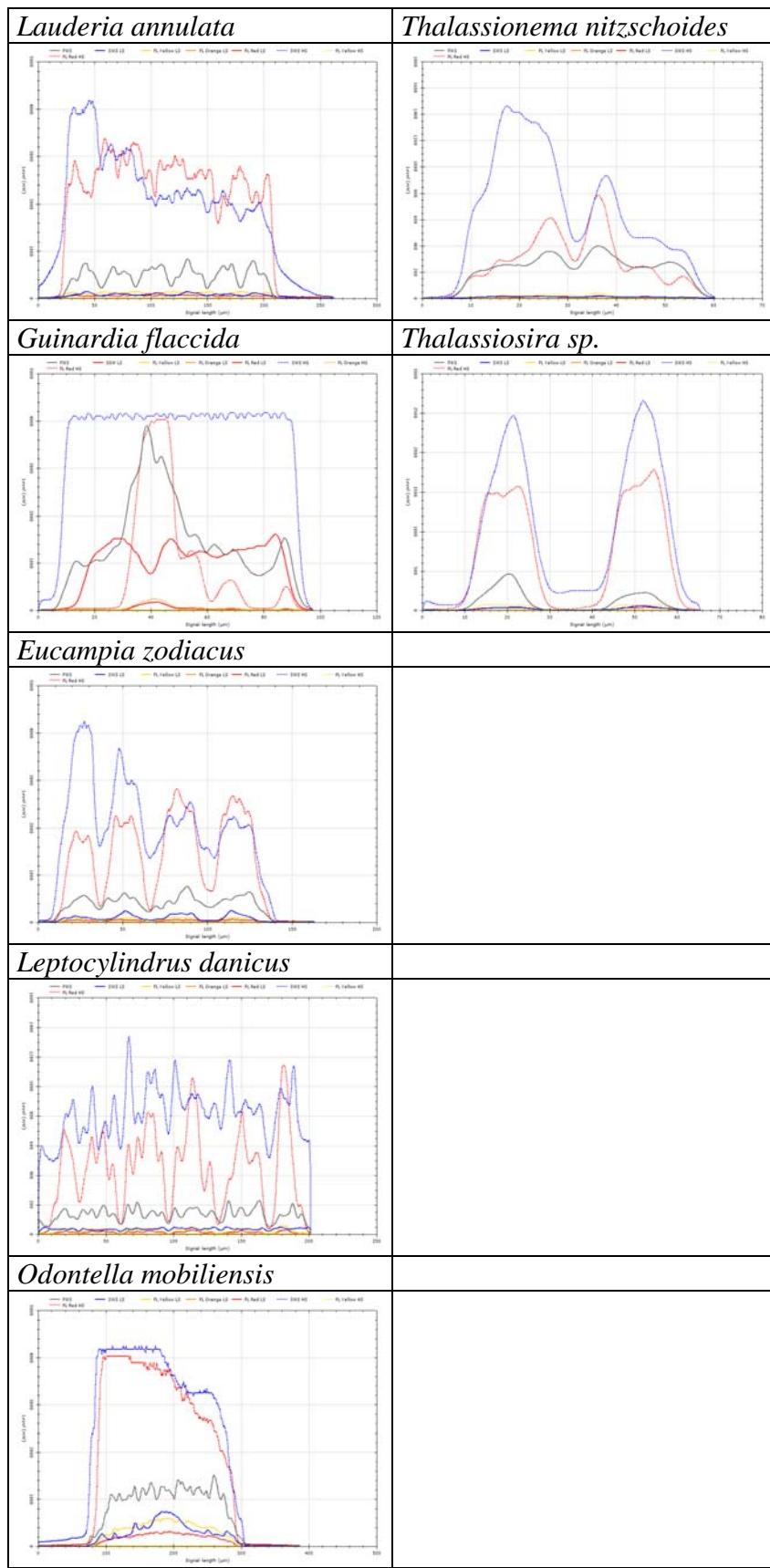
KEYWORDS: ...

HERMÈS SCIENCE PUBLICATIONS
8 Quai du Marché Neuf - 75004 Paris
Tel : 01-53-10-15-20 Télécopie : 01-53-10-15-21
Email : hermes@hermes-science.com
Serveur Web : <http://www.hermes-science.com>

ANNEXE 3

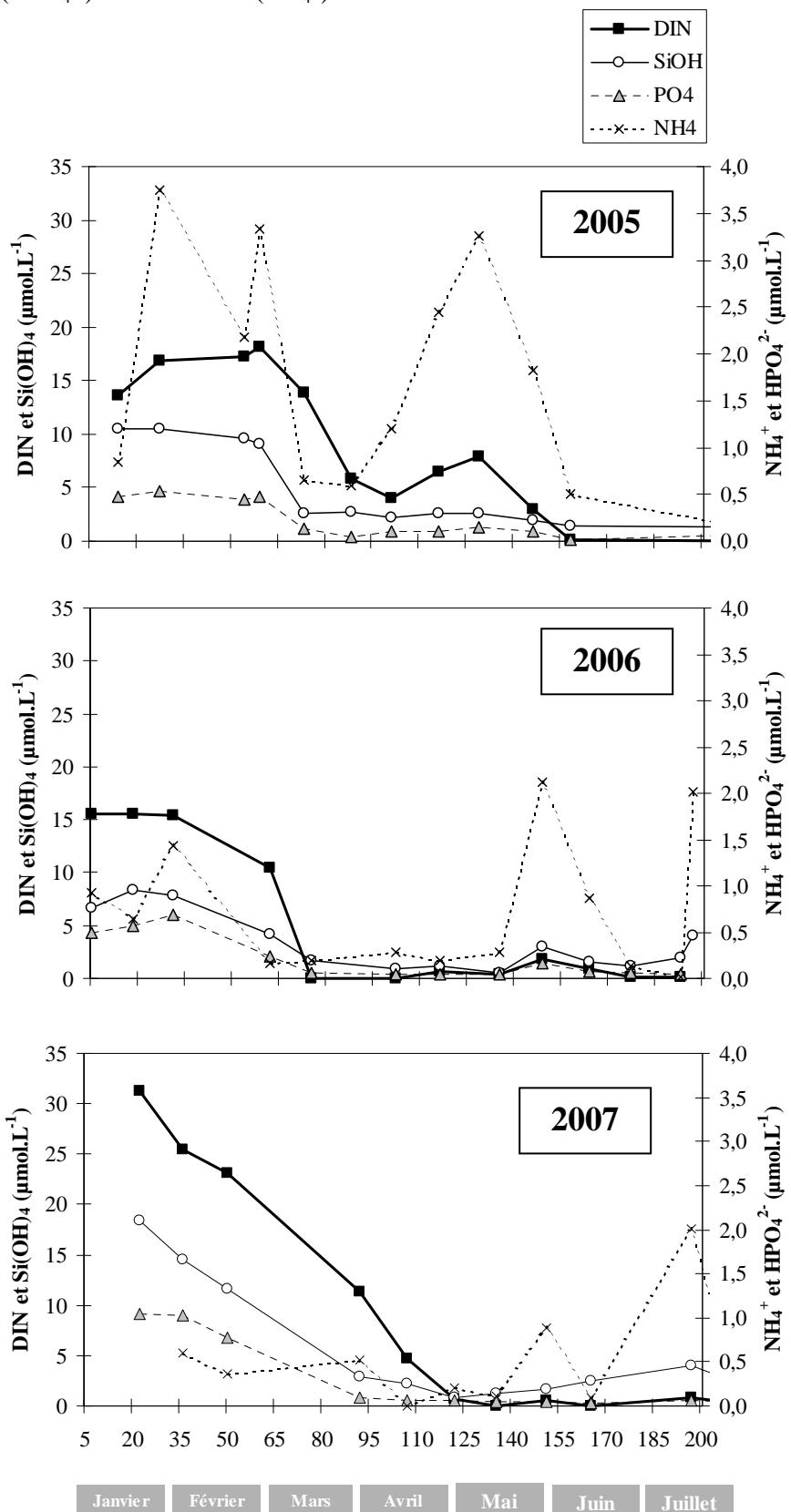
Annexe 3 : Profils cytométriques de cellules isolées et cultivées à partir du milieu.





ANNEXE 4

Annexe 4: Evolution temporelle (janvier-juillet) des concentrations en sels nutritifs ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) à la station côtière de SOMLIT : Nitrate + nitrite (DIN), silicate (Si(OH)_4), phosphate (HPO_4^{2-}) et ammonium (NH_4^+).



RESUME

Les zones côtières contribuent de manière importante à la production primaire des océans. Le compartiment phytoplanctonique y joue un rôle prépondérant de par sa position de producteur primaire à la base des réseaux trophiques, mais également en termes de diversité. Il est capable d'intégrer et/ou de refléter les changements environnementaux qui s'opèrent à court, moyen et long terme. Le but de ce travail a été de caractériser la dynamique phytoplanctonique en eaux côtières, en utilisant une technique traditionnelle (la microscopie) et une technique d'analyse automatisée des propriétés optiques individuelles des cellules (la cytométrie en flux). L'écosystème de la Manche orientale a été choisi comme site atelier et se caractérise par un important hydrodynamisme et la récurrence d'efflorescences massives de *Phaeocystis globosa*. Au cours du travail de thèse, une fréquence d'échantillonnage appropriée à l'échelle d'observation a été utilisée, allant de prélèvements mensuels à des prélèvements journaliers à quatre moments différents du bloom printanier en 2007.

Le premier objectif a consisté en l'étude de la variabilité temporelle des communautés phytoplanctoniques à long (1992-2007) et moyen terme (2005-2007), avec des résolutions temporelles différentes, dans le but d'appréhender leur relation avec les facteurs environnementaux. Une première échelle interannuelle sur le long terme a permis d'appréhender les principaux changements saisonniers ainsi que les tendances majeures de variabilité des espèces les plus représentées, en relation avec les concentrations en sels nutritifs. A une échelle saisonnière sur le moyen terme, la succession et le développement des communautés ont été appréhendés au cours de la période productive printanière. Cette étude a permis de mieux comprendre certains mécanismes régissant les efflorescences algales (blooms), en particulier les facteurs physico-chimiques mais aussi biologiques.

Le second objectif visait à déterminer la structure des communautés au cours de ces différentes échelles. Des assemblages de taxons principaux ont été mis en évidence en fonction de leur occurrence et de leur diversité morphologique visant à définir des groupes fonctionnels. En particulier, les morphotypes de *Phaeocystis globosa* ont été analysés dans ce sens, car la diversité de ses formes de vie conditionne son succès dans le milieu.

L'abondance, la biomasse et la diversité phytoplanctoniques ont été dans un premier temps estimées par microscopie. Cependant, dans le cadre de l'étude à court terme, il s'est avéré utile d'appliquer une méthodologie alternative à la microscopie. La cytométrie en flux est une technique développée pour l'énumération des cellules individuelles, identifiées à partir de l'analyse de leurs propriétés optiques (diffusion et fluorescence). L'analyse des cellules phytoplanctoniques est alors facilitée par l'autofluorescence des pigments photosynthétiques. Nous avons utilisé un cytomètre en flux de « scanning » (CytoSense Benchtop-CytoBuoy[®]) spécialement adapté à la détection et l'énumération des cellules phytoplanctoniques entre 1 et 800µm.

Cette méthode a nécessité une mise au point et a permis d'effectuer des mesures reproductibles de durée inférieure à 10 min. Des groupes d'espèces voire des espèces ou stades de vie ont été identifiés à la fois manuellement et en système semi-automatisé, sur la base de leurs propriétés optiques similaires.

Mots clés : Manche orientale – Phytoplancton – *Phaeocystis globosa* – variabilité temporelle – assemblages d'espèces - Cytométrie en flux