



Étude de la variabilité spatiale et temporelle des communautés phytoplanctoniques en Manche Orientale - Utilisation de la cytométrie en flux de scanning

Simon Bonato

► To cite this version:

Simon Bonato. Étude de la variabilité spatiale et temporelle des communautés phytoplanctoniques en Manche Orientale - Utilisation de la cytométrie en flux de scanning. Ecologie, Environnement. Université du Littoral Côte d'Opale, 2015. Français. $\langle$ NNT : 2015DUNK0379 $\rangle$. $\langle$ tel-01337264 $\rangle$

HAL Id: tel-01337264

<https://theses.hal.science/tel-01337264v1>

Submitted on 24 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement – ED 104

Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences – UMR 8187

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

Discipline : Géosciences, Ecologie, Paléontologie, Océanographie

Présentée par

SIMON BONATO

**Etude de la variabilité spatiale et temporelle des communautés
phytoplanctoniques en Manche Orientale**

Soutenue le 30 Juin 2015

Devant un jury composé de :

Dr. Michel DENIS (DR, CNRS, Institut Méditerranéen d'Océanologie)

Pr. Philippe GROSJEAN (PR, Université de Mons, Belgique)

Dr. Alain LEFEBVRE (CR, IFREMER LER/BL)

Dr. Véronique CREACH (CR, Cefas – Royaume-Uni)

Dr. Fabrice LIZON (MCF, Université de Lille 1)

Pr. Urania CHRISTAKI (PR, ULCO)

Dr. Felipe ARTIGAS (MCF, ULCO)

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Invité

Directrice de thèse

Responsable scientifique

UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement – ED 104

Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences – UMR 8187

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

Discipline : Géosciences, Ecologie, Paléontologie, Océanographie

Présentée par

SIMON BONATO

**Etude de la variabilité spatiale et temporelle des communautés
phytoplanctoniques en Manche Orientale**

Soutenue le 30 Juin 2015

Devant un jury composé de :

Dr. Michel DENIS (DR, CNRS, Institut Méditerranéen d'Océanologie)

Pr. Philippe GROSJEAN (PR, Université de Mons, Belgique)

Dr. Alain LEFEBVRE (CR, IFREMER LER/BL)

Dr. Véronique CREACH (CR, Cefas – Royaume-Uni)

Dr. Fabrice LIZON (MCF, Université de Lille 1)

Pr. Urania CHRISTAKI (PR, ULCO)

Dr. Felipe ARTIGAS (MCF, ULCO)

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Invité

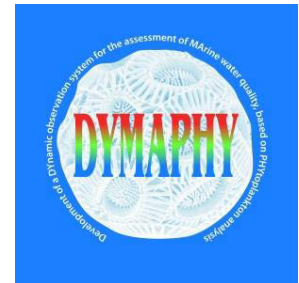
Directrice de thèse

Responsable scientifique

Avant propos

Cette thèse n'aurait pu être réalisée sans l'allocation de recherche qui m'a été octroyée à 50% par le Syndicat Mixte de la Côte d'Opale (SMCO) et à 50% par le projet DYMAPHY, pour une durée de trois ans.

Ce travail s'inscrit dans le programme INTERREG IV A DYMAPHY "2 Mers Seas Zeeën" cofinancé par l'Union Européenne (fonds FEDER).



Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier les différents membres du jury : **Michel Denis** et **Philippe Grosjean** qui ont accepté d'être les deux rapporteurs de ce travail de thèse. Merci aussi à **Véronique Créach** et **Alain Lefèbvre** d'avoir été examinateurs de cette thèse. Et enfin merci à **Fabrice Lizon** de sa présence en tant que membre invité.

Pour m'avoir encadré durant ces 3 ans et demi et fait découvrir les campagnes océanographiques, je remercie mon responsable scientifique **Felipe Artigas**. Pour sa rigueur et ses conseils méthodologiques, je remercie ma directrice de thèse **Urania Christaki**.

Evidemment, je ne peux pas oublier **Elsa Breton**, qui m'a apporté ses idées, son soutien et son expérience, sur les analyses statistiques.

Un grand merci également à tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à cette thèse: **Morgane Didry, Vincent Cornille, Muriel Crouvoisier, Fabrice Lizon, Mélilotus Thyssen, Gérard Grégori**.

Les derniers remerciements, je les dois, sans hésitation possible, à ma famille. A mes parents qui ont accepté de me soutenir financièrement et moralement depuis le début de mes études et sans qui cette aventure n'aurait été possible. A mon Papé parti avant d'avoir vu la finalité de mes travaux et qui m'a appris tout petit, lors de cueillette Cévenole, mes premiers concepts de biologie. Et parce qu'une thèse est ponctuée de différentes émotions, je remercie ma femme Julie, qui a eu un rôle important en acceptant de me suivre dans ces contrées nordiques. Par sa présence elle a su m'apporter soutien, réconfort et donné de nouvelles raisons d'espérer.

A mes deux amours...

Résumé

Le compartiment phytoplanctonique joue un rôle prépondérant dans les écosystèmes marins de par sa position comme principal producteur primaire et fixateur de carbone, mais aussi en raison de sa capacité de multiplication élevée, qui lui permet de réagir rapidement aux changements environnementaux et d'en faire un potentiel bio indicateur. La plupart des études antérieures ne se sont basées que sur des observations réalisées à basse fréquence, ou bien ne ciblant qu'une partie des groupes/espèces phytoplanctoniques entraînant une perte importante d'information sur la variabilité d'abondance et composition du phytoplancton. Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet européen transfrontalier DYMAPHY dont l'objectif principal visait à améliorer les connaissances et l'évaluation de la qualité des eaux marines de la Manche et de la Mer du Nord, à travers l'étude de l'ensemble du compartiment phytoplanctonique et ses paramètres complémentaires.

Dans ce contexte, une approche à haute fréquence et/ou haute résolution spatiale, via l'utilisation de la cytométrie en flux semi-automatisée, a permis de mieux caractériser la variabilité spatiale et temporelle du phytoplancton en Manche Orientale. Pour cela on a utilisé 3 approches complémentaires dont les résultats principaux obtenus lors de ce travail de thèse sont les suivants : (i) Une étude à haute fréquence, avec une analyse cytométrique toutes les 10 minutes, qui a permis de révéler une forte variabilité spatiale du phytoplancton, à une échelle régionale (Manche orientale), dont l'assemblage communautaire n'était pas déterminé par l'hydrologie; (ii) Un suivi saisonnier de l'ensemble du spectre de taille des cellules phytoplanctoniques le long d'un gradient côte-large proche du détroit du Pas de Calais, qui a révélé, au-delà d'une certaine hétérogénéité spatiale, une forte variabilité temporelle permettant de définir les successions saisonnières et les principaux facteurs les régissant, à savoir la luminosité et la concentration en sels nutritifs; (iii) Un suivi de 3 ans sur un point fixe en eaux côtières, qui a permis de mettre en relation les traits de vie des groupes phytoplanctoniques avec l'environnement, afin de comprendre comment les communautés phytoplanctoniques s'assemblent en réponse à la variabilité environnementale. Les résultats ont montré une différenciation fonctionnelle liée à l'utilisation des ressources et des stratégies de croissance, associées à un gradient de ressources. Cette étude confirme notamment l'importance de « l'hypothèse du ratio de masse », qui prédit que les traits de vie de l'espèce la plus abondante au sein d'une communauté, seraient le moteur des processus les plus importants au sein d'un écosystème.

Abstract

Phytoplankton micro-organisms play a key role in marine ecosystems as main primary producers, being responsible for most of carbon uptake, but also due to their fast division rates which allow them to effectively react to environmental changes and which make them potentially good bio-indicators. Most previous studies have based their observations on low frequency sampling, only considering one fraction of phytoplankton communities, resulting in a significant loss of information on the dynamics of phytoplankton abundance and diversity. This thesis was carried out in the frame of the European cross-border DYMAPHY project, which main objective was to improve the understanding and the evaluation of the quality of marine waters in the English Channel and the North Sea, through the study of the whole phytoplankton compartment and related environmental parameters.

A high frequency and/or high resolution approach, through the use of semi-automated flow cytometry, allowed us to reduce this loss of information and to better characterize the phytoplankton spatial and temporal variability in coastal waters of the eastern English Channel. Three approaches were applied, leading to the following results: (i) A high frequency study, performing one analysis every 10 minutes, which revealed a strong phytoplankton variability at the regional scale, with community assemblages that were not governed by hydrology; (ii) A seasonal monitoring of the whole phytoplankton size-spectrum, which revealed the seasonal successions and the main factors governing them: nutrient concentrations and the daily light level which structured the transition of most phytoplankton groups; (iii) A three-year follow-up at a coastal station, which made it possible to relate the traits-based characterization of each functional phytoplankton group to the environmental conditions, in order to better understand phytoplankton community assembly in response to environmental variability. The results have revealed a functional differentiation mainly due to the use of resources and the growth strategies, both of them driven by a resource gradient. This study confirms the importance of the "mass ratio hypothesis", which predicts that the dominant life traits of the most abundant species, would be the main driver of the key ecosystem processes.

Sommaire

Chapitre I : Introduction générale.....	1
Chapitre II : Matériels et Méthodes.....	23
Chapitre III-1 : Etude du phytoplancton marin à haute fréquence temporelle et haute résolution spatiale en Manche Orientale.....	47
Chapitre III-2 : Intercomparaison de techniques d'analyse du phytoplancton marin (Campagne DYPHYMA).....	61
Chapitre IV : Suivi saisonnier du phytoplancton sur une radiale côte-large en Manche Orientale.....	77
Chapitre V : Relation entre les traits fonctionnels et la structuration temporelle du phytoplancton des eaux côtières de la Manche Orientale.....	109
Chapitre VI : Discussion et perspectives.....	149
Références.....	165
Annexes.....	180

Chapitre I :

Introduction générale

I. Océan et changement global

Depuis le début de l'ère industrielle, les activités humaines ont modifié les équilibres planétaires, en faisant passer les teneurs en dioxyde de carbone (CO_2) atmosphérique de 280 ppm (particules par million) à plus de 400 ppm en 2014 (Figure 1). L'augmentation des concentrations en CO_2 atmosphérique a notamment un effet direct sur l'augmentation de température à l'échelle globale. Les modèles climatiques actuels prévoient pour la fin du 21^{ème} siècle une augmentation de la température de $0,3^\circ\text{C}$ pour les modèles les plus optimistes à $4,8^\circ\text{C}$ pour les plus pessimistes (IPCC, 2013).

Au niveau océanique, l'augmentation de CO_2 atmosphérique engendrera une nette acidification des océans avec un impact négatifs sur les organismes marins calcifiés. Outre une élévation du niveau des mers, une augmentation de la température dans les 100 premiers mètres de la surface océanique jusqu'à 2°C et $0,6^\circ\text{C}$ à 1000 m (selon le modèle RPC 8,5) pourrait contribuer à la diminution de l'épaisseur de la couche de mélange, surtout dans les hautes latitudes, et ainsi entraîner une diminution de la production primaire océanique (IPCC, 2013).

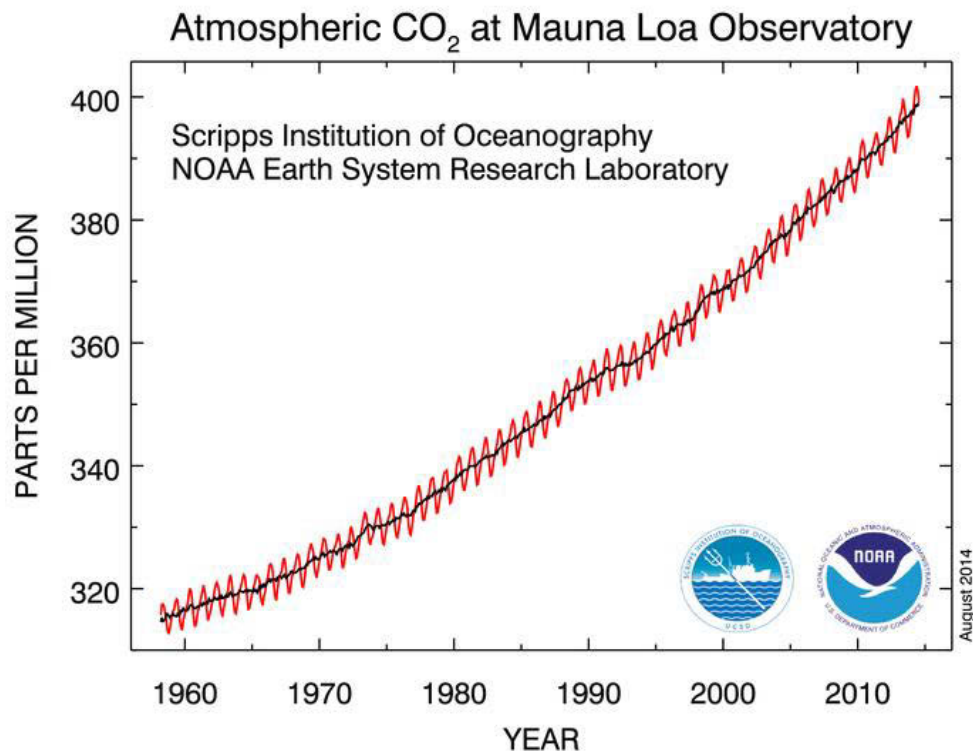


Figure 1. Evolution des teneurs en CO₂ atmosphérique (courbe rouge), mesurée à la station d'observation atmosphérique de Charles D. Keeling sur les pentes du Mauna Loa (Hawaii). La courbe noire correspond aux données corrigées par la saisonnalité (www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/)

Dans ce contexte actuel de réchauffement climatique et de changement global, l'étude des gaz à effet de serre reliés à la modification de la composition chimique de l'atmosphère et à l'évolution climatique à moyen et à long terme est devenue essentielle. Il est d'ores et déjà reconnu que l'océan joue un rôle dans la fixation du CO₂ atmosphérique minimisant ainsi l'augmentation de température qui lui est imputée (Sarmiento et Sundquist, 1992). L'océan recouvre plus de 70 % de la surface de la Terre et avec un volume de 1 milliard 370 millions de km³ il constitue le plus vaste milieu de vie de la planète. La production primaire se concentre dans la couche euphotique dont la limite inférieure est définie par la profondeur à laquelle parvient 1 % de l'intensité lumineuse de surface. Face aux 3800 m de profondeur moyenne de l'océan, la couche euphotique apparaît aussi épaisse qu'une feuille de papier puisqu'elle varie de quelques mètres à 150 m en fonction de la turbidité des eaux. La couche euphotique est pourtant le siège de la majeure partie de la production primaire océanique issue du processus de photosynthèse.

II. Le phytoplancton marin

1. Production primaire océanique

La quantité de CO₂ atmosphérique est régulée par deux pompes: i) la pompe physique dont le fonctionnement résulte de l'équilibre thermodynamique du CO₂ à l'interface air-mer et est étroitement liée à la circulation thermohaline ii) la pompe biologique *sensu stricto*, processus par lequel le CO₂ dissous à la surface de l'océan est transformé en carbone organique particulaire ou dissous par le biais de la photosynthèse (Figure 2). La pompe biologique joue un rôle important dans la régulation du climat via la fixation par les organismes autotrophes du carbone inorganique dans les eaux de surface, sa transformation en carbone organique particulaire ou dissous, puis son transport de la couche euphotique vers les eaux profondes. Bien que les flux de carbone mis en jeu dans la pompe biologique soient nettement inférieurs à ceux de la pompe physique, cette dernière étant en équilibre, la pompe biologique est donc le mécanisme responsable de l'incorporation du CO₂ atmosphérique dans les sédiments profonds, et donc de la séquestration du carbone (Quéguiner, 2013). La quantification du flux de carbone (Gt C) attribuable à la production primaire phytoplanctonique est donc nécessaire

à la compréhension de la variabilité du climat à long terme et de son influence sur le vivant. La production primaire des océans représente 45 % de la production primaire annuelle terrestre (Longhurst *et al.*, 1995) alors que les producteurs primaires des océans ne représentent qu'approximativement 2 % de la biomasse photosynthétique terrestre. La forte productivité observée en milieu océanique est liée à la rapidité du cycle de vie des microorganismes photosynthétiques. En effet, les principaux producteurs primaires des océans sont des organismes unicellulaires qui peuvent dans des conditions favorables, plus que doubler de biomasse chaque jour (Furnas, 1991).

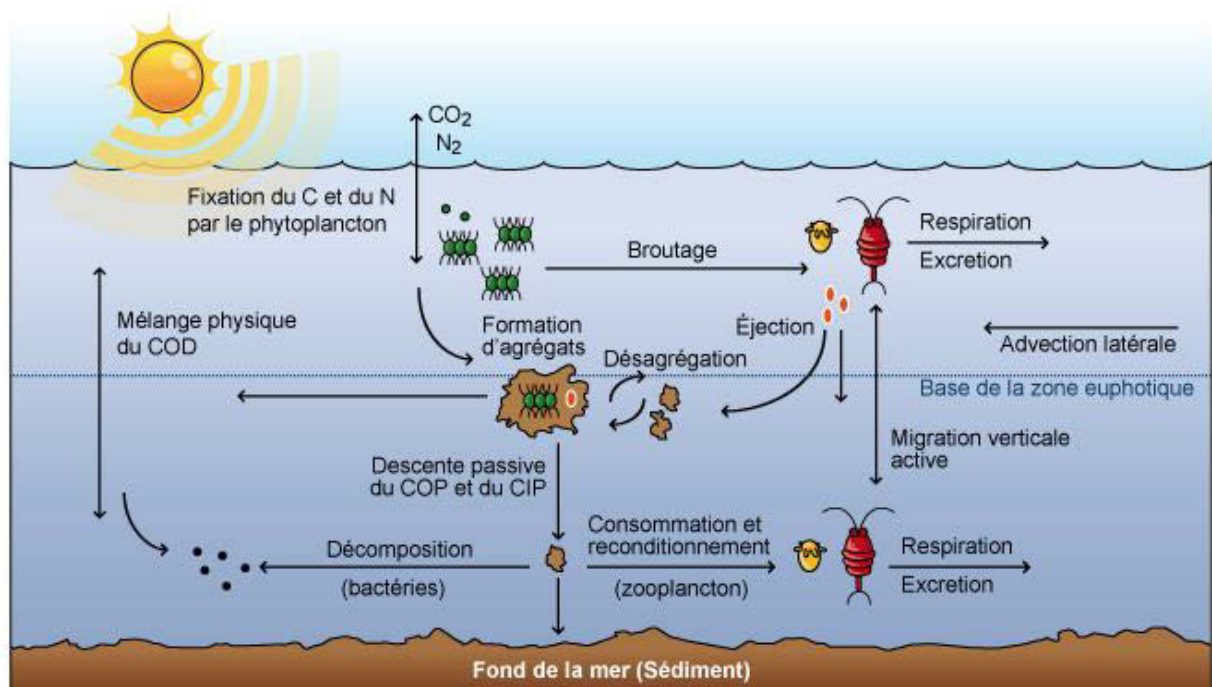


Figure 2. Schéma de la pompe biologique décrivant la fixation du dioxyde de carbone (CO_2) atmosphérique par le phytoplancton (De La Rocha, 2006)

La production primaire nette est d'environ 50 Gt.C.an^{-1} (Longhurst *et al.*, 1995) pour l'océan mondial. La majorité de cette production se réalise dans l'océan ouvert, lequel bien qu'il soit en général oligotrophe compense par sa large couverture spatiale (3.10^8 km^2) et l'étendue de sa couche euphotique. Les zones côtières qui ne représentent que 8 % de la surface océanique (Alongi, 1998) présentent les taux de production primaire océanique les plus élevés. Selon la

localisation géographique cette production est très variable, allant de $160 \text{ (g C m}^{-2} \text{ an}^{-1})$ dans le golfe de San José en Argentine (Charpy-Roubaud *et al.*, 1982) à $465 \text{ (g C m}^{-2} \text{ an}^{-1})$ à Puget Sound aux Etats-Unis (Winter *et al.*, 1975). Cette production est principalement influencée par l'importance des flux nutritifs, la turbidité et le temps de séjour des eaux marines.

Au cours du processus de photosynthèse, le phytoplancton consomme une grande quantité de carbone inorganique dissous et de sels nutritifs (principalement les nitrates, les phosphates et les silicates), suivant les proportions stœchiométriques observées par Redfield (106 C: 16 N: 1 P; (Redfield, 1963)). On considère que le carbone n'est pas un facteur limitant de la production primaire et que celle-ci est dépendante outre de la lumière, de la disponibilité en nutriments. La fertilisation de la couche superficielle des océans par les sels nutritifs s'effectue soit grâce aux courants et à la turbulence, qui font remonter les eaux profondes riches en nutriments, soit par les apports éoliens. En océan ouvert, ces apports sont faibles et le confinement de la matière organique dans la couche euphotique est principalement dû à la boucle microbienne (Azam *et al.*, 1983) qui effectue un recyclage continu des nutriments (production régénérée). En zone côtière, le fort taux de production primaire est lié à la proximité avec les continents et donc aux apports d'eaux continentales et océaniques chargées en sels nutritifs (N, Si, P). Ces sels nutritifs sont, de par le fort hydrodynamisme associé à la faible profondeur des zones côtières, remis en suspension dans la colonne d'eau (pour ce qui est du particulaire) ou bien apportés des couches plus profondes par advection pour le dissous, favorisant ainsi la production primaire (Eyre, 1994 ; Schapira *et al.*, 2006).

2. Réseau trophique et efficacité de la pompe biologique

Le phytoplancton peut se décomposer en différentes fractions de tailles (Figure 3) i) le picoplancton ($0,2\text{-}2\mu\text{m}$) consommé majoritairement par des nanoflagellés et des petits ciliés ii) le nanoplancton ($2\text{-}20\mu\text{m}$) consommé par des ciliés et des dinoflagellés et iii) le microphytoplancton ($20\text{-}200\mu\text{m}$) consommé en majorité par des organismes micro- et mésozooplanctoniques comme par exemple les dinoflagellés et les copépodes. Les variations de l'abondance et de la structure de taille phytoplanctoniques du milieu marin ont donc un impact sur l'ensemble du réseau trophique marin et sur la quantité de carbone exporté.

Ainsi, une communauté phytoplanctonique composée majoritairement de grandes cellules, induira une chaîne trophique courte avec un relargage de matière organique dissoute plus faible (hormis lors d'efflorescences massives) et un transfert élevé de carbone organique vers les échelons trophiques supérieurs (grande efficacité de la pompe biologique). Au contraire lorsque le réseau trophique est dominé par du phytoplancton de petite taille, on s'attend à un plus grand nombre de transferts trophiques. A chacun de ces transferts trophiques, la matière organique produite par l'excrétion du phytoplancton et l'activité du zooplancton qui le consomme ('sloppy feeding', excrétion, pelotes fécales), sera minéralisable par les bactéries hétérotrophes (Fenchel, 1988) permettant la production primaire régénérée. Les bactéries hétérotrophes seront ensuite consommées par les niveaux trophiques supérieurs (Fenchel, 1982 ; Caron *et al.*, 1985 ; Rassoulzadegan et Sheldon, 1986 ; Azam *et al.*, 1993).

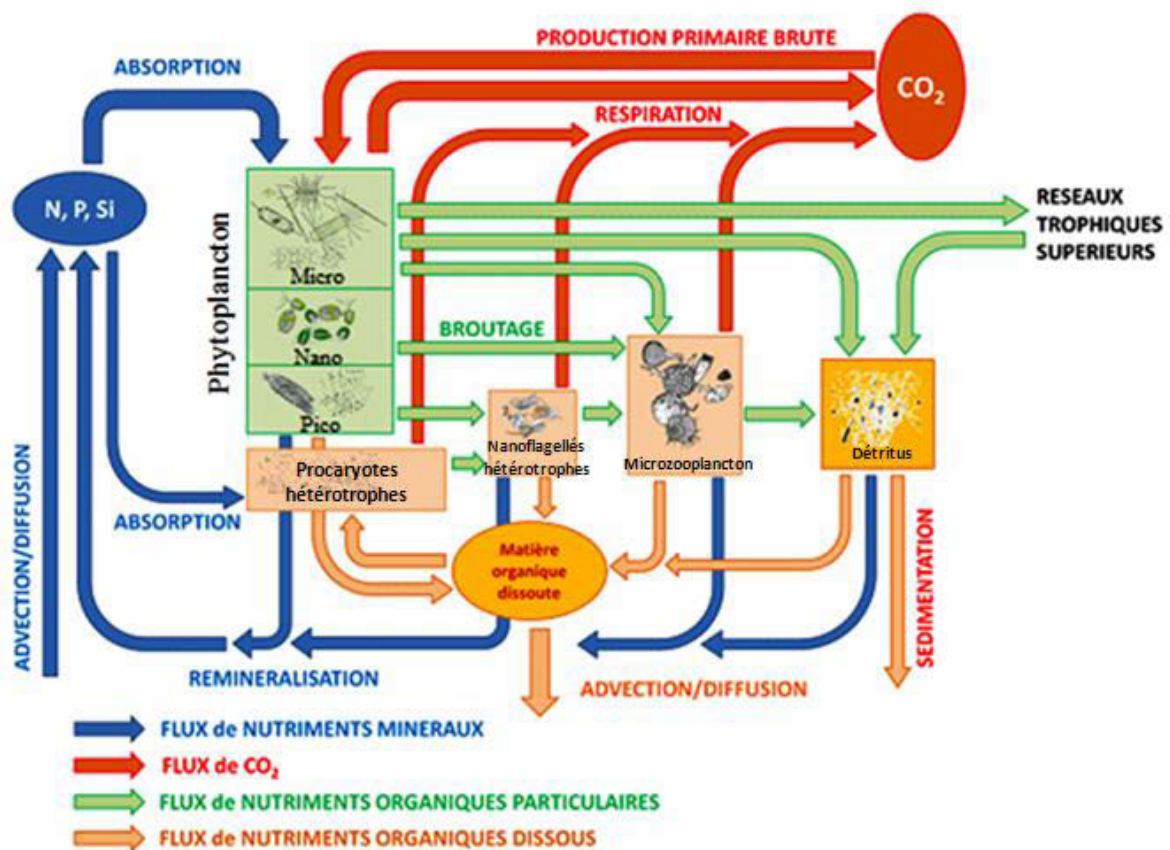


Figure 3. Schéma du réseau trophique microbien et de sa relation avec le réseau trophique supérieur (www.mio.univ-amu.fr/?-Equipe-4-CYBELE-CYcles-)

3. Diversité phytoplanctonique

Du grec *phyton* qui signifie plante et *planktos* pour errant, le phytoplancton regroupe des eucaryotes et des procaryotes dont la capacité de déplacement est soumise au forçage de la colonne d'eau. La diversité spécifique du phytoplancton, dont la taille varie de $\sim 0,6 \mu\text{m}$ pour les plus petits prochlorophytes jusqu'à plusieurs millimètres pour les plus grosses diatomées et les formes coloniales, est très importante et le nombre d'espèces reste encore sujet à débat ; 5 000 espèces pour Tett et Barton (1995), 10 000 pour Guiry (2012) et même 10 000 juste pour les diatomées (Sournia, 1995). Ce nombre devrait encore évoluer dans les années à venir avec l'avancée des techniques d'analyse par séquençage. La morphologie des cellules phytoplanctoniques est aussi très diversifiée, certaines espèces sont capables de former des colonies et/ou de modifier leur morphologie en fonction de la variation du milieu environnant (hétérocystes, kystes, vacuoles gazeuses).

La classification des organismes phytoplanctoniques se fait souvent en groupes fonctionnels qui peuvent être indépendants de leur classification phylogénétique. En écologie, le terme de groupe fonctionnel correspond à un ensemble d'individus répondant de la même manière à une contrainte environnementale donnée ou ayant le même effet sur un processus environnemental (Gitay *et al.*, 1999). La définition de groupes fonctionnels de plusieurs espèces peut se faire sur la base de nombreux critères pouvant être liés à la position trophique et aux traits métaboliques, ou de manière plus simple mais pour le moins aussi importante sur la taille et la forme des cellules ainsi que sur la diversité pigmentaire. Sieburth *et al.* (1978) ont proposé une division en différentes fractions de taille des organismes planctoniques qui est encore d'usage aujourd'hui (Tableau 1). Ce caractère fait partie des plus simples et des plus importants à observer afin de décrire le réseau trophique (voir II. 2) ainsi que la répartition et l'évolution temporelle de la biomasse. Dans ce manuscrit, la classification de Sieburth *et al.* (1978) sera adoptée pour une partie des groupes phytoplanctoniques discriminés par cytométrie en flux. Une classification sur la base du contenu pigmentaire sera également possible à partir de ces mesures ainsi que par chromatographie liquide à haute performance.

classes de taille	FEMTO- PLANCTON < 0,2 μm	PICO- PLANCTON 0,2 - 2,0 μm	NANO- PLANCTON 2,0 - 20 μm	MICRO- PLANCTON 20 - 200 μm	MESO- PLANCTON 0,2 - 20 mm	MACRO- PLANCTON 2 - 20 cm	MEGA- PLANCTON 20 - 200 cm	
com- partiment						NECTON 2 - 20 cm	NECTON 2 - 20 dm	NECTON 2 - 20 m
VIRO- PLANCTON								
BACTERIO- PLANCTON								
PHYTO- PLANCTON								
PROTOZO- PLANCTON								
METAZOO- PLANCTON								
NECTON								

Tableau 1. Classes de taille des organismes planctoniques (encadré en rouge les différentes classes du phytoplancton, d'après Sieburth *et al.*, 1978)

4. Les traits fonctionnels du phytoplancton

Les groupes fonctionnels sont composés d'espèces qui peuvent avoir des caractéristiques physiologiques et/ou morphologiques similaires. Ces caractéristiques déterminent leur interaction avec les contraintes environnementales et contribuent ainsi à l'occurrence ou l'absence d'une espèce donnée : elles sont alors qualifiées de traits fonctionnels (Violle *et al.*, 2007). Les traits fonctionnels influencent le succès reproducteur d'une espèce via leurs effets sur la croissance, la survie, la reproduction (Violle *et al.*, 2007) et sont classés selon deux types : les traits physiologiques et les traits morpho-fonctionnels. Il a été avancé que mettre l'accent sur les traits fonctionnels des espèces pourrait contribuer à l'amélioration de la compréhension des relations entre les facteurs environnementaux et la structuration des communautés phytoplanctoniques (McGill *et al.*, 2006). A l'échelle d'un écosystème, un trait fonctionnel est une caractéristique d'un organisme qui constitue une réponse à un ou plusieurs facteurs environnementaux (trait de réponse) ou qui affecte le fonctionnement de l'écosystème (trait d'effet). Lavorel et Garnier (2002) vont jusqu'à utiliser, d'une part des traits de réponse pour quantifier l'impact de l'environnement sur la composition des communautés, et d'autre part des traits d'effet pour quantifier l'influence des communautés sur les propriétés écosystémiques. Il serait ainsi possible, à partir de l'étude de la physiologie et de la morphologie des espèces, d'expliquer les distributions et associations communautaires et de comprendre le fonctionnement des écosystèmes (Diaz *et al.*, 2004) comme les flux de matière et d'énergie.

Les principaux traits physiologiques sont liés à la croissance et à l'efficacité de la photosynthèse par l'intermédiaire de la fixation du carbone et l'absorption des nutriments. Les traits physiologiques liés à l'efficacité de la photosynthèse sont fondamentaux pour expliquer la structure de la communauté de phytoplancton (Richardson *et al.*, 1983) et sont déterminés à partir de la relation entre le taux de photosynthèse et l'intensité lumineuse modélisée par des courbes de PE (photosynthèse-énergie) (Figure 4). Les valeurs que prennent ces traits sont variables en fonction des espèces. Il s'agit de l'efficacité photosynthétique (α , pente à l'origine), du taux maximal de la photosynthèse ($P_{\max}$) et du coefficient de saturation lumineuse (E_k), indice utilisé pour caractériser le niveau de photoacclimatation, qui se calcule par le rapport $P_{\max}/\alpha$. Les autres traits physiologiques sont liés à l'absorption des nutriments et au taux de croissance. On distingue ainsi plusieurs paramètres quantifiables comme la constante de demi-saturation, le taux d'acquisition maximal ou bien encore le taux de croissance maximum.

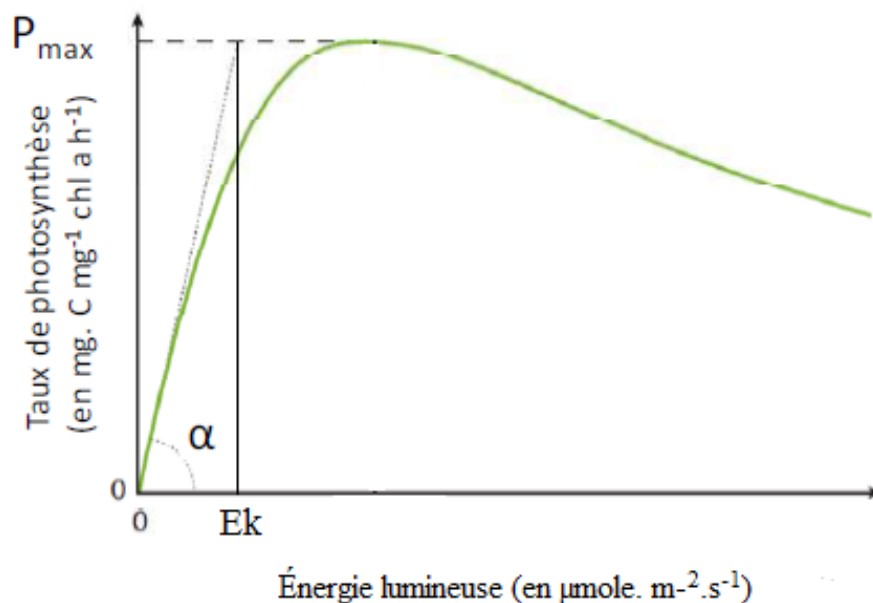


Figure 4. Courbe P-E représentant la relation entre le taux de photosynthèse et l'intensité lumineuse et où apparaissent les différents traits physiologiques reliés à l'efficacité de la photosynthèse α , $P_{\max}$, et E_k (d'après Litchman et Klausmeier, 2008)

Contrairement aux traits physiologiques, issus majoritairement d'expériences réalisées en culture, les traits morpho-fonctionnels sont facilement mesurables. Cependant les mêmes traits morpho-fonctionnels peuvent être observés chez les différents groupes taxonomiques. Ainsi, les approches fondées exclusivement sur la taxonomie peuvent s'avérer moins efficaces que celles basées sur les traits morpho-fonctionnels, pour expliquer la structure de la communauté de phytoplancton en réponse aux stress et changements environnementaux (Kruk *et al.*, 2010). La taille des cellules et la présence de flagelles peuvent être considérées comme des traits morpho-fonctionnels importants à étudier. La taille cellulaire peut constituer un proxy des traits physiologiques liés à l'acquisition des nutriments, (Kruk *et al.*, 2010 ; Edwards *et al.*, 2012) et la présence de flagelles pourrait permettre aux espèces d'exploiter des zones où les nutriments seraient plus concentrés.

Margalef (1978), est l'un des premiers à utiliser les traits morpho-fonctionnels pour expliquer la structure de la communauté phytoplanctonique ainsi que les successions saisonnières. Quelques années plus tard, Reynolds (1980, 1984) propose une classification fonctionnelle dans les eaux douces, qui comprend les espèces qui coexistent dans les mêmes contraintes environnementales, complétée en 2002, par leurs traits morpho-fonctionnels (Reynolds *et al.*, 2002). Des approches similaires ont par la suite été développées en océanographie (Litchman *et al.*, 2007 ; Edwards *et al.*, 2013). Mais l'acquisition de données restant toujours difficile, la plupart des études se basent sur des valeurs de traits obtenues lors d'expériences de laboratoire (Edwards *et al.*, 2011 ; Edwards *et al.*, 2013).

5. Dynamique spatio-temporelle du phytoplancton

Le phytoplancton, grâce à un temps de génération très court, peut s'adapter très rapidement au changement de conditions environnementales. Ainsi, lorsque la concentration en sels nutritifs et la luminosité sont optimales, c'est-à-dire essentiellement au printemps et en automne (dans les latitudes tempérées), les cellules phytoplanctoniques peuvent se développer de manière très rapide et en grande quantité, on parle d'efflorescence algale (bloom). Ce développement de cellules est à l'origine notamment d'un épuisement des sels nutritifs et de l'augmentation de matière organique dissoute et particulaire. En milieu côtier, l'activité anthropique et les apports fluviaux continentaux engendrent des déversements élevés en nutriments face auxquels le phytoplancton réagit par des excès d'abondance pouvant provoquer dans certaines

conditions une anoxie de la colonne d'eau et aboutir à une mortalité massive de poissons (Havens, 2008). Par ailleurs, la production de toxines par certaines espèces phytoplanctoniques a également un impact majeur sur le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. En effet, celles-ci peuvent s'accumuler dans les organismes des niveaux trophiques supérieurs (Sotton *et al.*, 2012) et avoir un effet délétère sur la reproduction et la survie de ces espèces causant des dégâts dans les pêcheries ou les industries aquacoles de bivalves (Thébaud *et al.*, 2005) mais aussi être à l'origine de problèmes de santé publique (Zingone et Enevoldsen, 2000). Il est par conséquent nécessaire d'observer et comprendre la dynamique de ces populations à la vue du nombre d'activités qui se développent en zone côtière.

Parmi les contraintes agissant sur le phytoplancton, on distingue les facteurs ascendants ou *bottom-up* des facteurs descendants ou *top-down*. Les premiers limitent la production de biomasse comme l'intensité lumineuse, les concentrations en nutriments, l'intensité de mélange de la colonne d'eau et la température. Les seconds agissent comme des supprimeurs de biomasse et englobent la prédation et le parasitisme par les protozoaires, les bactéries et les virus (Tilman *et al.*, 1982 ; Sommer *et al.*, 2012 ; Raven *et al.*, 2005). Certains de ces facteurs peuvent avoir une influence indirecte sur le phytoplancton comme c'est le cas par exemple de la turbulence qui peut augmenter l'effet de la prédation (Rothschild et Osborn, 1988) ou qui peut induire des mouvements verticaux et redistribuer les cellules phytoplanctoniques et les sels nutritifs. Cela est particulièrement vrai au niveau des zones côtières où l'hydrodynamisme est complexifié par les courants, les apports continentaux et les variations bathymétriques liées à la marée qui stratifient ou tendent à mélanger la colonne d'eau.

Toutes ces contraintes environnementales et leurs variations vont ainsi définir la structure de la communauté. Ces différents forçages physiques ou biologiques peuvent s'exprimer à différentes échelles spatiales et temporelles (Figure 5). En fonction de l'échelle spatio-temporelle d'observation du phytoplancton, l'intensité des facteurs définissant la distribution du phytoplancton devra plus ou moins être prise en compte. Par exemple, des observations à méso-échelle (10-100 km) ne devront pas tenir compte de la composante journalière, mais plutôt hebdomadaire, car la variation qu'elle engendrera n'aura que très peu d'impact sur le signal méso-échelle.

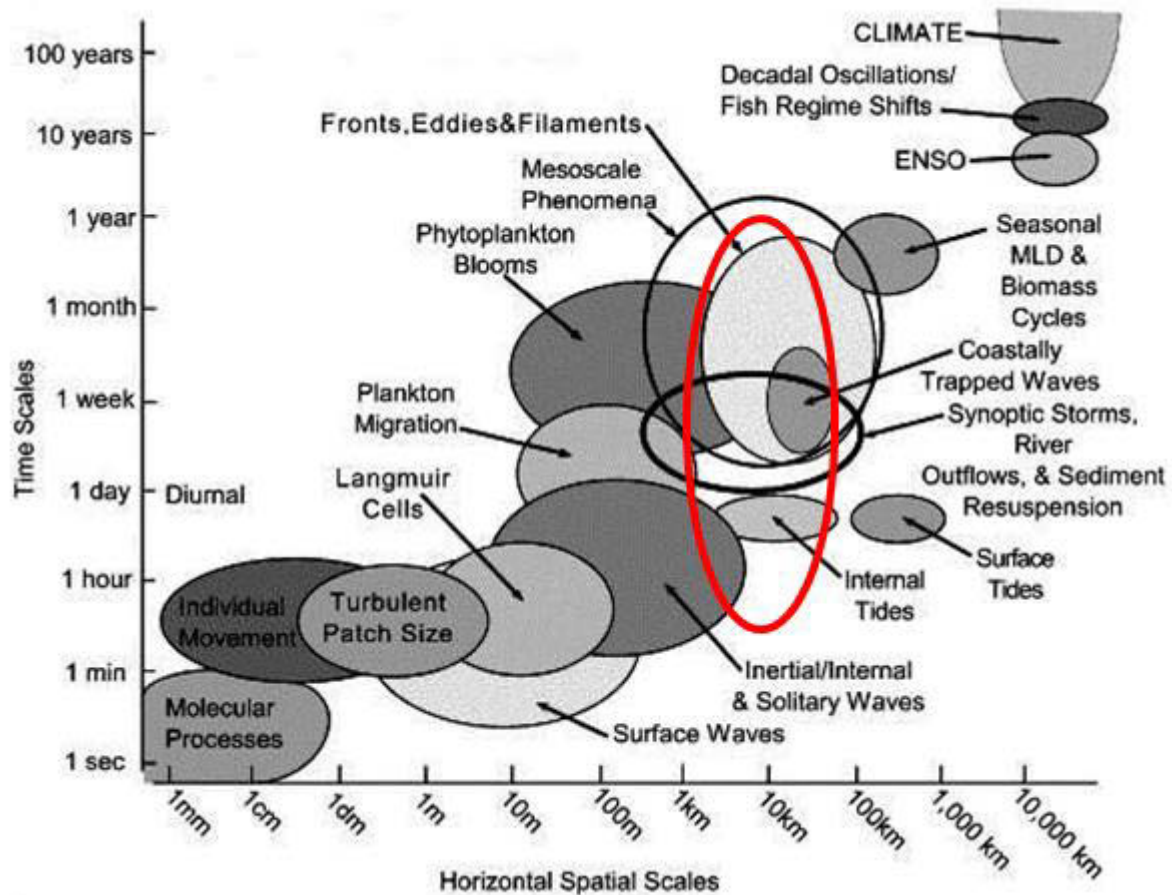


Figure 5. Echelle spatio-temporelle caractéristique des processus physiques et biologiques marins (d'après Dickey *et al.*, 2003). Le cercle rouge correspond aux échelles spatio-temporelles auxquelles ont été analysés les échantillons phytoplanctoniques durant ce travail de thèse

Suivant les espèces et les conditions environnementales, les cellules phytoplanctoniques, comme les diatomées (Furnas, 1991), le picophytoplancton (Vaulot *et al.*, 1995 ; Furnas et Crosbie, 1999), *Phaeocystis* (Jacobsen et Veldhuis, 2005), vont être capables de se diviser jusqu'à plusieurs fois dans une journée et répondre ainsi rapidement aux changements environnementaux (Cloern, 2001). L'observation du cycle cellulaire a déjà été réalisée par cytométrie, via la duplication de l'ADN (Vaulot, 1994), les paramètres optiques cellulaires (Jacquet *et al.*, 2002), ainsi qu'avec des cytomètres *in situ* (Thyssen, 2008). La croissance cellulaire reste tout de même difficilement observable en milieu naturel à cause de la diversité des facteurs de mortalité, de déplacement, et des méthodes d'observation, qui ne permettent pas d'échantillonner à une fréquence assez élevée pour rendre compte de la division cellulaire.

La distribution spatiale du phytoplancton est hétérogène et la description de ces assemblages dépend de l'échelle d'observation. L'hétérogénéité de la distribution spatiale du phytoplancton à l'échelle du mètre peut être identique à la variation observée à l'échelle de la colonne d'eau (Cassie, 1963 ; Seymour *et al.*, 2000) alors que l'hétérogénéité temporelle de l'abondance du phytoplancton à l'échelle de la journée peut être égale à celle observée à l'échelle des saisons (Harris, 1980 ; Houliez, 2012). Actuellement, la plupart des mesures spatiales à haute résolution du phytoplancton se basent sur des estimations de la concentration en chlorophylle *a*, que ce soit par fluorimétrie à haute fréquence pour la micro-échelle ou par image satellite pour la méso- et macro-échelle synoptique. Or ces techniques ne rendent pas compte de la distribution spatiale de la diversité phytoplanctonique.

III. L'observation du phytoplancton

La grande complexité des assemblages phytoplanctoniques est liée à une très importante diversité phylogénétique ainsi qu'à une forte variabilité de taille (de 0,2 μm à quelques mm), d'abondance (de 0 à plusieurs milliers de cellules par cm^{-3}) et de physiologie cellulaire. De ce fait il est d'ores et déjà reconnu qu'aucune technique d'analyse ne répond de façon exhaustive à l'observation du phytoplancton (Smayda, 1998). Chaque méthode possède sa valeur ajoutée mais aussi ses inconvénients.

Mise en place dans les années 1930, la microscopie inversée permet une reconnaissance et une quantification en détail des organismes microphytoplanctoniques (Utermöhl, 1931). Les techniques microscopiques restent les références pour l'analyse taxonomique des cellules phytoplanctoniques, le calcul de l'abondance et le calcul des biovolumes cellulaires (transformables en biomasse via des facteurs de conversion propres à la taille et/ou l'espèce). Elles présentent cependant des inconvénients, i/ elles sont chronophages et ne peuvent fournir une analyse à haute fréquence, ii/ elles demandent un haut degré de connaissance taxonomique avec pour conséquence une orientation des résultats en fonction de la compétence de l'analyste (Tillmann et Rick, 2003), iii/ la fixation chimique entraîne une dégradation voire une disparition de certains groupes cellulaires (Olson *et al.*, 1989 ; Menden-Deuer *et al.*, 2001), iv) le dénombrement des cellules de petite taille ($<10 \mu\text{m}$) est limité et leur discrimination, incertaine.

Le phytoplancton peut aussi être étudié grâce à ses pigments photosynthétiques. La méthode standard la plus utilisée pour estimer la biomasse phytoplanctonique à partir des contenus pigmentaires est le dosage de la chlorophylle *a* par spectrotométrie ou fluorimétrie (Aminot et Kérouel, 2004). L'analyse des cortèges pigmentaires par chromatographie (HPLC, Mantoura et Llewellyn, 1983) est plus précise et complète et peut donner un aperçu de l'ensemble des groupes phytoplanctoniques en présence de par une approche chémotaxonomique (Mackey *et al.*, 1996 ; Jeffrey *et al.*, 1997). Ces méthodes pigmentaires sont certes rapides mais ne permettent pas d'évaluer directement les espèces et leur abondance, et ne fournissent qu'une approximation de la biomasse ne tenant pas compte de la variabilité du facteur de conversion C/Chl *a*. En effet ce facteur varie en fonction des espèces et de l'état physiologique des cellules phytoplanctoniques.

La cytométrie en flux devrait permettre à terme un compromis entre la rapidité des méthodes pigmentaires et la précision à l'échelle individuelle des méthodes microscopiques. La cytométrie est basée sur les propriétés bio-optiques des cellules. Cette méthode est particulièrement applicable au phytoplancton en raison de sa nature photosynthétique. Chaque cellule contient de la chlorophylle *a* laquelle, lors de son passage devant un laser bleu, émet une fluorescence rouge, permettant la discrimination des cellules autotrophes des cellules hétérotrophes eucaryotes et procaryotes, des débris et des sédiments (Veldhuis et Kraay, 2000). Actuellement considérée comme une méthode fiable pour le comptage des cellules phytoplanctoniques de petite taille (<10 μm) (Collier, 2000), la cytométrie en flux permet un dénombrement et une classification en groupes des cellules phytoplanctoniques sur la base de leurs propriétés optiques similaires. Elle a notamment permis la découverte de certaines espèces comme *Prochlorococcus marinus* en 1986 (Chisholm *et al.*, 1992), le plus abondant organisme photosynthétique marin de la planète mais aussi le plus petit picoeucaryote photosynthétique *Ostreococcus tauri* (Courties *et al.*, 1994), ou plus récemment, de diazotrophes unicellulaires (Zehr *et al.*, 2008). De nombreuses études montrant que la régulation des populations et de leurs pigments associés pouvait s'effectuer à l'échelle du mètre et/ou de l'heure (Owen, 1989 ; Jacquet *et al.*, 2002), les cytomètres ont dû être adaptés afin d'accéder à l'information sur une échelle temporelle et spatiale de plus en plus fine. C'est ainsi que depuis une vingtaine d'années, des cytomètres en flux ont été développés spécialement pour des applications *in situ* et automatisés tels que le Cytosense (détaillé dans la partie Matériels et Méthodes) ou le FlowCytobot (Olson *et al.*, 2003).

IV. La Manche Orientale

1. L'hydrodynamisme en Manche Orientale

La Manche est une mer épicontinentale dont la partie orientale (Figure 6) s'étend de la Baie de Seine jusqu'au détroit du Pas-de-Calais. La région côtière bénéficie d'un climat océanique tempéré avec des précipitations présentant généralement un maximum saisonnier en automne (précipitations totales moyennes de 80 mm par mois), et des niveaux à peu près équivalents en hiver et en été (entre 40 et 50 mm de précipitations totales par mois). Ces précipitations, réparties tout au long de l'année, influencent fortement les apports fluviaux. Contrairement aux côtes Anglaises, les côtes Françaises sont bordées d'estuaires, dont la Seine ($\approx 560 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, moyenne annuelle) et la Somme ($\approx 35 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, moyenne annuelle) qui représentent les principaux apports fluviaux du littoral de la Manche Orientale.

Un fort hydrodynamisme et des régimes marégraphiques de type mégatidaux, avec un marnage pouvant atteindre 8 m en vives-eaux, caractérisent la courantologie de la Manche Orientale. Les courants instantanés induits par la marée y sont très forts, de l'ordre de 120 à 150 $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ en vives-eaux. Ce contexte marégraphique favorise la création d'une masse d'eau côtière permanente bien individualisée, appelée « le fleuve côtier » (Figure 7 ; Brylinski *et al.*, 1991). Cette masse d'eau est entretenue par les apports fluviaux (Somme, Canche, Authie) depuis la baie de Seine jusqu'au détroit du Pas-de-Calais et sa circulation est régie par le courant résiduel de marée dirigé vers la Mer du Nord. Le fleuve côtier, riche en matières en suspension (Guéguénat *et al.*, 1995), sels nutritifs (Bentley *et al.*, 1993), pourrait être responsable d'une partie non négligeable des flux de matière vers la Mer du Nord (Brylinski *et al.*, 1991 ; Sentchev et Korotenko (2005, 2007) et est également le siège d'une accumulation de particules le long d'une zone frontale (Sentchev et Yaremchuk, 2005).

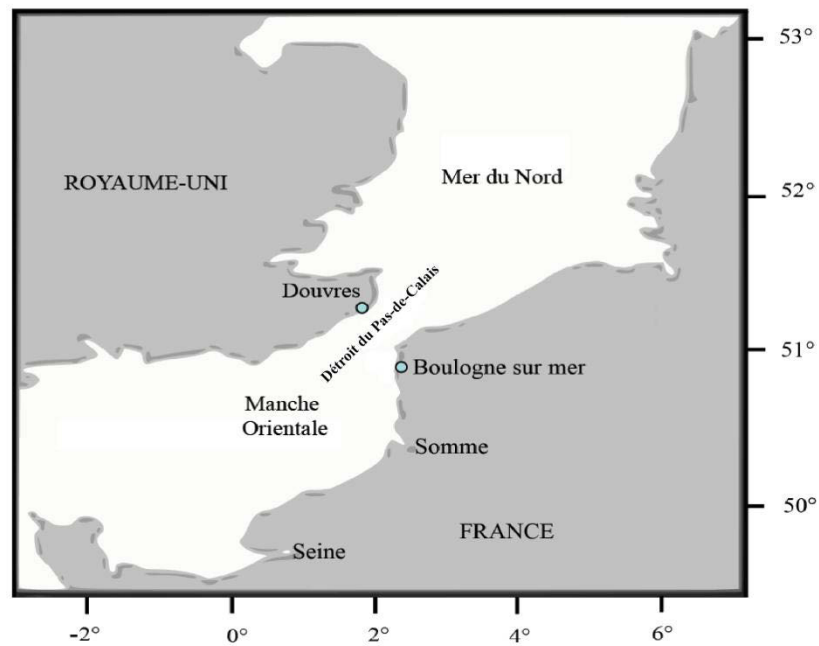


Figure 6. Localisation de la Manche Orientale

Les eaux côtières et celles du large forment deux masses d'eau bien distinctes mais dont les contours fluctuent au gré des marées et de la saison (Sentchev et Yaremchuk, 2005). D'un point de vue thermique la zone côtière est plus sensible aux variations climatiques et continentales ce qui implique une inversion de gradient suivant la saison (Quisthoudt, 1987).

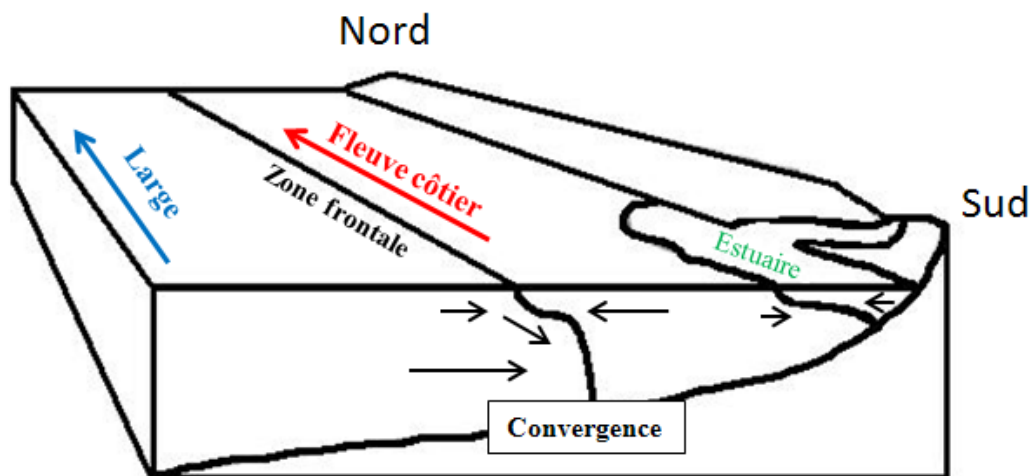


Figure 7. Mise en évidence du fleuve côtier et de la zone frontale en Manche Orientale (dessin de Brylinski, modifié)

Les eaux du large sont sous influence des entrées d'eau de l'océan Atlantique dont le flux résiduel se dirige vers la Mer du Nord (Salomon et Breton, 1993). La Manche Orientale apparaît donc comme une zone de transition pour les matières en suspension entre la Manche occidentale et la partie sud de la Mer du Nord (Velegrakis *et al.*, 1999), et plus globalement, comme une zone de transfert entre les eaux atlantiques et celles de la Mer du Nord (Salomon et Breton, 1993). Le détroit du Pas-de-Calais constitue par sa position géographique une frontière entre la Manche et la Mer du Nord. On observe aussi à son niveau un resserrement des isobathes entraînant la présence de différentes masses d'eau sur une zone faiblement étendue, d'où l'intérêt de rendre compte de la distribution du phytoplancton à haute résolution dans cette zone géographique.

2. La composante phytoplanctonique en Manche Orientale

La Manche Orientale a déjà été renseignée sur les composantes phytoplanctoniques (i.e. Lizon *et al.*, 1998 ; Gentilhomme et Lizon, 1998 ; Guiselin, 2010 ; Houliez *et al.*, 2012) en relation avec l'hydrodynamisme (Brylinski *et al.*, 1991 ; Salomon et Breton, 1993). Dans ce système méso-eutrophe, dont 85 % de la biomasse phytoplanctonique totale est attribuée aux diatomées, (Breton *et al.*, 2000 ; Grattepanche *et al.*, 2011 ; Lefebvre *et al.*, 2011, Hernández-Fariñas *et al.*, 2013) une saisonnalité de type 1/ diatomées – 2/ *Phaeocystis globosa* – 3/ diatomées est observée presque chaque année (Breton *et al.*, 2000 ; Gómez et Souissi, 2007 ; Lamy *et al.*, 2009 ; Monchy *et al.*, 2012 ; Houliez *et al.*, 2013). L'espèce emblématique de la Manche Orientale, *P. globosa*, prolifère au printemps de manière quasi-récurrente et peut constituer à elle seule (10^8 cellules. dm^{-3}) la quasi-totalité des espèces phytoplanctoniques présentes (Brylinski *et al.*, 1984 ; Brunet *et al.*, 1992 ; Brunet *et al.*, 1996). Cette efflorescence de *P. globosa* semble structurer la composition phytoplanctonique (Schapira *et al.*, 2008 ; Guiselin, 2010). Ainsi des diatomées de plus grande taille seront présentes avant l'efflorescence de *P. globosa* et des diatomées de petite taille seront plutôt présentes après l'efflorescence de *P. globosa*.

V. Cadre et objectifs de la thèse

La variabilité d'abondance et de biomasse du phytoplancton ainsi que l'apparition d'événements nuisibles, voire toxiques sont des critères de classement pour la qualité des masses d'eau, d'après la Directive européenne Cadre sur l'Eau (DCE, 2000). Des programmes d'observation et de surveillance (SOMLIT, SRN-REPHY), peuvent répondre aux exigences de cette directive ainsi qu'à d'autres comme la Stratégie Cadre Milieu Marin (DCSMM, 2008). Malgré un grand nombre d'études concernant le phytoplancton, il subsiste encore des lacunes concernant sa dynamique spatio-temporelle provenant notamment des méthodes et fréquences d'observation. Or, comprendre le fonctionnement d'un écosystème passe par l'étude de la variabilité des compartiments qui le composent. Peu d'études *in situ* ont été menées sur les réactions du compartiment phytoplanctonique à fine échelle spatio-temporelle, essentiellement par manque de moyens adaptés à la rapidité et la diversité des réponses aux conditions du milieu. L'utilisation et l'adaptation de la cytométrie en flux comme instrument d'analyse du phytoplancton a donné l'accès à un échantillonnage à haute fréquence à l'échelle de la cellule (Thyssen *et al.*, 2008, 2014 ; Guiselin, 2010).

Cette étude a été réalisée en Manche Orientale dans le cadre du projet DYMAPHY (2010-2014 ; Développement d'un système d'observation DYnamique pour la détermination de la qualité des eaux MARines, basé sur l'analyse du PHYtoplancton ; INTERREG IVA « 2 Mers »). Le but de ce projet était de mettre en place un dispositif efficace pour la détermination et le suivi à haute résolution de l'état écologique des eaux marines, à travers le suivi de la dynamique phytoplanctonique, de par l'utilisation en routine de la cytométrie en flux et de la fluorescence spectrale, en association à des méthodes traditionnelles de référence (microscopie, analyses pigmentaires) et synoptiques (télédétection). Ce projet se décomposait en 3 phases :

- Etablir des protocoles opérationnels de calibrage et de standardisation pour l'utilisation des différentes techniques d'analyse, ou à défaut des recommandations pour leur application qui permettront d'optimiser l'observation à haute résolution spatiale et haute fréquence de la qualité des eaux marines (activité 1).
- Développer des outils informatiques permettant d'accélérer et d'automatiser certaines étapes d'analyse particulièrement exigeantes en temps et expertise (activité 2).

- Tester et valider les procédures mises en place lors de campagnes en mer communes (Figure 8) et au sein des systèmes d'observation existants, combinant mesures standardisées et analyses automatisées (activité 3).

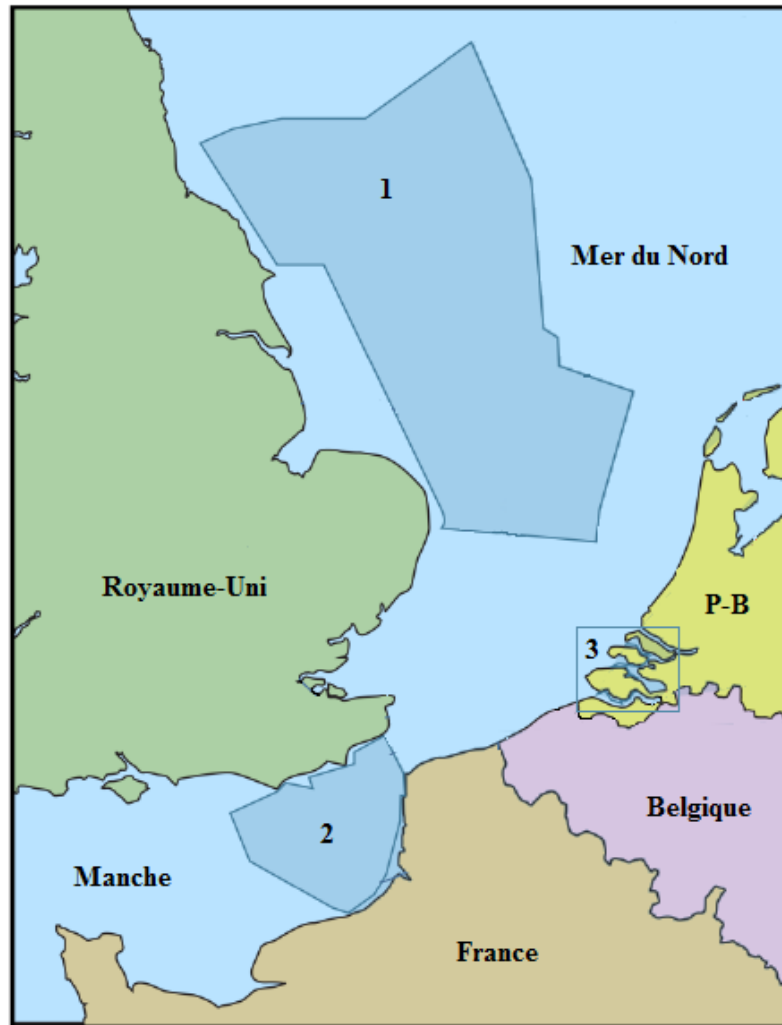


Figure 8. Carte des différentes campagnes océanographiques communes organisées au cours du projet DYMAPHY. 1 : Campagne DYMAPHY-PROTOOL (Mai 2011) ; 2 : Campagnes DYPHYMA I et II (Avril-Juin 2012) ; 3 : Campagne estuaires Néerlandais DES (Septembre 2012). www.dymaphy.eu

En Manche Orientale les études déjà menées avant 2007, ont souvent ciblé la dynamique de *P. globosa* en ne prenant pas en compte l'évolution simultanée de l'ensemble du compartiment phytoplanctonique (pico-, nano et microphytoplancton), au moyen de prélèvements bi-hebdomadaires à mensuels sur quelques périodes spécifiques de l'année.

L'acquisition par la suite d'un cytomètre en flux (enregistrant les profils optiques des signaux d'origine) de type « CytoSense » (CytoBuoy BV, Pays-Bas) au Laboratoire d'Océanologie et Géosciences (LOG) de Wimereux, a déjà permis d'effectuer des mesures en routine lors de suivis réguliers d'une station côtière pendant une année, sur des échantillons non fixés (Guiselin, 2010). La présente étude a pour objectif principal de rendre compte de l'hétérogénéité spatio-temporelle du compartiment phytoplanctonique en Manche Orientale, par des analyses *in vivo* et *in situ*, sur différentes échelles d'observation :

1/ Echelle pluri journalière : Campagne DYPHYMA effectuée à l'échelle régionale de la Manche Orientale, Avril 2012 (**Chapitre III**).

2/ Echelle saisonnière : le long de la radiale côte - large de la baie Saint Jean (Wimereux-Slack), entre février et Juillet 2012 (**Chapitre IV**).

3/ Echelle annuelle et interannuelle sur une station côtière : station R1 de la radiale de la baie Saint Jean, entre Juin 2011 et Juillet 2014 (**Chapitre V**).

Il s'agira d'étudier la variabilité des groupes phytoplanctoniques définis par la cytométrie en flux sur les différentes échelles spatiales et temporelles choisies et d'émettre des hypothèses sur leurs facteurs de régulation. Ces échelles d'observation ont été choisies pour caractériser la variabilité au sein des communautés phytoplanctoniques et pour répondre à différentes questions posées au cours du manuscrit, à savoir :

Quelle est la structure spatiale du phytoplancton en Manche Orientale ?

Quelle est la dynamique temporelle du phytoplancton en Manche Orientale ?

Quels sont les forçages environnementaux qui structurent sa répartition ?

Le **Chapitre II** (Matériels et Méthodes), concerne la méthodologie (incluant la participation à un exercice d'intercalibration) et la stratégie d'échantillonnage utilisée pour évaluer les abondances et estimer la biomasse phytoplanctonique.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse sont présentés sous forme de 3 articles, un publié, un en révision et un en préparation.

Le **Chapitre III** est composé d'un article publié qui présente la caractérisation, à haute résolution spatiale, des communautés phytoplanctoniques au cours de la campagne en mer DYPHYMA effectuée du 27 au 29 Avril 2012, en Manche Orientale. Il s'agit d'identifier la structuration spatiale des communautés phytoplanctoniques à une échelle synoptique sur une période pluri-journalière échantillonnée à haute fréquence et de vérifier le rôle des masses d'eau dans la distribution du phytoplancton. A la fin de ce chapitre, un complément visera à comparer les résultats obtenus avec le CytoSense et avec l'HPLC, le Fluoroprobe et la microscopie optique.

Le **Chapitre IV** vise à expliquer la variabilité spatio-temporelle du développement des populations phytoplanctoniques entre la fin de l'hiver et le début de l'été, sur une radiale côte-large, à sub-mésoéchelle spatiale (article en cours de révision). Les changements d'assemblage sont mis en évidence avec une fréquence hebdomadaire à bi-hebdomadaire, au cours des périodes les plus productives de l'année en Manche Orientale, les paramètres abiotiques susceptibles d'influencer ces changements étant déterminés.

Le **Chapitre V**, correspond à un article écrit sur la base des observations effectuées sur un seul point côtier de la radiale côte-large, analysées dans le chapitre IV, pendant trois années, à une fréquence hebdomadaire à mensuelle. Cette caractérisation des communautés phytoplanctoniques lors d'un suivi à moyen terme, permettra plus particulièrement d'observer et de définir une relation entre les traits fonctionnels des différents groupes phytoplanctoniques et la structuration de l'écosystème.

Une discussion générale (**Chapitre VI**) synthétise les résultats obtenus au regard des objectifs visés et dégage des perspectives pour les futures recherches. Une bibliographie regroupe en fin de manuscrit l'ensemble des références citées hors article.

Chapitre II :

Matériels et Méthodes

I. Le cytomètre en flux de type « CytoSense »

1. Principe de mesure

La cytométrie en flux est une technique développée pour analyser individuellement des particules en suspension dans un milieu liquide. Les particules sont individualisées par l'étirement de l'échantillon dans un liquide porteur dans des conditions d'un écoulement laminaire c'est-à-dire sans échange entre l'échantillon et le liquide porteur. Une fois l'étape d'individualisation réalisée, les particules passent devant un faisceau laser de longueur d'onde connue (Shapiro, 2003). La résultante est un flux de photons par diffraction et diffusion de la lumière accompagnée éventuellement d'une émission de fluorescence suite à l'excitation d'un pigment photosynthétique ou d'un marqueur fluorescent (Jochem, 1999 ; Marie *et al.*, 2005). L'instrument utilisé au cours de cette thèse est un cytomètre en flux de type « CytoSense » (CytoBuoy BV, Pays-Bas) permettant de réaliser des analyses automatisées *in situ* dédiées aux cellules phytoplanctoniques (Dubelaar *et al.*, 1999 ; Dubelaar et Gerritzen, 2000). L'analyse automatisée rendue possible sur le CytoSense permet de réaliser des mesures à haute fréquence, importantes pour révéler des processus à faibles échelles spatiales et temporelles. Le CytoSense peut être transportable et emmené sur un navire océanographique ou un autre lieu de prélèvement. L'échantillon est alors prélevé en milieu naturel sans subir les procédés de fixation et de conservation pouvant entraîner la dégradation des cellules conservées (Klaveness, 1985 ; Trousselier *et al.*, 1995). De plus, ce cytomètre en flux garde en mémoire l'ensemble des paramètres définissant ainsi la signature optique de chaque particule (pulse shape recording), alors que les cytomètres classiques ne conservent que le signal maximal de chaque canal. Ces profils peuvent, pour les plus grosses particules, être associés à une prise de photos par un système automatisé d'acquisition d'images pouvant être rajouté à l'intérieur du cytomètre.

L'instrument CytoSense Benchtop (CytoBuoy BV, Pays-Bas) se décompose en trois compartiments (Figure 9) :

1. Le système fluidique: Une pompe péristaltique apporte l'échantillon au travers d'un tube en silicone de 800 μm , jusqu'à l'injecteur où un liquide de gaine est entraîné à une vitesse supérieure, à celle de l'échantillon ($80 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$), garantissant la création d'un flux laminaire et une séparation des deux types de fluides au niveau de la chambre de mesure. Les particules

qui peuvent être analysées mesurent entre 1 et 800 μm . 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). 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, évitant ainsi toute obstruction de l'entrée par les particules. La nature du liquide gaine ne doit pas modifier l'indice de réfraction et dépend de l'échantillon à analyser. Dans notre cas le liquide de gaine est l'eau de mer filtrée sur 0,45 μm , puis 0,2 μm .

2. Le système optique: Les particules sont interceptées par un faisceau laser de couleur bleue (Coherent solid-state sapphire, 488 nm, 50 mW) de longueur 300 μm et de largeur 5 μm . Chaque particule diffuse la lumière et, dans le cas de phytoplancton, émet de la fluorescence dont l'intensité et la longueur d'onde d'émission dépendront du type de pigment photosynthétique. Les signaux de diffusion et de fluorescence sont collectés à l'aide de photomultiplicateurs qui permettent l'enregistrement de 5 variables (Figure 10):

- La **diffusion vers l'avant** ou aux petits angles (0-15°; FWS) varie en fonction de la taille axiale de la particule.
- La **diffusion aux grands angles** (45-135°; SWS) révèle la structure interne des particules.
- La **fluorescence rouge** (668-734 nm; FLR) est la principale bande d'émission de la chlorophylle *a* lorsqu'elle est excitée par un laser bleu. Elle permet de distinguer les particules autotrophes des particules non autotrophes (hétérotrophes, sédiments etc).
- La **fluorescence orange** (601-668 nm; FLO) permet de distinguer les particules contenant des pigments accessoires tels que la phycocyanine et la phycoérythrine contenus dans les cyanobactéries et les Cryptophytes.
- La **fluorescence jaune/verte** (536-601 nm; FLY) permet de distinguer également la phycoérythrine présente dans les cyanobactéries et Cryptophytes, ainsi que chez quelques dinoflagellés et ciliés incorporant des Cryptophytes dans leur cytoplasme, pour réaliser la photosynthèse (*Dynophysis*, *Mirionecta rubra*).

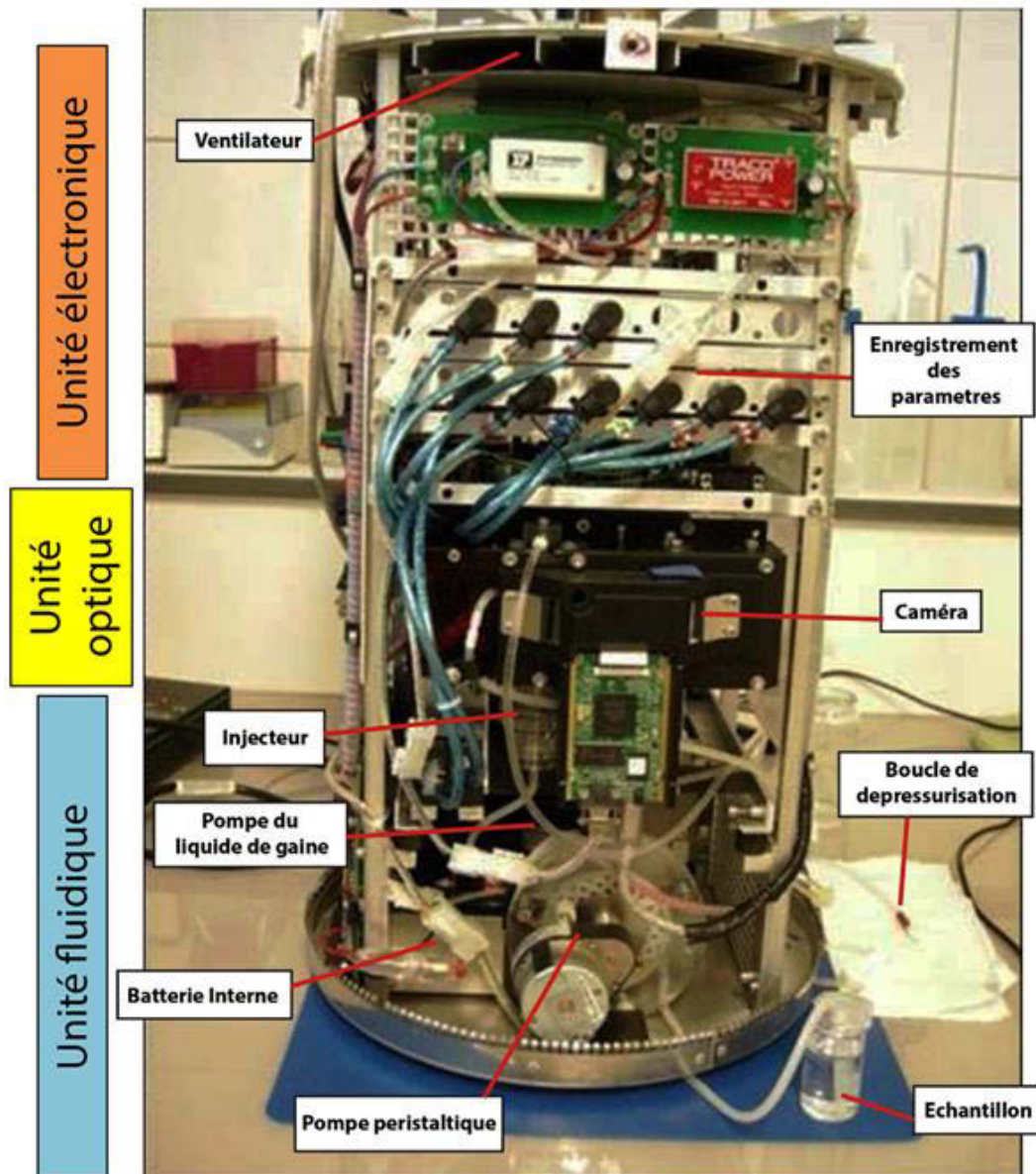


Figure 9. Principaux éléments de la composition interne du CytoSense présenté sans sa coque de protection

Le signal FWS est collecté par une photodiode (positive intrinsic negative diode ; PIN). 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 car elle reçoit une grande quantité de la puissance du faisceau laser. Une partie de la lumière incidente est récupérée par un miroir placé de l'autre côté de la cuvette et est déviée à 90° sur une série de filtres optiques séparant les différentes longueurs d'onde permettant de collecter le signal SWS et les signaux de fluorescence. Ces signaux sont collectés, amplifiés et numérisés par des photomultiplicateurs puis transmis vers un disque dur associé placé au-dessus de l'unité optique.

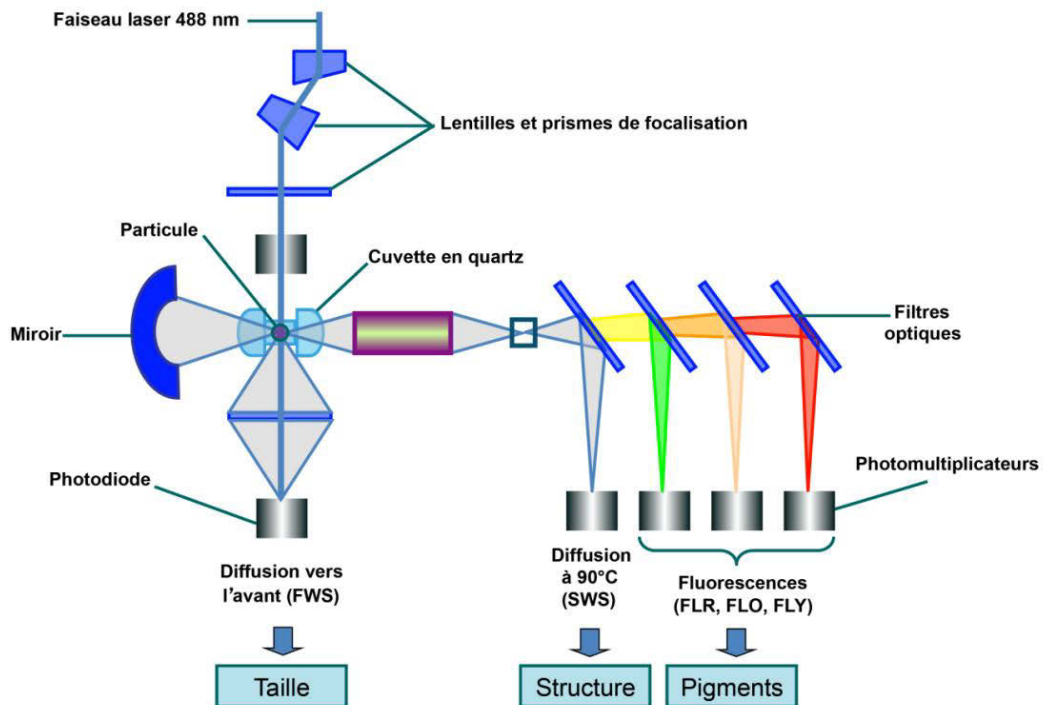


Figure 10. Schéma de l'unité optique en vue de dessus d'un CytoSense (d'après CytoBuoy). La particule est interceptée par le faisceau laser de longueur d'onde 488 nm, la lumière diffusée aux petits angles donnera une estimation de la taille des particules (Forward Scatter ; FWS) et celle diffusée aux grands angles une estimation de la complexité structurale (Sideward Scatter ; SWS). Les signaux de fluorescence sont séparés par des filtres et renvoyés vers des photomultiplicateurs

Deux modules optionnels viennent compléter la partie optique du CytoSense utilisé lors de ma thèse:

- Un module de **détection de la courbure des particules** ou *Curvature* (Figure 11) qui est un polariseur disposé sur l'unité FWS et permettant de détecter les cellules à forme spiralée, courbée et coloniales.
- En opposition aux modules low sensitivity (LS) déjà intégrés pour les variables SWS, FLR et FLY afin de détecter les plus grosses particules, **un module de détection High Sensitivity (HS)** permet la détection des particules plus petites comme les picoeucaryotes. Ce module de détection HS (Figure 12) est présent pour les variables SWS, FLR, FLY et FLO.

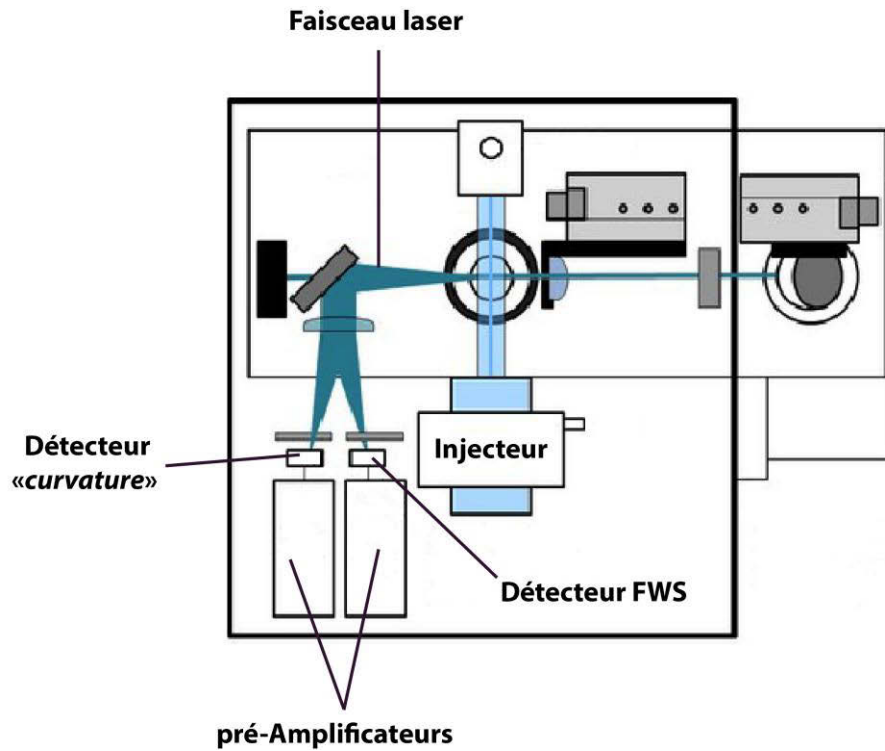


Figure 11. Vue de face au niveau du faisceau laser avec le module optionnel « *curvature* » (d'après CytoBuoy)

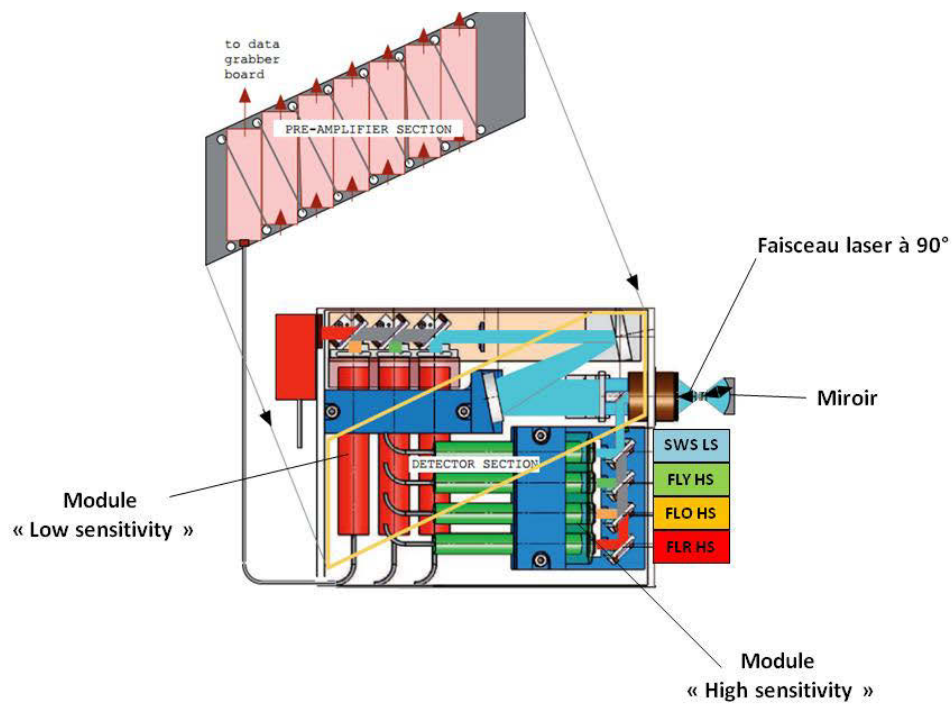


Figure. 12. Schéma en vue de dessus de l'unité optique d'un CytoSense équipé d'un module optionnel « *High Sensitivity* » (d'après CytoBuoy)

3. Le système électronique : Le flux de photons émis par le passage d'une particule devant le laser est converti en impulsions électriques. Chaque profil issu des impulsions (Figure 13) est digitalisé et stocké dans des disques durs avant d'être envoyé à l'ordinateur par port série. Contrairement aux cytomètres en flux conventionnels, l'impulsion obtenue n'est pas intégrée, mais décomposée en plusieurs données à une vitesse de 4 MHz. Afin d'éviter une saturation des disques durs par des informations non voulues comme des particules non fluorescentes, l'utilisation d'un seuil de détection (trigger level) sélectionné à partir du logiciel d'acquisition du signal CytoUSB, soit sur la fluorescence soit sur la taille des particules est nécessaire. Lors de nos différentes expériences, un seuil de détection sur la fluorescence rouge a été utilisé afin de compter uniquement les particules émettant de la fluorescence rouge c'est-à-dire contenant de la chlorophylle *a*. Des seuils de fluorescence rouge de 10 et 25 mV ont été appliqués (c.f. partie 3).

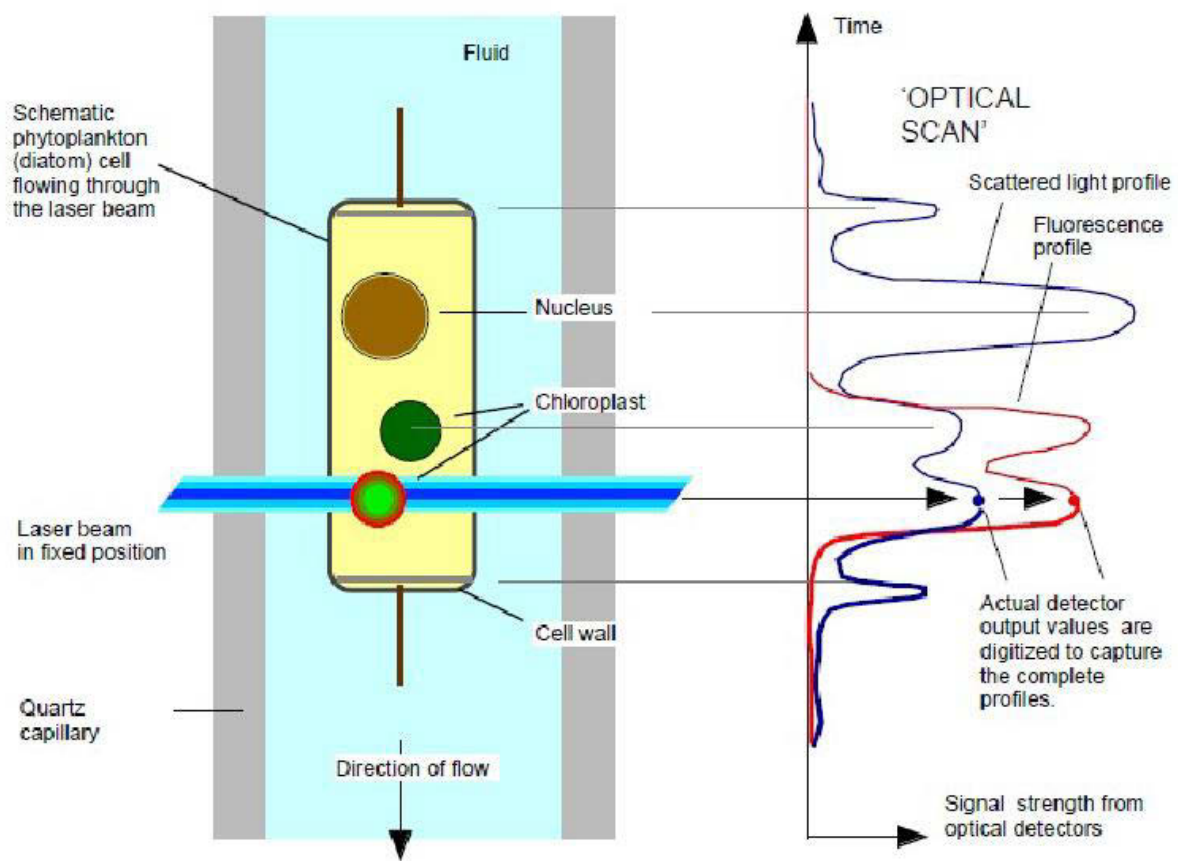


Figure 13. Passage d'une particule devant le faisceau laser du Cytosense, entraînant la création d'une signature cytométrique composée ici du SWS (en bleu) et du FLR (en rouge) (CytoBuoy)

2. Traitement des données

Pour une discrimination optimale des particules, 10 paramètres (Longueur, Total, Maximum, Moyenne, Inertie, Centre de gravité, Facteur de remplissage, Asymétrie, Nombre de pics ou cellule, Temps de passage de la cellule devant le laser (TOF)) sont associés à chaque variable, à l'exception du TOF qui est identique pour tous les signaux (Figure 14). Ainsi chaque cellule est définie par 73 valeurs discrètes $[(3 \text{ variables LS} + 4 \text{ variables HS} + \text{FWS}) * 9 \text{ paramètres} + 1 (\text{TOF})]$. Le logiciel Cytoclus[®] réalise alors une série de calculs élémentaires sur les signatures cytométriques enregistrées permettant la classification et la visualisation de l'ensemble des cellules sur des diagrammes appelés cytogrammes. Il s'agit de graphiques de nuages de points dont les axes représentent deux variables élémentaires, les coordonnées des points étant calculées à partir des profils des signaux. La sélection des groupes cellulaires se fait par la suite de manière subjective par l'utilisateur. L'emploi de billes de calibration permet de normaliser les différentes variables au cours du temps et de pallier aux variabilités des composants optiques.

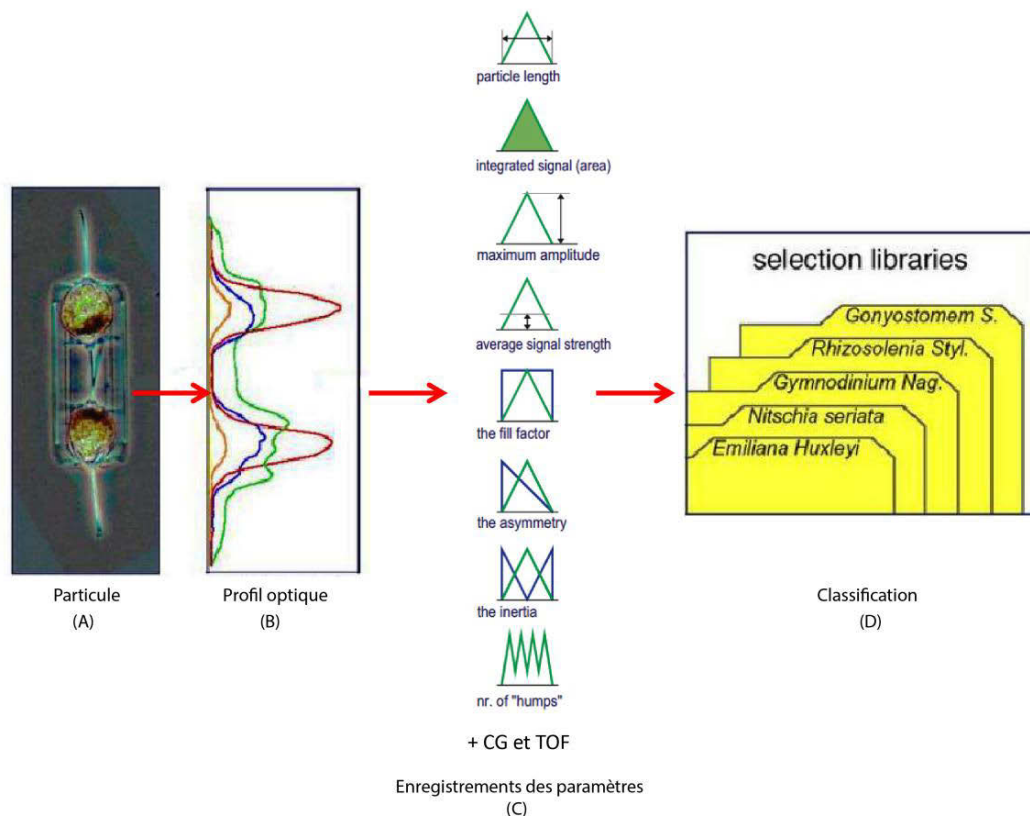


Figure 14. Schématisation des différentes successions des procédés d'acquisition du signal : (A) la particule passe au sein du faisceau laser, (B) un profil optique lui est associé, (C) 10 facteurs sont extraits des variables issues du profil optique permettant (D) une classification et un regroupement des particules similaires avec le logiciel CytoClus[®] (d'après CytoBuoy)

3. Analyses effectuées en laboratoire

Le CytoSense en mode paillasse a été employé pour les expériences et analyses détaillées dans les chapitres IV et V. Les prélèvements et les analyses ont été réalisés dans les mêmes conditions. Les échantillons d'eau de mer ont été collectés à partir du navire de recherche « Sepia II » à environ 2 m sous la surface de l'eau avec des bouteilles Niskin. Le temps écoulé entre le prélèvement et l'analyse des échantillons au cytomètre en flux n'a jamais dépassé les 4 heures. Pour chaque échantillon, deux analyses avec deux différents seuils de détection basés sur la fluorescence rouge ont été réalisées afin de privilégier la détection des picoeucaryotes et du nano-phytoplancton. La détection des picoeucaryotes ayant une fluorescence située juste au-dessus du bruit de l'appareil, requiert donc un faible seuil de détection (10 mV ; FLR). Ce seuil de détection est dépendant de la sensibilité de son instrument de mesure et de la quantité de bruit. La grande concentration de picoeucaryotes dans les échantillons permet un temps d'analyse peu élevé (4-5 min ; $\pm 1 \text{ cm}^{-3}$ de volume analysé) pour obtenir une significativité des résultats. De plus la taille des particules est proportionnelle à son temps de passage devant le laser, il convient donc de choisir une vitesse appropriée à la taille des particules étudiées. Ainsi une vitesse faible sera sélectionnée 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. Au contraire le nano et le microphytoplancton ont une fluorescence plus élevée et sont numériquement moins concentrés que les picoeucaryotes. Dans le but d'avoir un nombre de particules suffisant il convient d'employer un seuil de détection plus élevé (25 mV ; FLR) pour ne pas saturer les disques avec les données des picoeucaryotes. Un temps d'analyse plus long (6-7 min ; $\pm 3 \text{ cm}^{-3}$ de volume analysé) a été aussi employé dans le but de dénombrer ces particules moins concentrées. Un contrôle avec des lots de billes de 3 μm et 10 μm de diamètre et de concentration connue a été réalisé pour prévenir un défaut d'estimation de concentration dû aux variations de vitesse de la pompe péristaltique et normaliser la fluorescence et la taille des particules.

4. Analyses automatisées pendant une campagne océanographique

Au cours des trois campagnes océanographiques en Manche Orientale à bord du « Côtes de la Manche » (INSU-CNRS), dont la deuxième campagne (la plus complète) sera présentée dans

le chapitre III et les deux autres en Annexe, le CytoSense a été utilisé en mode automatique. Une analyse d'eau de mer a été effectuée toutes les 10 minutes, pour cela il a aussi été nécessaire d'automatiser l'arrivée d'eau jusqu'au cytomètre (Figure 15).

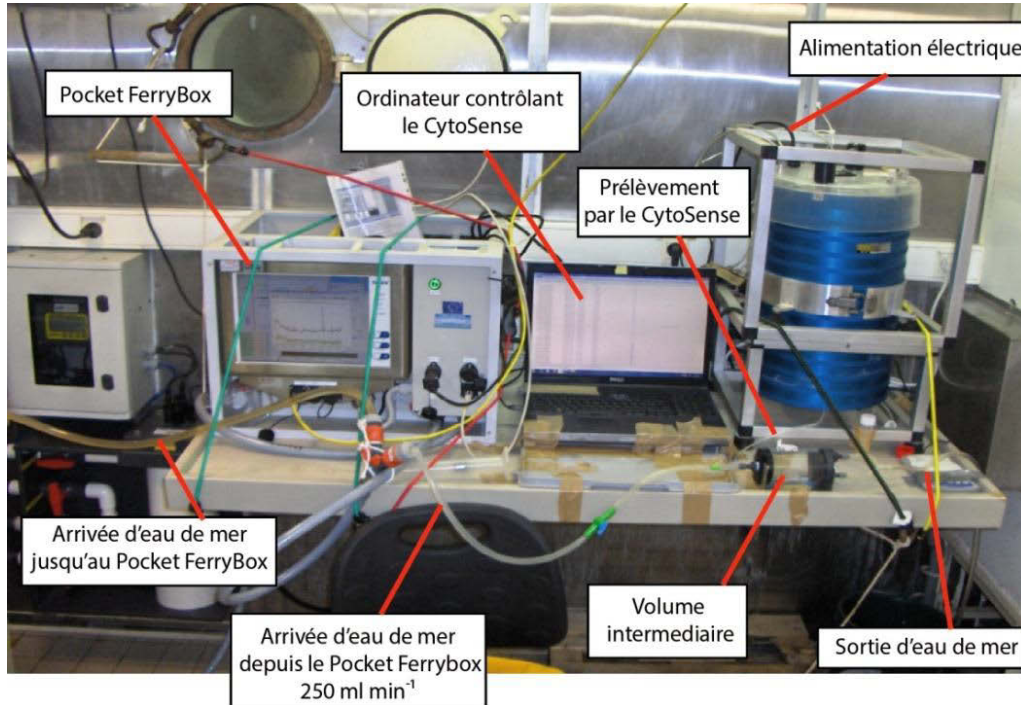


Figure 15. Dispositif d'échantillonnage automatisé lors d'une campagne océanographique (Mission IBTS 2013, N.O. « Thalassa »). Le CytoSense est couplé avec un Pocket FerryBox qui amène l'eau à une pression de 1 bar dans un volume intermédiaire où une analyse cytométrique est réalisée toute les 10 minutes

Afin d'y parvenir, l'eau de mer pompée a été envoyée jusqu'au Pocket FerryBox (PFB 4H JENA[®]), dispositif mis en place par Alain Lefebvre, IFREMER LER/BL, www.dymaphy.eu permettant la mesure en continu des paramètres hydrologiques) qui peut facilement supporter la pression envoyée par la pompe du bateau, au contraire du cytomètre. Un système de dérivation a permis au cytomètre de recevoir de l'eau de mer de manière continue dans un collecteur avec un débit de $250 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. L'échantillon étant prélevé par la suite dans ce collecteur grâce à la pompe péristaltique. Du fait du mauvais temps et des forts mouvements de houle, des bulles d'air ont pu entrer dans le système et faire chuter le débit d'eau entraînant parfois un arrêt des analyses. Un réajustement du débit d'eau de mer a dû être fait régulièrement en fonction des différentes conditions de mer. Lors de cette campagne, l'analyse à haute fréquence temporelle avait pour but de diminuer la distance entre 2 échantillons analysés. De ce fait un seul seuil de détection (10mV) a été utilisé par échantillon. Afin de pallier la plus faible représentativité du nano- et microphytoplancton, un

temps d'analyse de 9 min a été sélectionné. Un contrôle avec des billes de 3 μm de diamètre a été réalisé afin de normaliser les variables enregistrées telles que la fluorescence et la taille des particules. Il est cependant reconnu qu'un manque de précision dans l'estimation de la taille des particules $< 5 \mu\text{m}$ existe notamment car leur taille se situe en dessous de la largeur du faisceau laser, entraînant une surestimation de la taille de ces particules (Guiselin, 2010).

5. Discriminations des différents groupes phytoplanctoniques

Au cours des différentes expériences présentées dans les prochains chapitres, un total de 8 groupes phytoplanctoniques a été identifié (Figure 16). La limite de détection de l'œil humain pouvant aller jusqu'à une quinzaine de groupes pour certains échantillons, le choix de suivre ces 8 groupes est purement arbitraire. Ce choix se justifie par le fait de suivre des groupes ayant une certaine récurrence dans la zone étudiée et ayant une population relativement importante (> 100 particules par cluster).

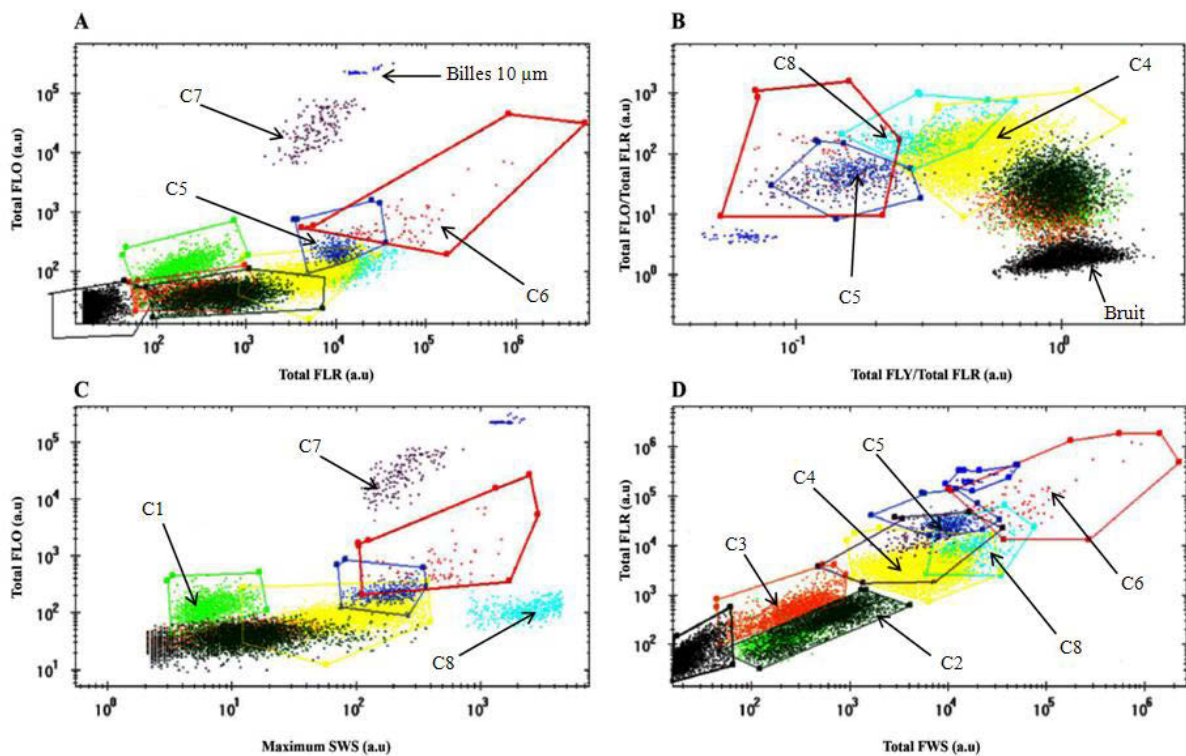


Figure 16. Cytogrammes illustrant la discrimination des 8 groupes phytoplanctoniques et 1 groupe de billes, dans un échantillon naturel issu de la Manche Orientale. A. Cytogramme Total FLR vs. Total FLO, permettant de discriminer les groupes C5 et C7. B. Cytogramme rapport Total FLY/Total FLR vs. rapport Total FLO/Total FLR, permettant de discriminer le groupe C4 et C5. C. Cytogramme maximum SWS vs. Total FLO, permettant de discriminer le groupe C1, C5 et C8. D. Cytogramme Total FWS vs. Total FLR, permettant de discriminer le groupe C2, C3, C4 et C6. Un minimum de 4 cytogrammes dans des configurations différentes est nécessaire afin d'affiner cette discrimination

Sur la base d'enregistrements réalisés sur des cellules isolées lors d'exercices d'intercalibrage effectués dans le cadre du projet DYMAPHY (www.dymaphy.eu), ainsi que sur les connaissances acquises lors d'études antérieures (Thyssen, 2008 ; Guiselin, 2010), les huit groupes ont pu être discriminés progressivement en milieu naturel. Leur reconnaissance a ensuite été facilitée sur les cytogrammes par l'attribution à chacun d'un profil optique caractéristique (Figure 17).

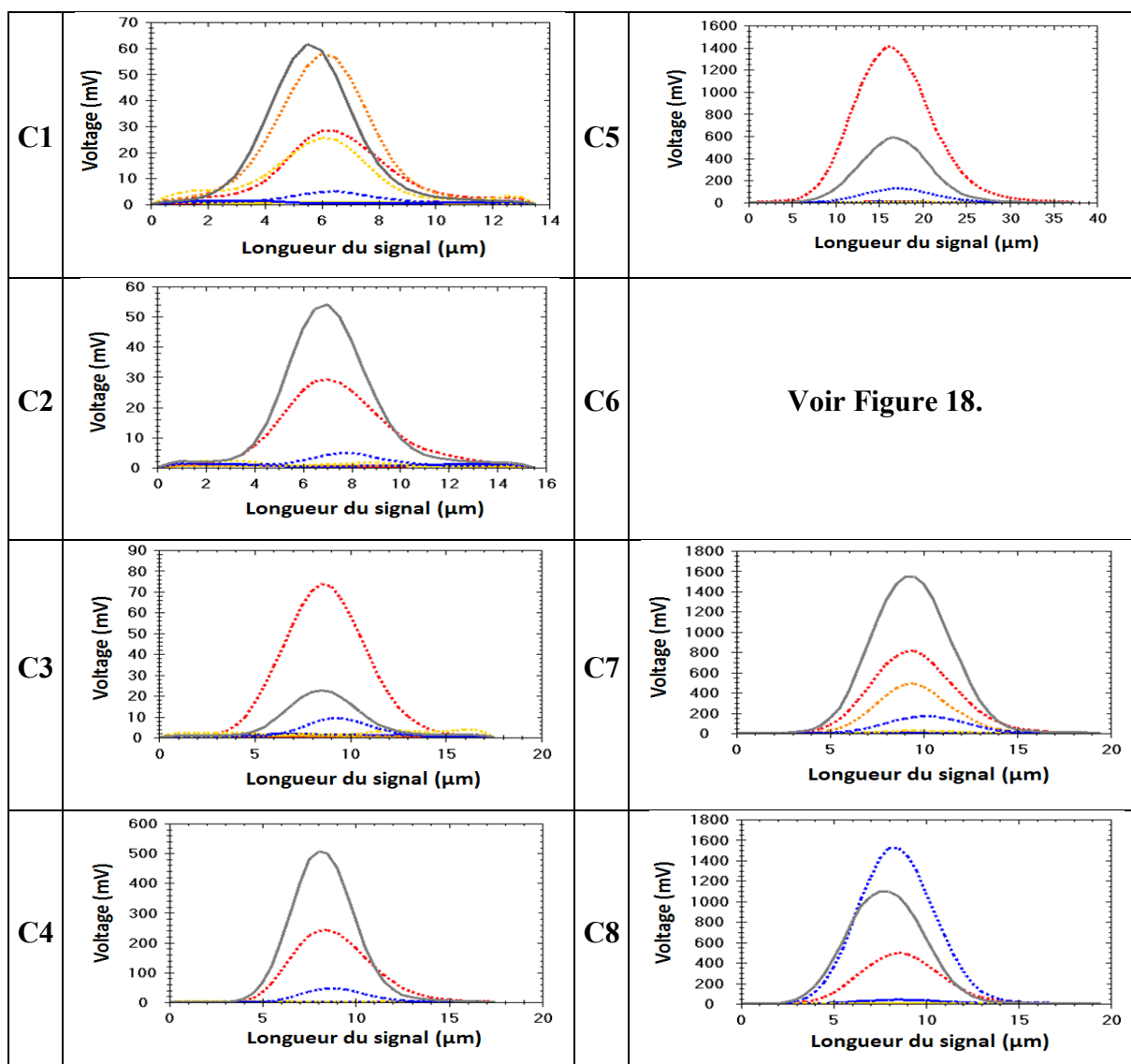


Figure 17. Profil optique des cellules des groupes phytoplanctoniques de C1 à C8 rencontrés dans le milieu naturel. Les signaux de FWS (noir), SWS (bleu), FLR (rouge) et FLO (orange) sont représentés pour chaque profil

Le groupe C1 est constitué de petites cellules ($< 2 \mu\text{m}$) et se différencie des groupes C2 et C3 par la présence de fluorescence orange caractéristique de la phycoérythrine. Par conséquent,

les cellules du groupe C1 ont été identifiées comme étant des cyanobactéries du genre *Synechococcus* (Olson *et al.*, 1988 ; Corzo *et al.*, 1999). Les groupes C2 et C3 sont aussi constitués de petites cellules ($< 2 \mu\text{m}$) et possèdent une faible signature FLR caractérisant des cellules ayant un faible contenu chlorophyllien. Le groupe C3 possède une signature FLR plus élevée que le groupe C2. A cette échelle de taille, la caractérisation cellulaire est impossible en microscopie optique, une étude plus approfondie à l'aide de marquage fluorescent par sondes moléculaires (Fluorescent In situ Hybridisation – FISH) pourrait nous renseigner sur la classification exacte de ces 2 groupes. Dans la suite du manuscrit les deux groupes seront nommés picoeucaryote I (faible fluorescence rouge) et picoeucaryote II (forte fluorescence rouge), comme le font déjà de nombreux spécialistes (Blanchot *et al.*, 1997 ; Grégori *et al.*, 2001 ; Thyssen *et al.*, 2009 ; Thyssen *et al.*, 2014). Les cellules des groupes C4 et C5 ont des signaux FWS et FLR plus petits que les cellules du groupe C7. Les cellules du groupe C4 mesurent entre 3 et 6 μm alors que les cellules du groupe C5 sont comprises entre 6 et 10 μm . En accord avec de précédentes études en Manche orientale et en baie sud Mer du Nord (Rutten *et al.*, 2005 ; Guiselin, 2010 ; Houliez *et al.*, 2012), les cellules des groupes C4 ont été identifiées comme étant le morphotype haploïde de l'espèce *Phaeocystis globosa*. Les cellules du groupe C5, étant plus grandes et plus fluorescentes que celles du groupe C4, ont été identifiées comme étant le morphotype diploïde (cellules coloniales se retrouvant libérées dans le milieu, Rousseau *et al.*, 2007) de l'espèce *Phaeocystis globosa*. Le groupe C6 est facilement identifiable sur les cytogrammes (Figure 16) car il est composé par les plus grandes ($> 20 \mu\text{m}$) et les plus fluorescentes cellules analysées (Olson et Sosik, 2007). Il est en grande partie composé de diatomées (*Thalassiosira rotula*, *Pseudo-nitzschia seriata*, *Chaetoceros socialis*, *Rhizosolenia imbricata*, *Guinardia delicatula*, etc) aux profils optiques très variés (Figure 18). Le groupe C7 est composé de cellules phytoplanctoniques présentant une fluorescence rouge et une taille relativement similaires aux cellules des groupes C4 et C5, mais différant par leurs forts signaux de fluorescence orange. L'autre groupe phytoplanctonique contenant de la phycoérythrine, est celui des Cryptophytes (Olson *et al.*, 1988 ; Marie *et al.*, 2010). Le dernier groupe (C8) possède des cellules également de taille similaire aux groupes C4 et C5, mais diffère de ces derniers par un fort signal SWS provenant de la réflectance du laser sur l'enveloppe externe des cellules. Les seules cellules de cette taille et ayant une enveloppe permettant une réflexion du laser seraient des cellules calcifiées de Coccolithophoridés (von Dassow *et al.*, 2012).

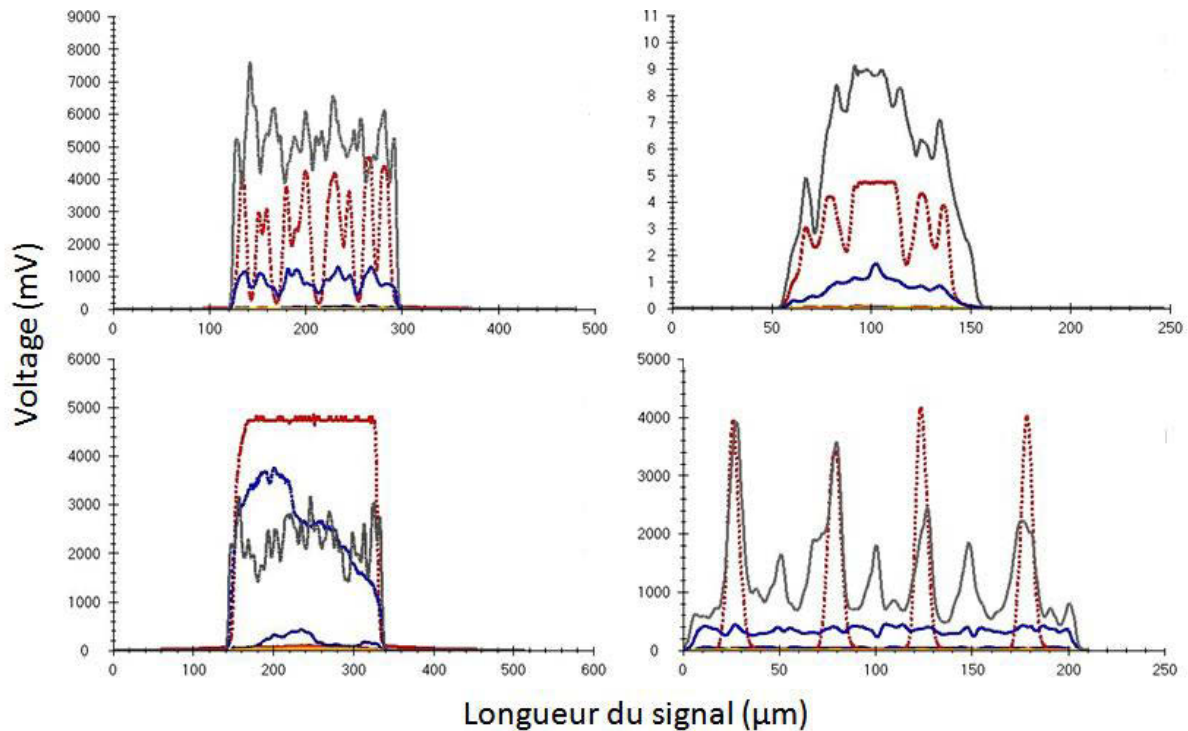


Figure 18. Variabilité des profils optiques des cellules du groupe phytoplanctonique C6, rencontrés dans le milieu naturel. Les signaux de FWS (noir), SWS (bleu), FLR (rouge) et FLO (orange) sont représentés pour chaque profil

6. Intercomparaison entre différents types de cytomètres

Dans le cadre du projet Interreg IVB “North Sea Ballast Water Opportunity” (NSBWO) (<http://www.northseaballast.eu>), une intercomparaison entre différents cytomètres en flux et des techniques de comptage microscopique a été réalisée. Ainsi 29 participants provenant de 9 pays différents ont pu comparer, pendant 3 jours (11–14 Février 2013), leurs méthodes d’analyses du phytoplancton, au NIOZ (Texel) sous la direction du Dr. Louis Peperzak. Le but de cette intercomparaison était de trouver le cytomètre en flux correspondant le plus aux besoins du projet NSBWO, à savoir un outil capable de compter rapidement les organismes de taille comprise entre 2 et 50 μm et les organismes à la fois très concentrés et peu concentrés. Ont été pour cela mis à contribution : 5 types de cytomètres: Attune[®] Acoustics focusing cytometer (At1 et At2), CytoSense (CS1), BD Accuri[®] C6 (C6), BD FACS Canto[®] II (Ca) et BD FACS Verse[®] (FV), qui ont été comparés à 3 types de microscopie différents (optique, à épifluorescence et holographique).

L’étape suivante de l’atelier pratique, après avoir calibré les instruments de manière classique avec des billes de calibrage, a été le comptage de cellules phytoplanctoniques unicellulaires.

La comparaison entre les cytomètres en flux et les techniques de microscopie a été basée sur l'abondance cellulaire mais aussi sur les fluorescences observées. Ne seront relatés ici que les résultats obtenus sur les abondances. Trois espèces phytoplanctoniques recouvrant une large gamme de taille (Tableau 2) ont été utilisées.

Nom	Abbréviation	Taille approximative (µm)
<i>Micromonas pusilla</i>	Mp	2
<i>Prorocentrum minimum</i>	Pmin	10
<i>Prorocentrum belizeanum</i>	Pbel	50

Tableau 2. Les 3 cultures phytoplanctoniques comptées par 3 microscopes et cinq cytomètres en flux

Deux concentrations ont été préparées et déterminées pour chaque culture, une faible (low) et une forte (high) concentration. Les concentrations de *M. pusilla* étaient de l'ordre de 100 cellules.cm⁻³ pour les plus faibles (low) et 10000 cellules.cm⁻³ pour les plus fortes (high), et étaient 3 fois plus concentrées que *P. minimum* et 10 fois plus concentrées que *P. belizeanum*. Les espèces mesurant 2 µm (*Micromonas pusilla*) n'ont pu être comptées correctement (Tableau 3) en microscopie à inversion, cette gamme de taille étant à la limite de détection des appareils. Pour les espèces mesurant environ 10 µm (*Prorocentrum minimum*), des concentrations relativement similaires ont été trouvées pour les microscopes optique et holographique. Un même ordre de grandeur a aussi été observé entre le microscope à fluorescence et le microscope holographique pour les cellules de 50 µm (*Prorocentrum belizeanum*). Le microscope optique traditionnel comptabilisant un peu plus de cellules.

Espèces	Concentration	Microscopes		
		optique	épifluorescence	holographique
Mp	low			
Mp	high	11023		
Pmin	low			12
Pmin	high	3963		3678
Pbel	low			
Pbel	high	1174	715	814

Tableau 3. Concentrations cellulaire (cm⁻³) des 3 cultures à faible (low) et forte (high) concentration. Les cases blanches n'ont pas pu être comptées

Pour des faibles concentrations en Mp, le CytoSense est celui qui compte le plus de cellules (Tableau. 4) mais dans le même ordre de grandeur que le FacsCanto II ou le BD Accuri C6, alors que les cytomètres Attune en comptent 2 fois moins. Malheureusement le comptage au microscope optique n'a pas été possible pour les faibles concentrations en Mp rendant l'interprétation des résultats difficile. En revanche, les différences entre notre instrument (CytoSense) et les autres cytomètres en flux sont très faibles pour le comptage des cellules de *M. pusilla* très concentrées et malgré une difficulté à compter ces petites cellules, une bonne relation est aussi présente avec le comptage microscopique. Le CytoSense est l'instrument qui se rapproche le plus de la moyenne globale des cytomètres ainsi que du comptage microscopique. De bons résultats sont aussi observés avec les cultures Pmin, comparables avec ceux obtenus avec les cytomètres FacsCanto II et les cytomètres Attune.

Les grandes variations entre les cytomètres en flux et le comptage microscopique obtenues lors de l'analyse des cultures concentrées de Pbel, pourraient être dues à la production de carbone extracellulaire qui engendrerait à la fois une agglomération des cellules comptabilisées en tant qu'entité unique et à la fois un problème de bouchon dans les systèmes des cytomètres. Ce phénomène semble s'atténuer pour les cultures moins concentrées où le CytoSense obtient des résultats comparables avec les autres cytomètres en flux.

Lors de cette intercomparaison, le CytoSense obtient donc des résultats comparables aux autres cytomètres en flux et aux techniques plus classiques comme la microscopie optique. De précédentes études (Guiselin, 2010) avaient déjà démontré une bonne corrélation entre le comptage au CytoSense et le comptage au microscope optique.

Species	Mp		Pmin		Pbel	
Concentration	low	high	low	high	low	high
At1	40	9,465	30	2,625	10	515
At2	55	10,470	40	2,505	10	80
C6	105	11,822	28	3,620	9	1,323
Ca	116	12,770	not calculated	2,914	1	56
CS1	143	11,100	43	2,670	8	266
FV	not calculated	not calculated	not calculated	not calculated	not calculated	not calculated
Overall average	92 ± 54	11,125 ± 1,570	35 ± 12	2,867 ± 555	8 ± 5	448 ± 650
Overall average	92 ± 58%	11,125 ± 14%	35 ± 34%	2,867 ± 19%	8 ± 59%	448 ± 145%
Microscope	not counted	11,023	12	3,821	not counted	901

Tableau 4. Concentrations de *M. pusilla* (Mp), *P. minimum* (Pm) and *P. belizeanum* (Pb) en cellule.cm⁻³ à faible (low) et forte (high) concentration, analysés par six cytomètre en flux. Les nombres sont la moyenne des réplicats (2). “overall average” est la moyenne de tous les cytomètres avec un intervalle de confiance de ± 95% en absolu (cellule.cm⁻³) ou en relatif (%). Les comptages microscopiques sont les moyennes des concentrations du tableau 3 (d'après Peperzak et Gollasch, 2014)

Une intercomparaison de méthodes sera abordée au chapitre III sur des échantillons naturels de la Manche Orientale. L'utilisation de deux techniques innovantes comme la cytométrie en flux (CytoSense) et la fluorescence spectrale (Fluoroprobe) sera opposé à une technique robuste via une approche chémotaxonomique, à savoir la chromatographie liquide à haute performance ou HPLC couplée à la méthode d'analyse CHEMTAX.

II. Principe élémentaire du Fluoroprobe

Lors de l'excitation avec une lumière permettant la photosynthèse, la fluorescence est majoritairement émise par la chlorophylle *a* contenue dans le photosystème II (PSII) des individus phytoplanctoniques (Beutler *et al.*, 2002a). Par ailleurs, les espèces et groupes phytoplanctoniques sont caractérisés par des pigments photosynthétiques accessoires différents et ont donc des spectres de fluorescence distincts, ce qui permet de révéler la structure de la communauté phytoplanctonique étudiée. Ce sont ces propriétés qui ont été exploitées pour le développement du Fluoroprobe (bbe-Moldaenke, Kiel, Allemagne). Le spectre d'un mélange phytoplanctonique est enregistré et différentes classes pigmentaires peuvent ainsi être définies grâce à une procédure arithmétique statistique développée dans Beutler *et al.*, (2002a) et Ruser *et al.*, (1999). De nouvelles empreintes peuvent être ajoutées à une bibliothèque à partir de mesures *in situ* ou de cultures. Toutes les mesures du Fluoroprobe sont basées sur les caractéristiques d'excitation et d'émission de fluorescence de la chlorophylle *a* et des pigments accessoires.

Le Fluoroprobe permet de déterminer la biomasse phytoplanctonique par groupes à partir de leurs spectres d'excitation de fluorescence (Beutler *et al.*, 2002a,b). Les pigments phytoplanctoniques sont excités par différentes longueurs d'onde issues de 5 diodes d'émission de lumière (LED) et émettent différentes réponses de fluorescence. Chaque classe phytoplanctonique a ainsi sa propre empreinte, qui correspond à un schéma réactionnel face à différentes longueurs d'ondes d'excitation (450, 525, 570, 590 and 610 nm) liée à sa composition pigmentaire. Afin de compenser les effets de la turbidité sur la fluorescence, une mesure de la transmission est faite à 370 nm, permettant de corriger automatiquement, la part de fluorescence due aux substances jaunes (CDOM). L'excitation des pigments accessoires génère de l'énergie qui est transférée à la chlorophylle *a*, dont l'intensité relative de fluorescence est ensuite détectée à 680 nm. Une fluorescence est attribuée à un type spécifique de pigment accessoire, caractéristique d'un certain groupe phytoplanctonique. Le

Fluoroprobe est capable de distinguer 4 groupes spectraux à la fois (Figure 19) : les « algues bleu-vertes » ou cyanobactéries (à phycocyanine majoritaire), les « algues vertes » ou Chlorophytes (majoritairement), les « algues brunes » ou diatomées (Bacillariophyte), Haptophytes et/ou Dinophytes et un groupe mixte correspondant aux Cryptophytes, mais aussi aux cyanobactéries à phycoérythrine majoritaire. La concentration relative et totale de chaque groupe est alors exprimée en termes de quantité équivalente de chlorophylle *a* par litre (eq $\mu\text{g}.\text{dm}^{-3}$). Le Fluoroprobe est un fluorimètre spectral utilisable en paillasse, sous forme de sonde-profileur ou pour des enregistrements en continu.

L'Algae Online Analyser (AOA) est un fluorimètre spectral spécialement conçu pour l'enregistrement en continu. Afin de faciliter le déploiement en mer d'un système compact de mesure à haute résolution intégrant l'information relative aux groupes spectraux du phytoplancton mais aussi aux paramètres supports à la biologie, cet appareil a été intégré par Alain Lefebvre au Pocket Ferry Box (4H-JENA[®], www.dymaphy.eu) lors des campagnes DYPHYMA.

Une empreinte spécifique aux Haptophytes (Houliez *et al.*, 2012), permettant la détection de *Phaeocystis globosa*, a été enregistrée à la place de l'empreinte constructeur dans les deux types de fluorimètre spectraux utilisés dans cette étude.

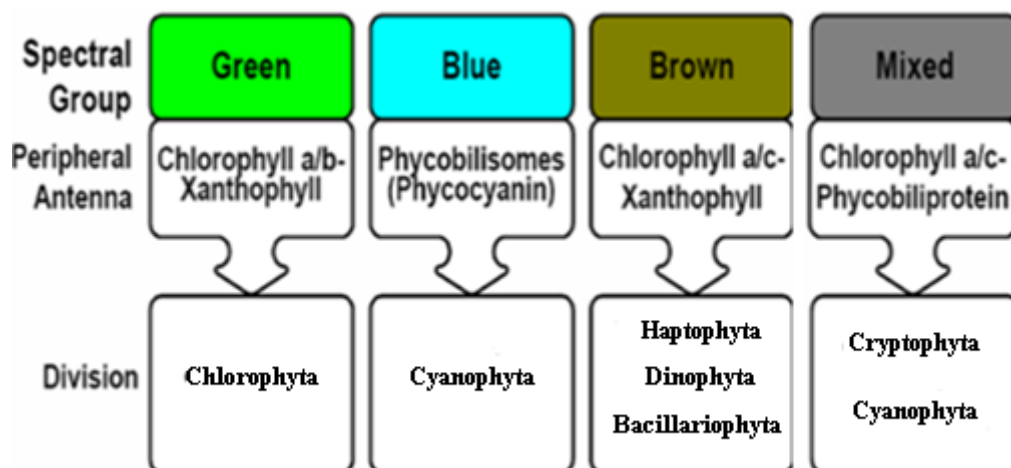


Figure 19. Les différents groupes pigmentaires détectables grâce aux différentes longueurs d'onde (d'après Beutler *et al.* 2002b)

III. Principe élémentaire de la Chromatographie liquide de Haute performance

Pour pallier aux inconvénients de l'approche microscopique traditionnelle, Jeffrey a suggéré pour la première fois l'utilisation des pigments pour l'étude taxonomique du phytoplancton en utilisant la chromatographie à couche mince (Jeffrey, 1961; Jeffrey, 1968). L'identification de nouveaux pigments à partir des souches algales isolées ont mis en évidence le rapport entre groupes phytoplanctoniques et pigments, ainsi chaque année la liste de nouveaux pigments s'allonge, permettant l'identification de nouveaux groupes (Jeffrey *et al.*, 1997 ; Roy *et al.*, 2011). Il a alors été possible de définir des bio-marqueurs capables de représenter des catégories taxonomiques ou fonctionnelles qui soient suffisamment spécifiques et discriminantes d'une classe algale. Ainsi des nouveaux pigments phytoplanctoniques, parmi lesquels nous pouvons citer le prasinoxanthine pour les Pranisophycées (Foss *et al.*, 1984) ou la divinyl-chlorophylle *a* pour les Prochlorophycées (Goericke et Repeta, 1993), ont pu être ajoutés à la liste de classes algales.

Les échantillons d'eau de mer utilisés pour les analyses HPLC (Figure 20) sont issus des mêmes bouteilles Niskin que pour les analyses réalisées au cytomètre en flux et au Fluoroprobe. Les échantillons sont ensuite filtrés sur des filtres Whatman GF/F (diamètre 25 mm) puis en raison de la thermosensibilité et photosensibilité des pigments les échantillons sont conservés à l'abri de la lumière à -80°C jusqu'à leur analyse. Une deuxième filtration est alors effectuée sur des filtres UNiprep Whatman (membrane en PTFE, 0,2 µm). L'extraction des pigments est effectuée de manière mécanique par une baguette en verre pendant 1 min dans une solution de méthanol à 95%. L'analyse de pigments a été réalisée par Nicole Degros (A.I. CNRS) au LOG, en utilisant un système de chromatographie liquide à haute performance (Beckman, RP-HPLC 126) associé à une colonne de chromatographie pour séparation de type C8 (SunfireTM), selon la méthode de Zapata *et al.* (2000). Les pigments séparés sont ensuite détectés optiquement par un spectromètre à barrette de diodes (Beckman, Model 168) à 440 nm pour les chlorophylles et les caroténoïdes. Chaque pigment est identifié par son temps de rétention dans la colonne et son spectre d'absorption. L'appareil est calibré pour chaque pigment par des solutions standard commerciales : Chlorophylle *a* et *b* (Sigma-Aldrich, Munich, Allemagne), Chlorophylle *c*, fucoxanthine, echinenone, 19'-butanoyloxyfucoxanthine, 19'-hexanoyloxyfucoxanthine, peridinine, prasinoxanthine and alloxanthine, produits par VKI (Water Quality Institute Denmark, commercialisées par DHI). La méthode CHEMTAX (Mackey *et al.*, 1997) a été appliquée aux résultats d'HPLC par Luis

Lampert (Lampert, DYNECO/PELAGOS IFREMER Brest, 2014) pour mieux discriminer les classes phytoplanctoniques par des rapports multi-pigmentaires. Cette méthode permet grâce à des analyses factorielles d'obtenir la contribution de chaque classe phytoplanctonique par rapport à la biomasse totale. La matrice de pigments est factorisée en une matrice de rapports pigmentaires et une autre matrice d'abondance de chaque classe algale par échantillon. Une matrice initiale de rapports pigmentaires issus de la littérature est donnée afin de commencer les calculs itératifs. Il est essentiel d'ajuster au mieux les rapports initiaux de ceux qui sont susceptibles d'être rencontrés dans les échantillons, donc avoir la meilleure connaissance possible des classes algales dominantes et leurs rapports pigmentaires.

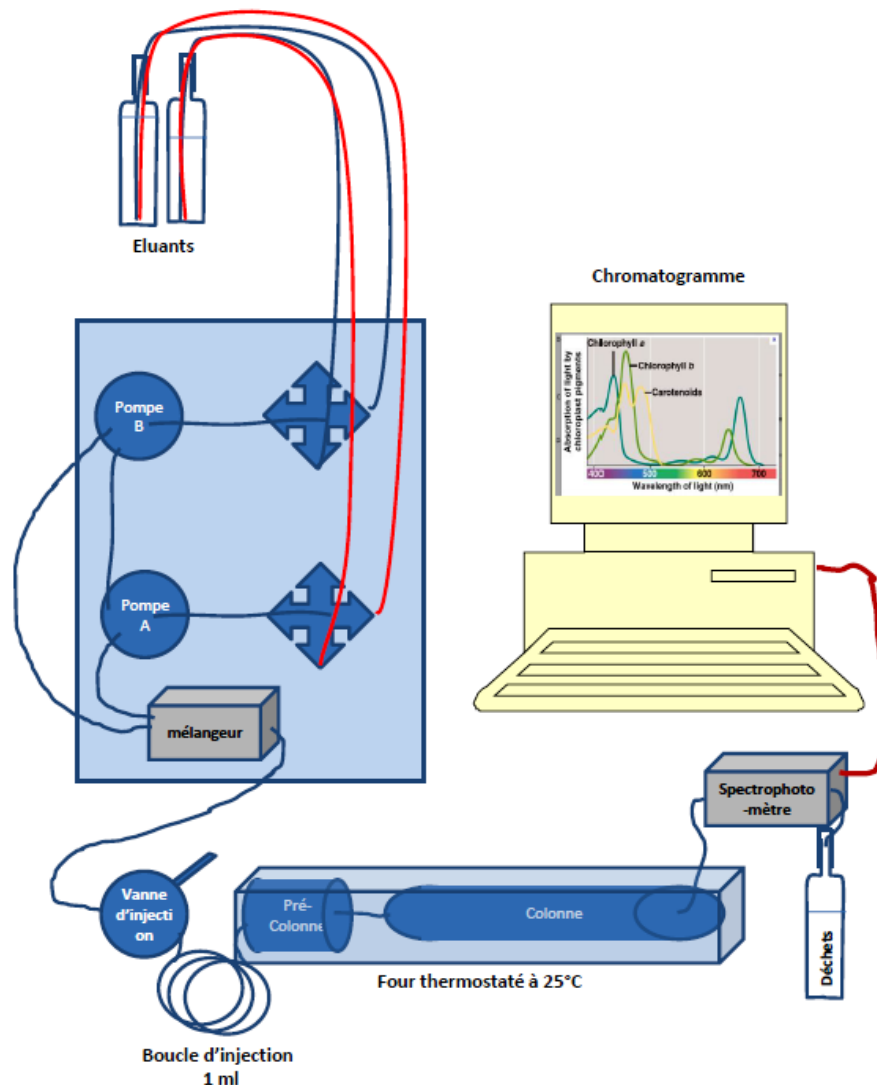


Figure 20. Schéma du système de chromatographie liquide de haute performance (HPLC) utilisé lors des analyses des échantillons d'eau de mer (dessin de Muriel Crovoisier, modifié)

IV. Paramètres physico-chimiques et biologiques

1. Température, salinité, luminosité

Pour les mesures décrites dans les chapitres IV et V, les mesures de température (T ; °C), salinité (S) ont été réalisées *in situ* à l'aide d'une sonde CTD Seabird (SBE 25). La luminosité (PAR ; $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$) a été mesurée par un capteur PAR (QSP 2300, Biospherical Instrument) couplé à la CTD. 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 de prélèvement $z(\text{m})$ en utilisant les données de PAR :

$$E_z = E_0 e^{(-kz)}$$

Où k est la pente de régression linéaire entre $\ln E_z$ et la profondeur de prélèvement z .

Lors des analyses automatisées pendant une campagne océanographique, les paramètres physicochimiques proviennent du Pocket FerryBox (PFB, 4H-JENA©) qui possède des capteurs de température (Pt : 1000) et de salinité (7-conductor cell from Sea&Sun, Germany). La transmission utilisée comme un proxy de la turbidité est mesurée par un capteur (C-star transmissometer, Wet labs) situé sur la sonde CTD Seabird (SBE 25).

2. Sels nutritifs

L'échantillonnage, la mesure et l'étalonnage de référence sont ceux exposés en détail dans Aminot et Kérouel (2004). Le dosage des sels nutritifs a été réalisé (Valérie Gentilhomme, Muriel Crovoisier) à l'aide d'une chaîne de dosage semi-automatique Alliance[®] Integral Futura, selon les protocoles de Tréguer et Le Corre (1975).

3. Chlorophylle a

L'estimation du contenu en Chlorophylle a (Chl a) est faite par fluorimétrie après extraction (Holm-Hansen et Booth, 1966 ; Yentsch et Menzel, 1963). Les concentrations en Chl a ($\mu\text{g}.\text{dm}^{-3}$) sont déterminées d'après les équations de Lorenzen (1966). Les échantillons d'eau de mer ($0,5$ à 1 dm^{-3}) sont filtrés sur des filtres Whatman GF/F ($0,7 \mu\text{m}$ de diamètre). Les filtres

sont ensuite placés à l'obscurité, au congélateur à -20°C . L'extraction des pigments photosynthétiques s'effectue de manière mécanique avec une baguette de verre dans 4 cm^{-3} d'acétone à 90%. Les broyats de filtre sont ensuite centrifugés ($3000\text{ tours min}^{-1}$, 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 à la fois la concentration en chlorophylle *a* et en phaeopigments.

4. Abondance déterminée par microscopie optique

La technique employée pour déterminer la composition phytoplanctonique est le comptage au microscope optique inversé après sédimentation, d'après Utermöhl (1958). Des échantillons de 250 cm^{-3} ont été fixés sur le terrain avec une solution comprenant du Lugol acide (Thronsen, 1978). Ces échantillons ont été préservés à l'obscurité et au froid (4°C) dans l'attente de leur comptage après sédimentation dans des cuves de $10\text{ à }25\text{ cm}^{-3}$ par Fernando Gómez (post-doctorant puis professeur invité au LOG), Camille Blondel (IFREMER), Elsa Breton (LOG).

Chapitre III :

1-Etude du phytoplancton marin à haute fréquence temporelle et haute résolution spatiale en Manche Orientale

Résumé

La distribution spatiale du phytoplancton est soumise aux forçages physiques et biologiques au sein des masses d'eau qui peuvent modifier les assemblages présents. Afin d'obtenir des informations réalistes, il est donc nécessaire d'effectuer un échantillonnage à une fréquence supérieure à la vitesse de déplacement des masses d'eau. Les fluorimètres spectraux, ainsi que les cytomètres en flux (couplés ou pas à des systèmes d'acquisition automatisée d'images) utilisés de manière automatisée permettent d'approcher la variabilité phytoplanctonique à haute fréquence.

La première partie de ce chapitre traite de la distribution spatiale à sub-méso échelle des communautés phytoplanctonique en Manche Orientale observée fin Avril 2012 (campagne DYPHYMA – leg 2). L'objectif de cette campagne océanographique internationale s'insère dans le cadre du projet transfrontalier DYMAPHY qui avait pour but d'améliorer l'opérabilité et l'application de techniques semi-automatisées pour rendre compte de la dynamique à haute résolution spatiale du phytoplancton. L'échantillonnage haute fréquence adopté (une analyse toutes les 10 minutes) a permis d'observer des changements brusques d'abondance sur des distances très faibles, comme au sein d'un gradient côte-large au niveau du Déroit du Pas de Calais ou bien au large de la ville d'Eastbourne, et d'avoir une vision synoptique de la composition phytoplanctonique pendant une période productive (mi-printemps). L'abondance mesurée par le CytoSense, sur l'ensemble du spectre de taille du phytoplancton, a permis de déterminer 4 assemblages (CM) dont les délimitations n'étaient pas régies par les frontières hydrologiques : CM1 et CM2 ont été caractérisés par une grande abondance de *Phaeocystis globosa* (58% et 79% de l'abondance totale respective, avec la domination de cellules haploïdes). Ces assemblages ont été principalement observés sur les côtes françaises. CM3 a été localisé dans les eaux du milieu de la Manche et a été caractérisé par une abondance élevée de picoeucaryotes I (53%) et *Synechococcus* spp (36%). CM4 situé dans les eaux anglaises a également été caractérisé par l'importance des picoeucaryotes I (49%) mais avec moins de *Synechococcus* spp et plus de cellules haploïdes (10%) et diploïdes de *P. globosa* (15%) que dans CM3. Ce travail est le premier spécifiquement dédié à la description synoptique de l'ensemble des communautés phytoplanctoniques de la couche d'eau de subsurface à l'échelle de la Manche Orientale et a notamment caractérisé des zones précises comme les estuaires picards-opale ou les eaux du milieu de la Manche.

La deuxième partie de ce chapitre a consisté à comparer et valider les données acquises par le CytoSense à différentes méthodes d'analyse utilisées lors de la campagne DYPHYMA. Les résultats de cytométrie sont ainsi comparés à ceux obtenus avec des méthodes de référence comme la microscopie optique et l'HPLC et à d'autres méthodes *in vivo* et *in situ* comme la fluorimétrie *in vivo* totale et l'analyse spectrale des groupes phytoplanctoniques (AOA, Fluoroprobe). La complémentarité de ces techniques a été mise en évidence, à commencer par la détermination des abondances cellulaires par cytométrie en flux (très précise au niveau du picoplancton et du nanoplancton) et les comptages et déterminations microscopiques essentiellement focalisées dans le micro et le nanoplancton. L'HPLC qui permet de quantifier les pigments chlorophylliens montre une bonne corrélation avec les données totales de fluorescence rouge (signal Total FLR) du CytoSense par groupe cytométrique. Les données du Fluoroprobe ont été plus difficiles à analyser notamment en raison du plus faible nombre de mesures *in situ* réalisées (en raison du mauvais temps). Il est important de souligner que tant le Fluoroprobe que l'AOA, chez lesquels une empreinte spécifique aux Haptophytes a été enregistrée tendent à surestimer la contribution de *P. globosa* à la fluorescence totale (assimilable à de la chlorophylle *a*), au détriment des autres groupes présents.



High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area, in spring: The eastern English Channel

Simon Bonato^{a,*}, Urania Christaki^a, Alain Lefebvre^b, Fabrice Lizon^c, Melilotus Thyssen^d, Luis Felipe Artigas^a

^a Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, Université du Littoral Côte d'Opale, CNRS UMR 8187 LOG, MREN ULCO, 32 av. Foch, 62930 Wimereux, France

^b Ifremer LER/Boulogne, Laboratoire Environnement Littoral et Ressources Aquacoles, 150 Quai Gambetta BP 699, 62321 Boulogne sur Mer Cedex, France

^c Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, Université des Sciences et Technologies de Lille – Lille 1, CNRS UMR 8187 LOG, Station Marine de Wimereux, 28 av. Foch, 62930 Wimereux, France

^d Aix-Marseille Université, Mediterranean Institute of Oceanography MIO, UM110, CNRS/INSU IRD, 13288 Marseille, Cedex 09, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2014

Accepted 29 December 2014

Available online 10 January 2015

Keywords:

phytoplankton dynamics
high spatial resolution
flow cytometer
red fluorescence

ABSTRACT

The distribution of phytoplankton (from pico-to microphytoplankton) was investigated, at single-cell level and at high spatial resolution, during an oceanographic cruise across the eastern English Channel (EEC) between April 27 and 29, 2012. Seawater was continuously collected from surface waters and analysed on board at high frequency (one sample every 10 min), by using a new generation of pulse-shape recording scanning flow cytometer (CytoSense, Cytobuoy®). A Bray–Curtis matrix analysis based on phytoplankton composition allowed the discrimination of 4 communities. Within these communities, abundance, cell size as well as single cell and total red fluorescence of 8 phytoplankton groups were measured. Picoeukaryotes and *Synechococcus* spp cells dominated the mid Channel and most of the English waters monitored, whereas waters off Eastbourne as well as French coastal waters (under remote and direct estuarine influence) were characterized by the dominance of *Phaeocystis globosa* haploid and diploid cells. Most of the total red fluorescence signal, which correlated with chlorophyll *a* concentrations, was attributable to *P. globosa* and, to a lesser extent, to diatoms. In addition to sub-mesoscale variation within phytoplankton communities, the single-cell features within each phytoplankton group gave information about the physiological status of individual phytoplankton cells.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Phytoplankton micro-organisms, which represent major primary producers and biogeochemical mediators, show a considerable degree of spatial heterogeneity and temporal variability in coastal temperate systems (Cloern, 1996; Jacquet et al., 2002; Sosik et al., 2003; Martin et al., 2005). The variability in phytoplankton abundance, biomass and composition depends on nutrient concentrations (Niraula et al., 2007), light availability and water turbidity (Falkowski et al., 1985), as well as on temperature (Agawin et al., 2000), salinity (Ahel et al., 1996) and turbulence (Margalef et al., 1979; Smayda and Reynolds, 2001). Together with biotic

interactions such as grazing (Sautour et al., 2000; Grattepanche et al., 2011a, b), infection processes (Suttle et al., 1990) and competition/mutualism amongst species (Sazhin et al., 2007), these controlling factors shape phytoplankton community structure and succession in spatial and temporal scales. Phytoplankton monitoring approaches and techniques should be able to address phytoplankton composition and abundance at high frequency, in order to accurately account for the rate of environmental changes which lead to micro-organism patchiness and dynamics in aquatic systems (Cassie, 1963; Martin et al., 2005). In coastal and open marine waters of the eastern English Channel (EEC), phytoplankton dynamics have been investigated by applying classical techniques as microscopy and experimentation (Gómez and Souissi, 2007; Schapira et al., 2008; Lefebvre et al., 2011; Grattepanche et al., 2011a, b; Hernández-Fariñas et al., 2013), pigment (Brunet et al., 1996; Breton et al., 2000) and molecular analysis (Monchy et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: simon.bonato@univ-littoral.fr (S. Bonato).

2012; Christaki et al., 2014). Inverted optical microscopy is the reference tool to assess the community composition of major phytoplankton groups such as diatoms and dinoflagellates and has limitations for cells $<10\ \mu\text{m}$ or fragile cells that could be lost during fixation. Pigment analysis and molecular analysis provide useful information about broad phytoplankton pigmentary groups and whole community diversity, respectively. All of the above techniques are time consuming and cannot be applied to spatial or temporal surveys at high resolution, nor provide real time results. Recently, innovative techniques, such as spectral *in vivo* fluorescence, were applied in marine coastal systems, at high temporal (Houliez et al., 2012) or spatial resolution (Houliez et al., 2013), to follow the dynamics of up to four phytoplankton spectral (pigmentary) groups, including the haptophyte *Phaeocystis globosa*.

Amongst the innovative techniques employed to monitor phytoplankton semi-automatically, flow cytometry (FCM) is a powerful technology to investigate micro-organisms (Dubelaar and Jonker, 2000; Veldhuis and Kraay, 2000). FCM, by analysing single cells at a high rate (several thousand per second), can provide rapid quantifications of phytoplankton cells based on their fluorescence and cell morphological properties (DuRand and Olson, 1996; Rodriguez et al., 1998). Besides cell counting, FCM allows DNA-RNA quantification (Yentsch et al., 1983) per cell, counting of picoplankton and nanoplankton, as well as species or genus-level taxonomical assignments (Blanchot et al., 1997; Grégori et al., 2001). Compared to a conventional FCM, the CytoSense (CytoBuoy®) pulse-shaped recording scanning flow cytometer (SFCM) provides an *in situ* and *in vivo* automated access to phytoplankton dynamics (Dubelaar and Jonker, 2000). It can discriminate between large quantities of cells in a wide size range (1–800 μm), based on their optical properties (Dubelaar et al., 1999), including size, shape, and fluorescence derived parameters, through the recording of each cell's optical profile (Rutten et al., 2005; Thyssen et al., 2008a, b).

In the present study, the efficiency of the CytoSense for resolving fine spatial phytoplankton variability was tested in coastal and offshore surface waters of the EEC from April 27 to 29, 2012 to relate phytoplankton composition and variability to the water mass distribution and associated physicochemical parameters.

2. Material and methods

2.1. Sampling strategy

Sampling was conducted continuously during 54 h, from April 27 to 29, 2012, in the eastern English Channel (EEC) waters (Fig. 1), onboard the 'RV Côtes de la Manche' (CNRS INSU), during the DYPHYMA cruise. The vessel average speed was of about 5 knots. Marine water was pumped from 2 m depth at 1 bar and brought up to a flow stabilizer chamber continuously at a rate from 200 to 300 mL per minute. Phytoplankton single cell variables (abundance, fluorescence and size) were recorded every 10 min during 9 min (1 min to stop and flush the system before starting the next analysis). In 9 min, the boat (which travelled at a speed of 5 knots), had crossed 1.5 km. This means that the cytometry data corresponds to a mean abundance covering this distance. Temperature and salinity were recorded every 1 min by using a "Pocket" Ferry-Box (4H-JENA/GKSS) associated to a Temperature sensor (Pt: 1000) and a salinity sensor (7-conductor cell from Sea&Sun, Germany).

2.2. Chlorophyll *a*, nutrients and turbidity

Discrete samples were taken with Niskin bottles at 15 stations from 2 m depth (Fig. 1) to analyse chlorophyll *a*, nutrients as well as

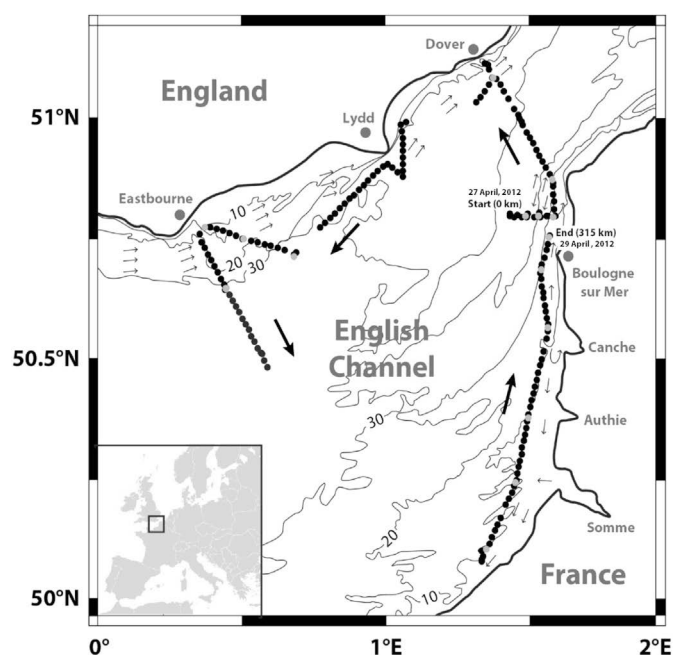


Fig. 1. Study area and location of the sampling stations, in the eastern English Channel (EEC) during the DYPHYMA cruise, from April 27 to 29, 2012. The ship sailed 315 km from "Start" to "End", anticlockwise. The grey circled dots correspond to nutrients, chlorophyll *a* and phytoplankton counts sampling stations. The grey arrows indicate the main current direction according to the tide conditions.

for performing microscopic counts. Chlorophyll *a* (chl *a*) was estimated by extractive fluorometry (Yentsch and Menzel, 1963) using a Turner Designs fluorometer (Model 10-AU). Chl *a* concentration was measured before and after acidification with HCl, according to Lorenzen (1966). Nutrient samples (NO_3^- , PO_4^{3-} , $\text{Si}(\text{OH})_4$) were taken and directly frozen on board after sampling (10 mL). Analysis was performed using the *Integral Futura autoanalyser* system (Alliance Instruments) with a detection limit of 0.04 and 0.08 μmol , for NO_3^- and PO_4^{3-} , respectively. CTD (Seabird SBE 25) profiles were also carried out to measure temperature, conductivity, total fluorescence, as well as transmittance, as a proxy of turbidity (C-star transmissometer, Wet labs).

2.3. Flow cytometry

Phytoplankton unfixed cells were analysed with the CytoSense Benchtop pulse-shape recording scanning flow cytometer (SFCM, CytoBuoy b.v., Netherlands), with a laser excitation wavelength of 488 nm, 20 mW. Single cells were characterized according to their different optical characteristics: sideward angle scatter (SWS), forward scatter (FWS) and red (FLR), orange (FLO) and yellow (FLY) fluorescence. Each cell passes through the laser beam (5 μm width) at a rate of 2 m s^{-1} . The CytoSense analyses a wide range of phytoplankton cells (from 1 μm to $\sim 800\ \mu\text{m}$). Fluorescent beads of 3 μm (Cyto-Cal™) and 10 μm (Polybead®) in diameter were used every 12 h to normalize the SFCM fluorescence and size recording. Data recording was triggered on the red fluorescence signal (i.e. 10 mV) for 6–8 min depending on the event rate. Samples were analysed with the Cytoclus® software and phytoplankton clusters were manually classified. Clusters were selected by taking into account the amplitude and the shape of the different optical signals. In addition to 5 average signal heights for forward scatter (FWS), sideward scatter (SWS) and for three fluorescence signals: red (FLR), orange (FLO) and yellow (FLY), some simple mathematical parameters were assigned to each signal shape: inertia, fill

factor, asymmetry, number of peaks, length, apparent size (FWS; Dubelaar et al., 2004). All these values were plotted into several two dimensional cytograms that facilitated the manual identification of clusters of cells sharing similar optical properties. The area under the red fluorescence curve signal per cell is related to the chlorophyll *a* fluorescence emission. Within the present study, there was a significant correlation between total red fluorescence and chl *a* concentration ($n = 15$, $r^2 = 0.81$, $p < 0.001$). Total red fluorescence per cluster and per unit of volume (TFLR cm^{-3}) was calculated using the red fluorescence curve per cell, and the absolute cluster concentrations given by the SFCM. TFLR cm^{-3} was used to estimate the contribution of each cluster to the total fluorescence by summing up the TFLR cm^{-3} of each cluster. Cell size was estimated using calibration beads according to the following equations:

$$(\text{Correction Factor}) = (\text{Real beads size} / \text{Measured beads size}) \quad (1)$$

$$[\text{Estimated Particles size } (\mu\text{m})] = \frac{(\text{Measured Particles size} * \text{Correction Factor})}{(1)} \quad (2)$$

The whole size range of phytoplankton cells was calibrated using beads of 3 μm (Cyto-Cal™) and 10 μm (Polybead®).

2.4. Phytoplankton discrimination by flow cytometry

Eight clusters (Fig. 2) were determined by SFCM according to the optical properties of cells or particles and attributed to *Synechococcus* spp, two clusters of picoeukaryotes, Cryptophytes, coccolithophores, microphytoplankton and *Phaeocystis globosa* haploid and diploid cells. However, SFCM considers particles, which can be single cells as well as colonies, which are mainly represented in the microphytoplankton cluster, and so microphytoplankton cell abundance is underestimated. According to microscopy counting (Gómez and Blondel, unpublished data) performed at some discrete stations (Fig. 1), microphytoplankton was mainly composed of diatoms (98%), most of them in a colonial form. No significant correlation was found between microphytoplankton FCM and microscopic abundance because FCM is based on particle counts. Therefore, colonies are considered and subsequently counted as one single particle, the same as single cells, whereas microscopic observations refer to cells, whether they be in a colonial or a single cell form. However a significant correlation ($p < 0.05$; $r^2 = 0.70$) was found between *P. globosa* (haploid and diploid) FCM and microscopic counts.

Diatoms showed the highest FLR and FWS signals because this group comprises large and rich chlorophyll *a* cells or colonies (Fig. 2A). According to previous SFCM studies in EEC waters and the North Sea (Rutten, 2005; Guiselin, 2010; Houliez et al., 2012), *Phaeocystis globosa* haploid and *P. globosa* diploid cells are characterized by lower FLR and FWS signals than those of microphytoplankton cells or colonies (Fig. 2A). *P. globosa* diploid cells showed higher FLR and FWS signals than *P. globosa* haploid cells. Picoeukaryotes were the smallest eukaryotic cells (<2 μm) and as a consequence they also showed low FLR and FWS signals (Fig. 2A). Picoeukaryotes I and picoeukaryotes II were differentiated from each other based on the amplitude of their red fluorescence signal, which was assumed to be due to more chlorophyll *a* content in picoeukaryotes II than in picoeukaryotes I. Picoeukaryotes II were also less fluorescent and smaller than *P. globosa* haploid and *P. globosa* diploid cells. Coccolithophores (Fig. 2B) were well characterized by flow cytometry since, although they have the same FLR and FWS signals as *P. globosa* haploid and diploid cells, their SWS signal is higher due to their CaCO_3 platelet coverings (Olson et al., 1989). The *Synechococcus* spp cluster showed a characteristic signature with low FWS

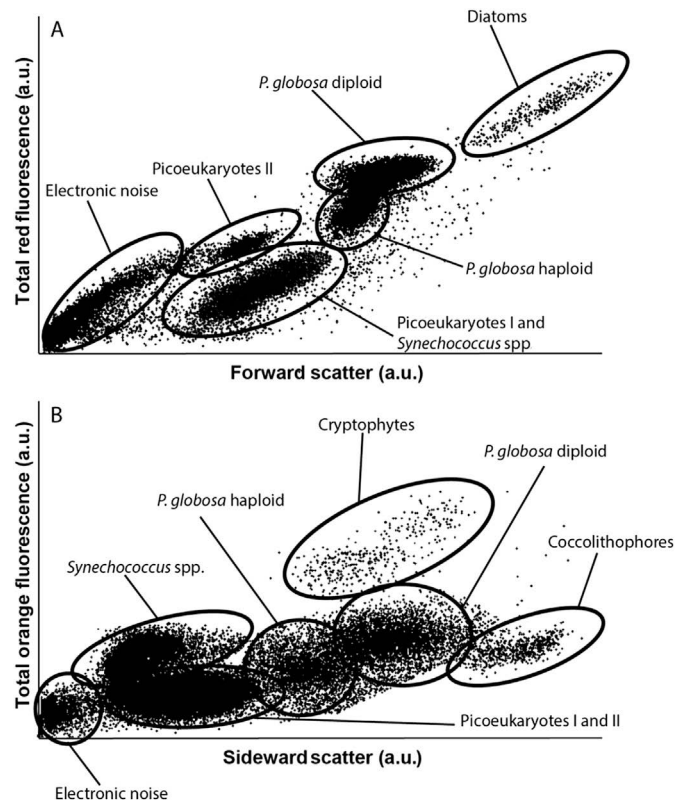


Fig. 2. SFCM (CytoSense) cytograms and clusters defined in the EEC during the DYPHYMA cruise. A. Red fluorescence area per cell (a.u.) vs FWS length per cell (a.u.) cytogram, in which picoeukaryotes I and II, *Phaeocystis globosa* haploid/diploid and diatoms are discriminated. B. Orange fluorescence area per cell (a.u.) vs SWS per cell (a.u.) cytogram, in which cryptophytes, coccolithophores and *Synechococcus* spp are discriminated.

because its the very small size and a peak in orange fluorescence (FLO) caused by its high content of phycoerythrin (Fig. 2B). Cryptophytes were large cells and contained high amounts of phycoerythrin per cell (Olson et al., 1989), which produced higher FLO and FWS signals than those of *Synechococcus* spp (Fig. 2B).

2.5. Statistical analysis

The water mass discrimination was carried out based on the temperature and salinity data and using a T/S diagram. Phytoplankton data from different samples were compared using the Plymouth routines in multivariate ecological research (PRIMER v.6) software package (Clarke and Gorley, 2006). The Bray–Curtis dissimilarity index was applied to test the similarities between stations and define phytoplankton communities using the Ward method, which consists in aggregating two clusters so that the increment of within-inertia is minimized at each step of the algorithm. The within-inertia defines the homogeneity of a cluster (Husson et al., 2010). The package FactoMineR (Lê et al., 2008) with software R.2.11.1 was used to apply the Ward method. An analysis of similarities (one-ways ANOSIM) was used to test the significance of differences between phytoplankton communities.

3. Results

3.1. Hydrological parameters

The ship track was superimposed on the map of temperature (Fig. 3A) and salinity (Fig. 3B). Relatively low fresh water inflow

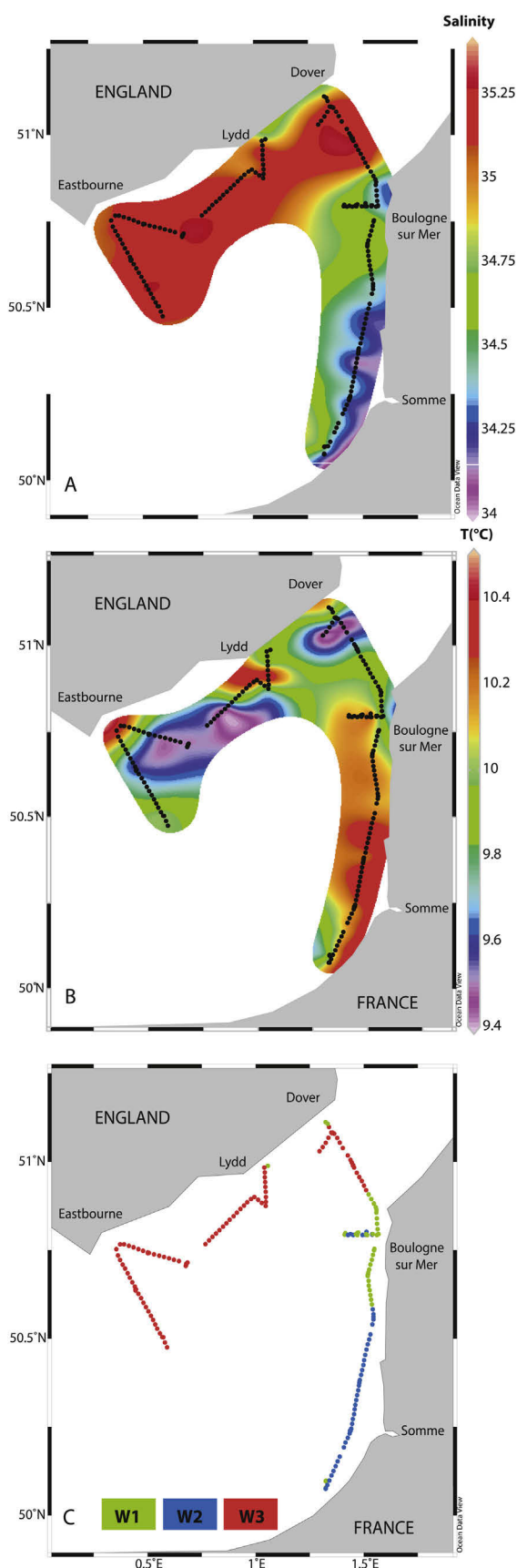


Fig. 3. Characteristics of the different water masses defined during the DYPHYMA cruise in the EEC. A. Surface salinity. B. Surface temperature (°C). C. Water masses which were discriminated from the salinity vs temperature diagramm: W1 (●), W2

characterized the English EEC coast, whereas the influence of local or remote estuaries indicated on Fig. 1 (the Seine ($563 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$), the Somme ($35 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$), the Authie ($10 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) and the Canche ($11 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$), in annual daily flow average) was evidenced in the French Coast of EEC and could explain the difference in salinity and temperature observed between the French and English coastal waters. While the highest values of salinity were measured in English coastal waters and in mid-Channel waters with a maximum of 35.30, the lowest values of salinity were located in French coastal waters (i.e. 34.08). The lowest temperatures were measured in English offshore waters with a minimum of 9.41°C off Dover while the highest temperatures were measured in coastal waters with a maximum of 10.42°C , close to Eastbourne (Fig. 3B). The cruise track crossed three water masses labelled W1, W2 and W3 defined on the basis of their temperature and salinity features (T/S diagram not shown). Their average hydrological values and nutrient contents are reported in Table 1 and their location is represented in Fig. 3C. NO_3^- concentration varied from the detection limit up to $3.83 \mu\text{mol L}^{-1}$. PO_4^{3-} values varied from the detection limit and $0.65 \mu\text{mol L}^{-1}$. The highest concentrations in NO_3^- and PO_4^{3-} were observed in W3, off Eastbourne. The Redfield $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ ratio (Redfield et al., 1963) values varied between 0.25 and 30. All values were <16 during the cruise except between Lydd and Eastbourne within W3 where it reached values of 30. Unfortunately, $\text{Si}(\text{OH})_4$ analyses were discarded due to analytical problems. The highest values of attenuation of light (transmittance) were obtained in W2 and the lowest values in W1 (Table 1).

3.2. Phytoplankton abundance and total red fluorescence

An important spatial heterogeneity in phytoplankton distribution was observed all along the sampling area (Fig. 4A). The effect of the time of the day during sampling, which was tested by ANOSIM, was found not significant ($p > 0.05$). *Phaeocystis globosa* haploid and diploid cells were the most concentrated groups in most W1 and in W2 waters, ranging between approx. 25×10^2 and $33 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$. Picoeukaryotes I and *Synechococcus* spp were the most abundant phytoplankton groups in W3 waters with average values of $62 \times 10^2 \pm 49 \times 10^2 \text{ cells mL}^{-1}$ for picoeukaryotes I and $34 \times 10^2 \pm 31 \times 10^2 \text{ cells mL}^{-1}$ for *Synechococcus* spp. W3 was also characterized by the occurrence of other groups such as coccolithophores ($243 \pm 140 \text{ cells mL}^{-1}$) and Cryptophytes ($130 \pm 80 \text{ cells mL}^{-1}$). Picoeukaryotes II and diatoms were more abundant in W1 and in W2 waters than in W3 waters, with an average abundance of about $1300 \text{ cells mL}^{-1}$ and $150 \text{ cells mL}^{-1}$ respectively.

The continuous recording by SFCM (Fig. 4A) revealed a sharp change in composition and in abundance at low spatial scale. In fact, two main peaks of total phytoplankton cell numbers were detected in W3 waters, one near the English coast ($25 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$, $\sim 120 \text{ km}$ from the starting point) and one in mid EEC waters ($35 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$, $\sim 150 \text{ km}$ from starting point). High total phytoplankton cell numbers were also recorded in W2 with values of $33 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ near the Canche estuary (295 km from the starting point) as well as at the transition between W1 with W3 ($40 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$, $\sim 25 \text{ km}$ from starting point). These abundance peaks were mainly composed by picoeukaryotes I and *Synechococcus* spp, except at 120 km from the start, where *Phaeocystis globosa* haploid cells were more abundant than *Synechococcus* spp and at 295 km where *P. globosa* haploid was the dominant group.

(●) and W3 (●). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Average values of transmittance, salinity, temperature and nutrients for each water and mass defined by temperature and salinity data.

	Average values $\pm$ standard deviation				
	Transmittance (%)	Salinity	Temperature ($^{\circ}$ C)	NO ₃ (μ mol L ⁻¹)	PO ₄ (μ mol L ⁻¹)
W1	80.60 $\pm$ 3.67	34.58 $\pm$ 0.13	9.97 $\pm$ 0.12	0.16 $\pm$ 0.26	0.29 $\pm$ 0.14
W2	73.90 $\pm$ 5.15	34.31 $\pm$ 0.09	10.18 $\pm$ 0.09	0.48 $\pm$ 0.58	0.09 $\pm$ 0.05
W3	88.90 $\pm$ 4.92	35.14 $\pm$ 0.07	10.03 $\pm$ 0.27	1.94 $\pm$ 1.80	0.35 $\pm$ 0.24

The highest values in total red fluorescence, used as a proxy for phytoplankton chlorophyll *a* content, were observed in W1 and W2 waters (Fig. 4B), with a maximum of 7×10^5 a.u. mL⁻¹ by 240 km from the start, and high values off the Canche estuary ($>6 \times 10^5$ a.u. mL⁻¹). *Phaeocystis globosa* diploid cells and diatoms were responsible for most of the total red fluorescence (Fig. 4B) in all three water masses (W1, W2 and W3), except in mid-Channel waters (150 km from the start) where picoeukaryotes I, coccolithophores, Cryptophytes and *Synechococcus* spp represented up to 50% of the total red fluorescence. Except for some areas (e.g. 120–140 km, where *P. globosa* diploid fluorescence was high in spite of their cell abundance), W3 waters were characterized by the lowest total red fluorescence values (lower than 10^5 a.u. mL⁻¹).

3.3. Phytoplankton community structure

The distribution of phytoplankton clusters was not necessarily compliant with that of the three identified water masses. As a result

of the Bray–Curtis matrix coupled to Ward's classification method applied to the whole continuous-recorded phytoplankton abundance dataset, 4 phytoplankton communities were identified during the transect ($p < 0.05$; Fig. 5). Communities CM1 and CM2 were mainly located in French coastal and offshore waters as well as off Eastbourne (CM1). CM3 was located in EEC offshore waters. CM4 characterized mainly the English coastal waters of the EEC, as well as offshore French waters by the Strait of Dover. Except in French coastal waters under direct estuarine influence, the transition between communities was sometimes sharp in relatively short distances, as measured in French coastal waters near the Strait of Dover with all communities describe on a short spatial scale: CM2 in coastal waters, CM4 in offshore waters and CM3 in mid-Channel waters. The patchy distribution of phytoplankton communities was also represented, off Eastbourne, where CM1, CM4 and CM3 alternated within a few kilometres, showing no evident correlation with the physicochemical parameters measured.

Phytoplankton communities CM1 and CM2 were characterized (Fig. 6) by high abundance of *Phaeocystis globosa* (58% and 79% of the total abundance, respectively, with the dominance of haploid cells). Picoeukaryotes II and diatoms (to a lesser extent) were more represented in CM2 than in CM1 (Fig. 6). CM3 was characterized by a high contribution of picoeukaryotes I (53%) and *Synechococcus* spp (36%). CM4 was also characterized by picoeukaryotes I (49%) but with less *Synechococcus* spp and more haploid (10%) and diploid *P. globosa* cells (15%) than in CM3.

Diatoms, together with *Phaeocystis globosa* haploid and diploid cells contributed to most of the total red fluorescence (Fig. 4B). Their highest values were observed in CM2 and CM1 (Table 2)

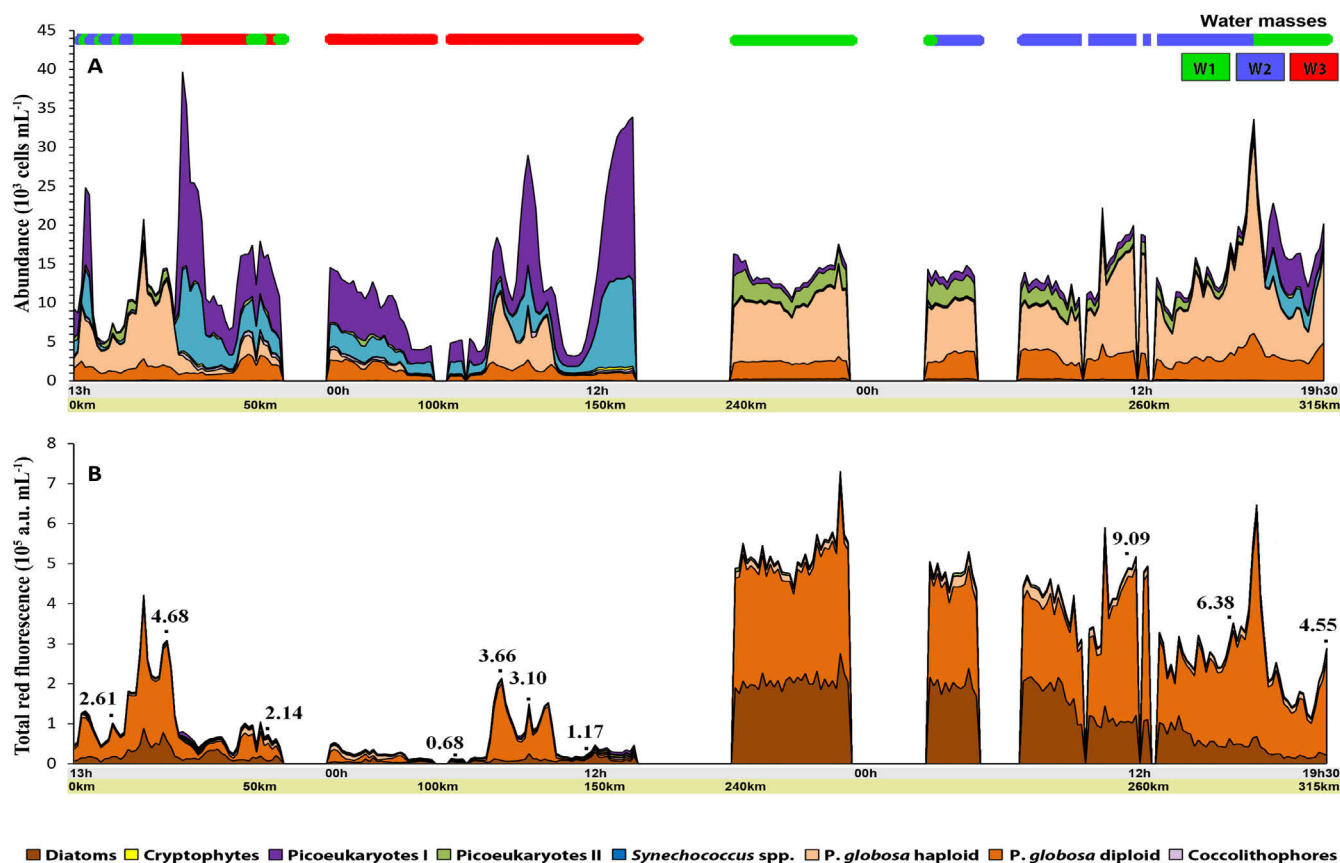


Fig. 4. Spatio-temporal phytoplankton variability measured by SFCM during the DYPHYMA cruise. A. Phytoplankton abundance (cells mL⁻¹). B. Phytoplankton total red fluorescence (10^5 a.u. mL⁻¹) and chlorophyll *a* (μ g L⁻¹) concentrations (figures). The water masses are superimposed: W1 (●), W2 (●) and W3 (●). The X-axis indicates the distance (km) covered and the time (GMT). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

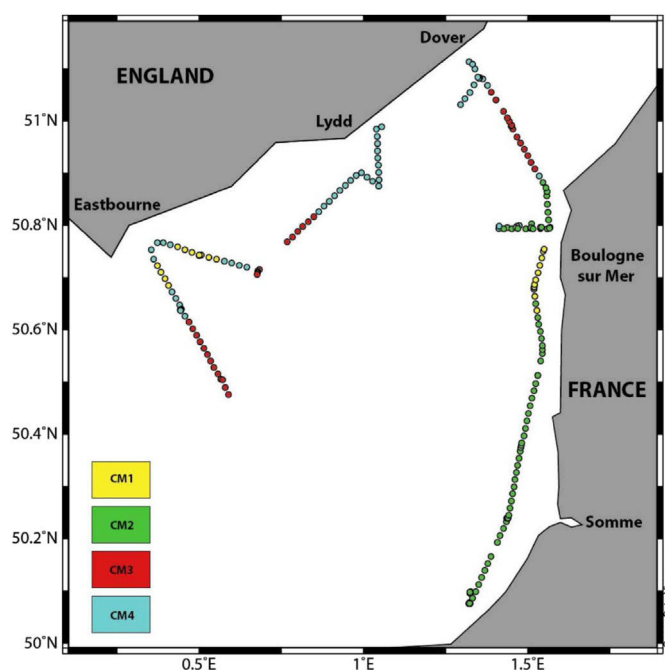


Fig. 5. Location of the different phytoplankton assemblages, in the EEC, during the DYPHYMA cruise. Each colour corresponds to a different phytoplankton community structure by applying the Bray–Curtis dissimilarity index coupled to the Ward method based on phytoplankton composition from CytoSense. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

confirming the contribution of diatoms and *P. globosa* haploid and diploid clusters to the total chlorophyll concentration. Within CM3, which was characterized by the lowest total red fluorescence, *Synechococcus* spp, Cryptophytes, picoeukaryotes I and coccolithophores reached their highest red fluorescence values (Table 2).

Red fluorescence per cell, normalized by cell size, was also calculated (Table 3). The aim of normalization was to avoid a size effect. The highest values of normalized red fluorescence per cell were not necessarily measured in the clusters representing the highest total red fluorescence. CM3 showed the highest values of red fluorescence per cell measured in most of the phytoplankton groups (except for *Phaeocystis globosa* haploid and diploid cells). For picoeukaryotes I, picoeukaryotes II, *Synechococcus* spp and diatoms cells, the lowest values of red fluorescence per cell were measured within the CM2, exclusively in coastal French waters directly influenced by estuarine inputs. On the contrary, *P. globosa* haploid and diploid cells reached their highest values of normalized red fluorescence within the CM2, which also represented maximum abundance.

4. Discussion

4.1. Water masses and physicochemical conditions

In the present study, three water masses were defined in the EEC waters along the 315 km explored within the DYPHYMA cruise, based on salinity and temperature. High salinity values were observed within water mass W3 (Fig. 3), which should correspond to Atlantic waters which are channelled towards the North Sea (Quisthoudt et al., 1987), as was also stated by Salomon and Breton (1993) and Guegueniat et al. (1995). French EEC coastal waters (W1 and W2) can be defined as a coastal ecosystem receiving large freshwater inputs from local and remote rivers. The physical

parameters observed during the cruise were in line with previous studies in the eastern and central English Channel at this time of the year (Brylinski, 1991; Napoléon et al., 2012; Houliez et al., 2013). French EEC coastal waters, named ‘coastal flow’ (Brylinski et al., 1991) receive river inputs along the coast from the Bay of the Seine up to the Cape Gris-Nez (Strait of Dover). The ‘coastal flow’ is rich in suspended matter and macronutrients mainly brought locally by the Somme, the Authie and the Canche rivers. In fact, the lowest values of transmittance were found in this area, while the highest values were located in the mid-Channel and in English coastal waters. In order to complete our understanding of nutrient conditions during the period of our cruise, considering that NH_4^+ could not be measured and DSi concentrations were discarded because of analytical problems, nutrient values were retrieved from local coastal monitoring programs. The sites off the Somme estuary and Boulogne sur Mer (Regional Nutrients Monitoring Network, SRN; Nzigou and Lefebvre, 2013) were sampled a week before and after the cruise. DIN, DIP and DSi concentrations from SRN were, in both sites, ≤ 1.2 , ≤ 0.22 and $\leq 1.74 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. All nutrient concentrations retrieved from local monitoring networks were in the same range than DIN and DIP measured during our cruise. According to Lefebvre et al. (2011) in winter conditions, DIN, DIP and DSi values usually range from 15 to 50, 3 to 4 and 10 to $4 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, then decreasing during the rest of the year. The nutrients conditions measured during the cruise are typically associated with the end of a spring bloom in EEC waters (Brunet et al., 1992; Lancelot, 1995; Lefebvre et al., 2011; Grattepanche et al., 2011a, b; Napoléon et al., 2012).

4.2. Phytoplankton spatial distribution

Sharp shifts in phytoplankton abundance were observed at the sub mesoscale (1–10 km). The direct influence of the Somme (~260 km from start) and the Canche (295 km from start) estuaries was marked by an increase in phytoplankton abundance and total red fluorescence (Fig. 5). In fact, phytoplankton benefited from direct nutrient inputs from local rivers (the lowest salinities of the cruise were measured in the area). In the coastal French EEC waters, the community was mainly composed of nanophytoplankton as *Phaeocystis globosa* (CM1 and CM2), whereas in English and mid Channel waters, small-cells as picoeukaryotes and *Synechococcus* spp (CM3 and CM4) were dominant in terms of abundance. Temperature and salinity continuously measured during the cruise could not explain alone the transitions between the different community structures.

Previous studies at low frequency in French EEC coastal waters (Breton et al., 2000; Gómez and Souissi, 2007; Schapira et al., 2008; Lefebvre et al., 2011; Grattepanche et al., 2011a, b; Hernández-Fariñas et al., 2013) indicate the dominance of *Phaeocystis globosa* and diatoms in terms of abundance and biomass from late winter to mid-late spring. Within the first leg of the DYPHYMA cruise (April 20, 2012; data not shown) an abundance of *P. globosa* diploid cells of $20 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ and *P. globosa* haploid cells of $9 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ were counted by SFCM in French coastal waters. One week later (the present study), *P. globosa* diploid cell abundance (in the same areas and at the same scale) had dropped to approximately $6 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ while *P. globosa* haploid cells increased up to $25 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$. This change in dominance between the two life-forms of *P. globosa* coupled to the low nutrient concentrations measured in EEC waters within both cruises indicate, in agreement with previous studies (Rousseau et al., 1994; Peperzak et al., 2000; Rousseau et al., 2007; Guiselin, 2010), the end of a spring bloom, at least in the French coastal EEC waters (characterized by both CM1 and CM2).

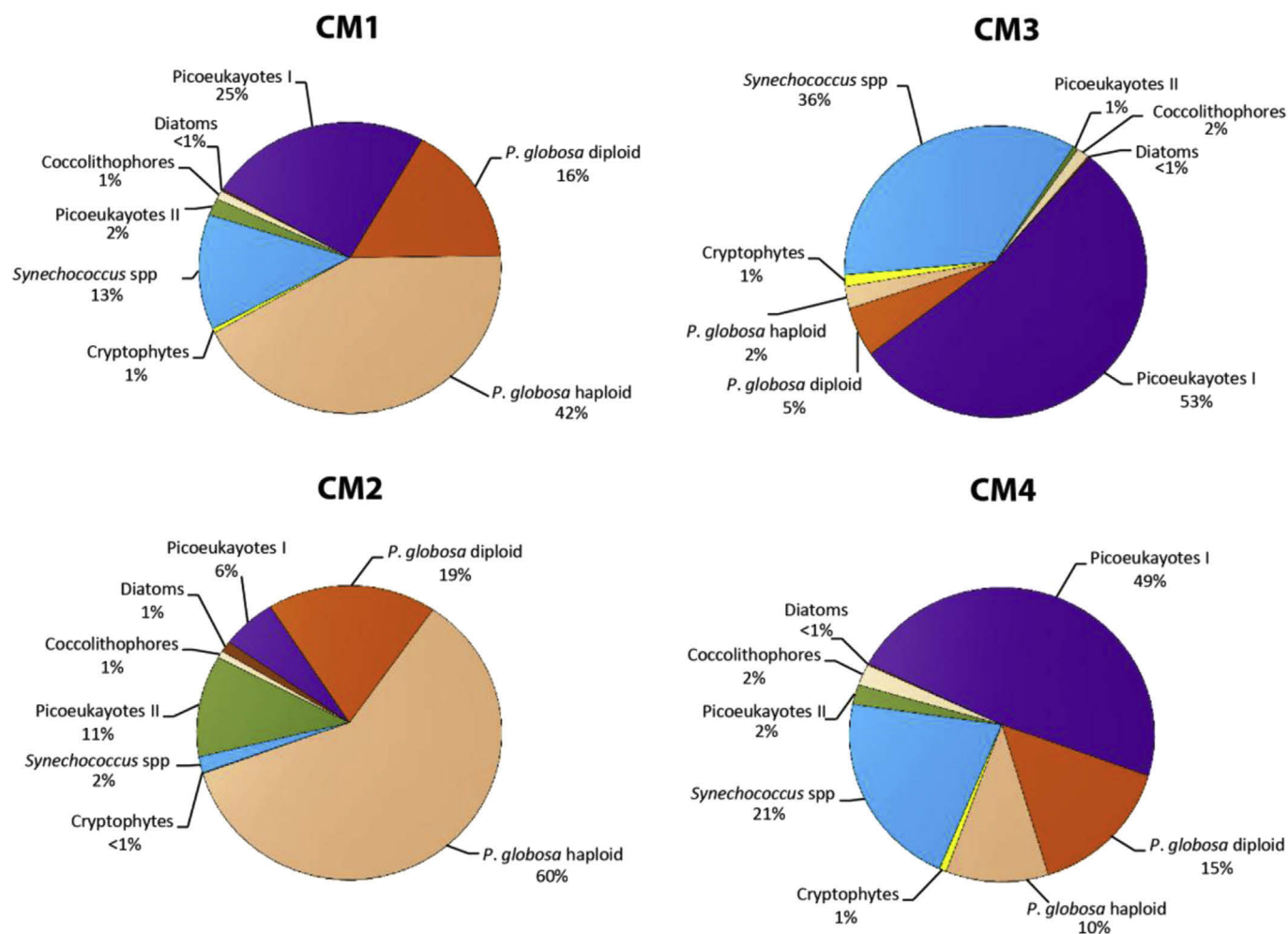


Fig. 6. Relative average contribution of phytoplankton abundance (%) from all station measured by SFCM within each phytoplankton community. CM1: Community 1. CM2: Community 2. CM3: Community 3. CM4: Community 4.

4.3. Water mass characterization based on phytoplankton community structure

In reference to Cebrián and Valiela's classification (1999), the waters characterized by a high phytoplankton biomass peak in spring or in summer due to high nutrient concentrations, as in Biscayne Bay ($\text{DIN}_{\text{max}} = 0.05 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{Chl } a = 4.8 \text{ mg Chl m}^{-3}$; Roman et al., 1983) or in Newport Estuary ($\text{DIN}_{\text{max}} = 0.08 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{Chl } a = 9.5 \text{ mg Chl m}^{-3}$; Thayer, 1971), can be defined as an Enclosed Coastal Ecosystem (ECE), whereas the waters characterized by a

high phytoplankton biomass peak in winter or fall as in Banyuls coast (Ibarra, 1981) could be considered as an Open Coastal Ecosystem (OCE).

Considering nutrient, chlorophyll *a* and phytoplankton concentrations reported in the area by previous seasonal and inter-annual studies (Gómez and Souissi, 2007; Lefebvre et al., 2011; Hernández-Fariñas et al., 2013), as well as the red fluorescence dynamics and chlorophyll *a* concentrations described in the present study, French EEC coastal waters under direct estuarine influence can indeed be defined as an Enclosed Coastal Ecosystem

Table 2
Average red fluorescence (a.u. mL^{-1}), with its standard deviation, for each phytoplankton cluster, within each community structure (CM). The letters in superscript indicate their ranking values.

	CM	Average values (10^3) $\pm$ standard deviation (10^3)			
		Diatoms	<i>Phaeocystis</i> diploid	<i>Phaeocystis</i> haploid	Coccolithophores
Total red fluorescence (a.u. mL^{-1})	1	13.27 ± 68.68^b	123.35 ± 48.02^b	10.58 ± 4.8^a	1.01 ± 0.19^b
	2	122.65 ± 74.99^a	232.99 ± 87.95^a	15.17 ± 7.00^a	0.73 ± 0.50^b
	3	13.02 ± 9.53^b	10.42 ± 11.66^c	3.74 ± 0.99^d	1.51 ± 1.06^a
	4	8.51 ± 5.16^b	25.28 ± 27.13^c	7.56 ± 3.46^c	1.70 ± 0.97^a
		Cryptophytes	<i>Synechococcus</i> spp	Picoeukaryotes II	Picoeukaryotes I
	1	0.72 ± 0.52^c	0.23 ± 0.08^b	0.67 ± 0.28^b	1.63 ± 0.66^c
	2	0.17 ± 0.13^d	0.03 ± 0.05^c	3.65 ± 2.11^a	0.40 ± 0.30^d
	3	2.74 ± 1.22^a	0.78 ± 0.52^a	0.19 ± 0.22^b	3.56 ± 2.64^a
	4	0.99 ± 0.52^b	0.32 ± 0.17^b	0.60 ± 0.45^b	2.48 ± 1.36^b

Table 3

Average red fluorescence per cell (a.u.) normalized by its size (with its standard deviation) for each phytoplankton group, within each community structure (CM). The letters in superscript indicate its ranking value.

	CM	Average values $\pm$ standard deviation			
		Diatoms	<i>Phaeocystis</i> diploid	<i>Phaeocystis</i> haploid	Coccolithophores
Red fluorescence per cell (a.u.)	1	6.12 $\pm$ 5.19 ^b	10.11 $\pm$ 4.50 ^b	1.21 $\pm$ 0.14 ^b	0.94 $\pm$ 0.18 ^a
	2	3.80 $\pm$ 0.80 ^c	15.66 $\pm$ 5.16 ^a	1.43 $\pm$ 0.40 ^a	0.81 $\pm$ 0.17 ^b
	3	10.25 $\pm$ 4.85 ^a	1.76 $\pm$ 1.97 ^c	1.20 $\pm$ 0.12 ^b	0.90 $\pm$ 0.19 ^a
	4	9.75 $\pm$ 6.23 ^a	2.29 $\pm$ 2.66 ^c	1.16 $\pm$ 0.14 ^b	0.86 $\pm$ 0.16 ^{ab}
		Cryptophytes	<i>Synechococcus</i> spp	Picoeukaryotes II	Picoeukaryotes I
	1	1.19 $\pm$ 0.41 ^c	5.10 ⁻² $\pm$ 3.10 ^{-3b}	0.85 $\pm$ 0.46 ^{ab}	0.19 $\pm$ 0.09 ^a
	2	1.88 $\pm$ 1.09 ^{ab}	4.10 ⁻² $\pm$ 6.10 ^{-3c}	0.80 $\pm$ 0.13 ^b	0.17 $\pm$ 0.04 ^b
	3	1.93 $\pm$ 0.12 ^a	6.10 ⁻² $\pm$ 6.10 ^{-3a}	0.93 $\pm$ 0.41 ^a	0.20 $\pm$ 0.04 ^a
	4	1.60 $\pm$ 0.89 ^b	5.10 ⁻² $\pm$ 8.10 ^{-3b}	0.86 $\pm$ 0.45 ^{ab}	0.17 $\pm$ 0.05 ^{ab}

(ECE), whereas English as well as mid-Channel waters, could be considered as an Open Coastal Ecosystem (OCE). In the English coastal waters of the central English Channel (off Portsmouth), previously investigated during a seasonal cycle by Napoléon et al. (2012), the phytoplankton biomass reached its peak between November and March, earlier than when observed in French coastal waters (Guiselin, 2010; Houliez et al., 2013). In the event that CM1 and CM2 characterized an ending bloom stage within an ECE during our DYPHYMA cruise, then CM3 and CM4 would have mainly characterized a more advanced post-bloom stage within an OCE, with a phytoplankton community structure mainly composed of small cells. Different stages of the spring blooms are often dominated by phytoplankton of different sizes. The traditional view is that post-bloom periods are dominated by small cells like picoplankton (Riegman et al., 1993; Kiorboe, 1993). Indeed, small algae are better competitors than larger species when the nutrient concentration is low (Smith and Kalff, 1982; Grover, 1989; Riegman et al., 1993), confirming that most Eastern English Channel waters are favourable to the occurrence and predominance of small phytoplankton species at this specific time of the year.

4.4. The single-cell features variability

The single-cell features within each phytoplankton group, such as fluorescence per cell, can provide information about the physiological state of cells (Olson et al., 2000; Thyssen et al., 2008a, 2009). Within the CM2 community structure (characterizing exclusively ECE in French coastal waters), *Phaeocystis globosa* haploid and diploid cells showed the highest values of red fluorescence (Table 3) while the lowest values were measured in CM3 and CM4 (characterizing OCE). As red fluorescence can be considered as a proxy of chlorophyll *a* content, then the *P. globosa* cellular chlorophyll *a* content is probably higher in more turbid waters. The impact of turbidity has been abundantly described for phytoplankton (Cloern, 1987; Quisthoudt, 1987; Behrenfeld et al., 2004). To compensate for reduced light due to high suspended matter concentration in coastal waters, phytoplankton cells tend to increase their pigment content (MacIntyre et al., 2000; Moore et al., 2006). The *P. globosa* development is limited by light availability in French coastal waters under estuarine influence (characterized by CM2) in comparison with offshore and mid-Channel waters (mainly characterized by CM3 and CM4). However, the good photoacclimation of *P. globosa* cells at low light could explain their maintenance in this area.

5. Conclusion

The use of scanning flow cytometry as a high frequency continuous recording system made it possible to draw a synoptic picture of phytoplankton composition and distribution, at a single-

cell level and high spatial resolution, in the eastern English Channel. Moreover, the device used in this study, which is designed for phytoplankton analysis, offered the possibility for real time monitoring of the *in situ* cell size and fluorescence from pico- to micro-phytoplankton. Size classes and functional groups were characterized and gathered into four community structures which were not always ascribed to single water masses. In addition, phytoplankton taxonomic and functional diversity needs the most accurate and objective discrimination and classification of cytometric data to avoid misinterpretations as well as incomplete analysis and identification of clusters, which could be prevented by using a combination of semi-automated classification tools (Caillault et al., 2009; Malkassian et al., 2011). Finally, the accurate assessment of phytoplankton dynamics at sub-mesoscale depends on the possibility of addressing physicochemical, hydrological as well as physiological features at high frequency too.

Acknowledgements

We thank the captain and the crew of the RV “Côtes de la Manche” (INSU-CNRS) for their help during the cruise. Vincent Cornille and Marine Verne are acknowledged for their technical assistance during the sampling and water filtration for chlorophyll *a* analyses, Eric Lécuyer for treatment of CTD data. We thank Morgane Didry and Marine Verne for chlorophyll *a* analyses and Valérie Gentilhomme for laboratory measurements of nutrient concentrations. Acknowledgments are due to Fernando Gómez and Camille Blondel for providing us with their microscopic counts, as well as to Mathias Broutin for his help drawing the maps. We thank the two anonymous reviewers for their comments and suggestions for improving the original version of the ms, as well as Dr. Luff for English correction. This study was part of the DYPHYMA cruise (2nd leg) supported by the DYMAPHY (INTERREG IVA “2 Mers Seas Zeeën”) project (www.dymaphy.eu) co-funded by the European Regional Development Funds (ERDF). S. Bonato is supported by a Ph.D. grant co-funded by the DYMAPHY project and the “Syndicat Mixte de la Côte d’Opale” (SMCO).

References

- Agawin, N.S., Duarte, C.M., Agustí, S., 2000. Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnol. Oceanogr.* 45, 591–600.
- Ahel, M., Barlow, R.G., Mantoura, R.F.C., 1996. Effect of salinity gradients on the distribution of phytoplankton pigments in a stratified estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 143, 289–295.
- Behrenfeld, M.J., Prasil, O., Babin, M., Bruyant, F., 2004. In search of physiological basis for covariations in light-limited and light-saturated photosynthesis. *J. Phycol.* 40, 4–25.
- Blanchot, J., André, J.-M., Navarette, C., Neveux, J., 1997. Picophytoplankton dynamics in the equatorial Pacific: diel cycling from flow-cytometer observations. *Comptes Rendus Académie Sci. Ser. III Sci. Vie* 320, 925–931.

- Breton, E., Brunet, C., Sautour, B., Brylinski, J.-M., 2000. Annual variations of phytoplankton biomass in the Eastern English Channel: comparison by pigment signatures and microscopic counts. *J. Plankton Res.* 22, 1423–1440.
- Brunet, C., Brylinski, J.M., Frontier, S., 1992. Productivity photosynthetic pigments and hydrology in the coastal front of the Eastern English Channel. *J. Plankton Res.* 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. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 43, 469–483.
- Brylinski, J.M., 1991. Le “fleuve cotier”: un phénomène hydrologique important en Manche orientale (exemple du Pas-de-Calais). *Oceanol. Acta* 11, 197–203.
- Caillault, É., Hébert, P.-A., Wacquet, G., 2009. Dissimilarity-based classification of multidimensional signals by conjoint elastic matching: application to phytoplanktonic species recognition. In: Palmer Brown, D., Draganova, C., Pimenidis, E., Mouratidis, H. (Eds.), *Engineering Applications of Neural Networks*. Springer, Berlin; Heidelberg, pp. 153–164.
- Cassie, R.M., 1963. In: Barnes, H. (Ed.), *Microdistribution of Plankton*. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 1, 223–252.
- Cebrián, J., Valiela, I., 1999. Seasonal patterns in phytoplankton biomass in coastal ecosystems. *J. Plankton Res.* 21, 429–442.
- Christaki, U., Kormas, K.A., Genitsaris, S., Georges, C., Sime-Ngando, T., Viscogliosi, E., Monchy, S., 2014. Winter-summer succession of unicellular eukaryotes in mesoeutrophic coastal system. *Microb. Ecol.* 67, 13–23. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-013-0290>.
- Clarke, K.R., Gorley, R.N., 2006. *PRIMER v6: User Manual/Tutorial*. PRIMER-E, Plymouth.
- Cloern, J.E., 1996. Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: a review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Rev. Geophys.* 34 (2), 127–168.
- Cloern, J.E., 1987. Turbidity as a control on phytoplankton biomass and productivity in estuaries. *Cont. Shelf Res.* 7, 1367–1381.
- Dubelaar, G.B.J., Gerritzen, P.L., Beeker, A.E.R., Jonker, R.R., Tangen, K., 1999. Design and first results of CytoBuoy: a wireless flow cytometer for in situ analysis of marine and fresh waters. *Cytometry* 37, 247–254.
- Dubelaar, G.B.J., Jonker, R.R., 2000. Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. *Sci. Mar.* 64, 135–156.
- Dubelaar, G.B.J., Geerders, P.J.F., Jonker, R.R., 2004. High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics. *J. Environ. Monit.* 6, 946–952.
- DuRand, M.D., Olson, R.J., 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 Res.* II 43, 891–906.
- Falkowski, P.G., Dubinsky, Z., Wyman, K., 1985. Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 30, 311–321.
- Gómez, F., Souissi, S., 2007. Unusual diatoms linked to climatic events in the northeastern English Channel. *J. Sea Res.* 58, 283–290.
- Grattepanche, J.-D., Breton, E., Brylinski, J.-M., Lecuyer, E., Christaki, U., 2011a. Succession of primary producers and micrograzers in a coastal ecosystem dominated by *Phaeocystis globosa* blooms. *J. Plankton Res.* 33, 37–50.
- Grattepanche, J.-D., Vincent, D., Breton, E., Christaki, U., 2011b. Microzooplankton herbivory during the diatom-*Phaeocystis* spring succession in the eastern English Channel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 404, 87–97.
- 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.
- Grover, J.P., 1989. Influence of cell shape and size on algal competitive ability. *J. Phycol.* 25, 402–405.
- Guegueniat, P., du Bois, P.B., Salomon, J.C., Masson, M., Cabioch, L., 1995. FLUX-MANCHE radiotracers measurements: a contribution to the dynamics of the English Channel and North Sea. *J. Mar. Syst.* 6, 483–494.
- Guiselin, N., 2010. Caractérisation des événements phytoplanktoniques en zone côtière : test des techniques alternative et développement d'indicateurs de qualité des masses d'eau (PhD thesis in Biological Oceanography). Université du Littoral Côte d'Opale, France, p. 183.
- Hernández-Farías, T., Soudant, D., Barillé, L., Belin, C., Lefebvre, A., Bacher, C., 2013. Temporal Changes in the Phytoplankton Community along the French Coast of the Eastern English Channel and the Southern Bight of the North Sea. <http://dx.doi.org/10.1093/icesjms/fst192>.
- Houliet, E., Lizon, F., Thyssen, M., Artigas, L.F., Schmitt, F.G., 2012. Spectral fluorometric characterization of haptophyte dynamics using the FluoroProbe: an application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *J. Plankton Res.* 34, 136–151.
- Houliet, E., Lizon, F., Artigas, L.F., Lefebvre, S., Schmitt, F.G., 2013. Spatio-temporal variability of phytoplankton photosynthetic activity in a macrotidal ecosystem (the Strait of Dover, eastern English Channel). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 129, 37–48.
- Husson, F., Josse, J., Pages, J., 2010. Principal Component Methods – Hierarchical Clustering – Partitional Clustering: Why Would We Need to Choose for Visualizing Data? Technical Report Agrocampus.
- Ibarra, S., 1981. Contributions relatives du micro-nanophytoplancton à la production primaire dans une zone côtière de méditerranée nord-occidentale. *Vie Milieu* 31, 119–128.
- Jacquet, S., Prieur, L., Avois-Jacquet, C., Lennon, J.-F., Vaulot, D., 2002. Short-time-scale variability of picophytoplankton abundance and cellular parameters in surface waters of the Alboran Sea (western Mediterranean). *J. Plankton Res.* 24, 635–651.
- Kiorbe, T., 1993. Turbulence, phytoplankton cell size, and structure of pelagic food webs. *Adv. Mar. Biol.* 29, 1–72.
- Lancelot, C., 1995. The mucilage phenomenon in the continental coastal waters of the North Sea. *Sci. Total Environ.* 165, 83–102.
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 1–18.
- Lefebvre, A., Guiselin, N., Barbet, F., Artigas, L.F., 2011. Long-term hydrological and phytoplankton monitoring (1992–2007) of three potentially eutrophic systems in the eastern English Channel and the Southern Bight of the North Sea. *ICES J. Mar. Sci.* 68, 2029–2043.
- Lorenzen, C.J., 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep Sea Res. Oceanogr. Abstr.* 13, 223–227.
- MacIntyre, H.L., Kana, T.M., Geider, R.J., 2000. The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. *Trends Plant Sci.* 5, 12–17.
- Malkasian, A., Nerini, D., van Dijk, M.A., Thyssen, M., Mante, C., Gregori, G., 2011. Functional analysis and classification of phytoplankton based on data from an automated flow cytometer. *Cytom. A* 79, 263–275. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.21035>.
- Margalef, R., Estrada, M., Blasco, D., 1979. Functional morphology of organisms involved in red tides, as adapted to decaying turbulence. In: Taylor, D.L., Seliger, H.H. (Eds.), *Toxic Dinoflagellate Blooms*. Elsevier/North-Holland, New York, pp. 89–94.
- Martin, A.P., Zubkov, M.V., Burkill, P.H., Holland, R.J., 2005. Extreme spatial variability in marine picoplankton and its consequences for interpreting Eulerian time-series. *Biol. Lett.* 1, 366–369.
- Monchy, S., Grattepanche, J.-D., Breton, E., Dionigia, M., Sancier, G., Chabé, M., Delhaes, L., Viscogliosi, E., Sime-Ngando, T., Christaki, U., 2012. Microplanktonic community structure in a coastal system relative to a *Phaeocystis* bloom inferred from morphological and tag pyrosequencing methods. *Plos ONE* 7 (6), e39924. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0039924>.
- Moore, C.M., Suggett, D.J., Hickman, A.E., Kim, Y.-N., Tweddle, J.F., Sharples, J., Geider, R.J., Holligan, P.M., 2006. Phytoplankton photoacclimation and photoadaptation in response to environmental gradients in a shelf sea. *Limnol. Oceanogr.* 51, 936–949.
- Napoléon, C., Raimbault, V., Fiant, L., Riou, P., Lefebvre, S., Lampert, L., Clauquin, P., 2012. Spatiotemporal dynamics of physicochemical and photosynthetic parameters in the central English Channel. *J. Sea Res.* 69, 43–52.
- Niraula, M.P., Casareto, B.E., Lan Smith, S., Hanai, T., Suzuki, Y., 2007. Examining the effects of nutrients on the composition and size of phytoplankton using unaltered deep-sea waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 348, 23–32.
- Nzigou, A.-R., Lefebvre, A., 2013. The regional Nutrients Monitoring Network of the Coastal Zone of the Nord Pas-de-Calais Picardie Region. Annual report for 2012.
- Olson, R.J., Sosik, H.M., Chekalyuk, A.M., Shalapyonok, A., 2000. Effects of iron enrichment on phytoplankton in the Southern Ocean during late summer: active fluorescence and flow cytometric analyses. *Deep Sea Res.* II 47, 3181–3200.
- Olson, R.J., Zettler, E.R., Anderson, O.K., 1989. Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry* 10, 636–643.
- 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.
- Quisthoudt, C., Bentley, D., Brylinski, J.M., 1987. Discontinuité hydrobiologique dans le détroit du Pas-de-Calais. *J. Plankton Res.* 9, 995–1002.
- Quisthoudt, C., 1987. Production primaire phytoplanktonique dans le détroit du Pays-de-Calais (France): variations spatiales et annuelles au large du Cap Gris-Nez. *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. 3 Sci. Vie* 304, 245–250.
- Redfield, A.C., Ketchum, B.H., Richards, F.A., 1963. The influence of organisms on the composition of sea water. In: Hill, M.N. (Ed.), *The Sea*, vol. 2. Wiley (Interscience), New York, pp. 26–27.
- Riegman, R., Kuipers, B.R., Noordeloos, A.A.M., Witte, H.J., 1993. Size-differential control of phytoplankton and the structure of plankton communities. *Neth. J. Sea Res.* 31, 255–265.
- Rodriguez, J., Blanco, J.M., Jiménez-Gómez, F., Echevarria, F., Gil, J., Rodriguez, V., Ruiz, J., Bautista, B., Guerrero, F., 1998. Patterns in the size structure of the phytoplankton community in the deep fluorescence maximum of the Alboran Sea (southwestern Mediterranean). *Deep Sea Res.* Part 45, 1577–1593.
- Roman, M.R., Reeve, M.R., Froggatt, J.L., 1983. Carbon production and export from Biscayne Bay, Florida. I. Temporal patterns in primary production, seston and zooplankton. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 17, 45–59.
- Rousseau, V., Chretiennot-Dinct, M.-J., Jacobsen, A., Verity, P., Whipple, S., 2007. The life cycle of *Phaeocystis*: state of knowledge and presumptive role in ecology. *Biogeochemistry* 83, 29–47.
- Rousseau, V., Vaulot, D., Casotti, R., Cariou, V., Lenz, J., Junkel, J., Baumann, M., 1994. The life cycle of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae): evidence and hypothesis. In: Lancelot, C., Wassmann, P. (Eds.), *Ecology of Phaeocystis-dominated Ecosystems*. *J. Mar. Syst.* 5, 23–39.
- Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T., 2005. Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: a successful approach? *Cytom. Part A* 64A, 16–26.
- Sazhin, A.F., Artigas, L.F., Nejstgaard, J.C., Frischer, M.E., 2007. The colonization of two *Phaeocystis* species (Prymnesiophyceae) by pennate diatoms and other protists: a significant contribution to colony biomass. *Biogeochemistry* 83, 137–145.

- Salomon, J.-C., Breton, M., 1993. An atlas of long-term currents in the channel. *Oceanol. Acta* 16, 439–448.
- Sautour, B., Artigas, L.F., Delmas, D., Herbland, A., Laborde, P., 2000. Grazing impact of micro- and mesozooplankton during a spring situation in coastal waters off the Gironde estuary. *J. Plankton Res.* 22, 531–552.
- Schapira, M., Vincent, D., Gentilhomme, V., Seuront, L., 2008. Temporal patterns of phytoplankton assemblages, size spectra and diversity during the wane of a *Phaeocystis globosa* spring bloom in hydrologically contrasted coastal waters. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 88, 649–662.
- Smayda, T.J., Reynolds, C.S., 2001. Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. *J. Plankton Res.* 23, 447–461.
- Smith, R.E.H., Kalff, J., 1982. Size-dependant phosphorus uptake kinetics and cell quota in phytoplankton. *J. Phycol.* 18, 275–284.
- Sosik, H.M., Olson, R.J., Neubert, M.G., Shalapyonok, A., 2003. Growth rates of coastal phytoplankton from time-series measurements with a submersible flow cytometer. *Limnol. Oceanogr.* 48 (5), 1756–1765.
- Suttle, C.A., Chan, A.M., Cottrell, M.T., 1990. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature* 347, 467–469.
- Thayer, G.W., 1971. Phytoplankton production and the distribution of nutrients in a shallow unstratified estuarine system near Beaufort. N.C. *Chesapeake Sci.* 12, 240–253.
- Thyssen, M., Mathieu, D., Garcia, N., Denis, M., 2008a. Short-term variation of phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged flow cytometer. *J. Plankton Res.* 30, 1027–1040.
- Thyssen, M., Tarran, G.A., Zubkov, M.V., Holland, R.J., Grégori, G., Burkill, P.H., Denis, M., 2008b. The emergence of automated high-frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability. *J. Plankton Res.* 30, 333–343.
- Thyssen, M., Garcia, N., Denis, M., 2009. Sub meso scale phytoplankton distribution in the North East Atlantic surface waters determined with an automated flow cytometer. *Biogeosciences* 6, 569–583.
- Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W., 2000. Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Sci. Mar.* 64, 121–134.
- Yentsch, C.M., Horan, P.K., Muirhead, K., Dortch, Q., Haugen, E., Legendre, L., Murphy, L.S., Perry, M.J., Phinney, D.A., Pomponi, S.A., 1983. Flow cytometry and cell sorting: a technique for analysis and sorting of aquatic particles. *Limnol. Oceanogr.* 28, 1275–1280.
- Yentsch, C.S., Menzel, D.W., 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep Sea Res. Oceanogr. Abstr.* 10, 221–231.

Chapitre III :

2-Intercomparaison de techniques d'analyse du phytoplancton marin (Campagne DYPHYMA)

I. Introduction

Dans cette section nous proposons de comparer les résultats obtenus par cytométrie en flux (FCM, Cytosense, Cytobuoy) à des techniques de référence comme la microscopie optique et l'analyse pigmentaire par HPLC, et à des techniques innovantes d'approche *in vivo* et *in situ* comme la fluorimétrie spectrale (de type Fluoroprobe, AlgaeOnlineAnalyser, bbe-Moldaenke).

Toutes ces méthodes sont complémentaires. Si la microscopie optique reste la référence en termes de discrimination et de classification pour les cellules $>10\ \mu\text{m}$, elle ne permet pas de distinguer les espèces picoplanctoniques et est peu fiable pour ce qui est des comptages du nanoplancton. De plus, la reproductibilité des résultats dépend fortement de l'expérience de l'opérateur et la durée et conditions requises pour l'analyse permettent difficilement de faire de la haute fréquence et certainement pas des estimations d'abondance en temps réel.

Par ailleurs, chaque groupe phytoplanctonique est caractérisé par des pigments photosynthétiques accessoires et possède donc des spectres de fluorescence distincts, ce qui permet d'utiliser l'analyse pigmentaire pour révéler la structure de l'ensemble de la communauté phytoplanctonique étudiée. En partant de ce principe, il a alors été possible de définir des bio-marqueurs (pigments estimés par Chromatographie Liquide à Haute Performance-HPLC) capables de représenter des catégories taxonomiques ou fonctionnelles qui soient suffisamment spécifiques et discriminantes d'une classe algale (Jeffrey *et al.*, 2011).

La fluorimétrie *in vivo*, totale et spectrale, permet d'acquérir rapidement un résultat quant au contenu en chlorophylle *a* et à la répartition des principaux groupes spectraux (associés aux groupes pigmentaires). Le niveau de précision est bien entendu différent mais permet d'avoir une approche taxonomique préliminaire en temps réel. Le Fluoroprobe (bbe-Moldaenke) est un fluorimètre spectral qui a été utilisé en mode paillasse lors des campagnes DYPHYMA, alors que l'AOA a permis de mesurer en continu et en temps réel la fluorescence chlorophyllienne des cellules phytoplanctoniques.

II. Matériels et Méthodes

Les analyses microscopiques ont été effectuées sur des échantillons discrets (stations DPM) des campagnes DYPHYMA (Figure 21) lors du Leg 2, au laboratoire LOG de Wimereux et à l'IFREMER Centre Manche-Mer du Nord (Boulogne sur mer). Les échantillons ont été prélevés en sub-surface grâce à des bouteilles Niskin, puis ils ont été fixés directement sur place avec de la glutaraldéhyde.

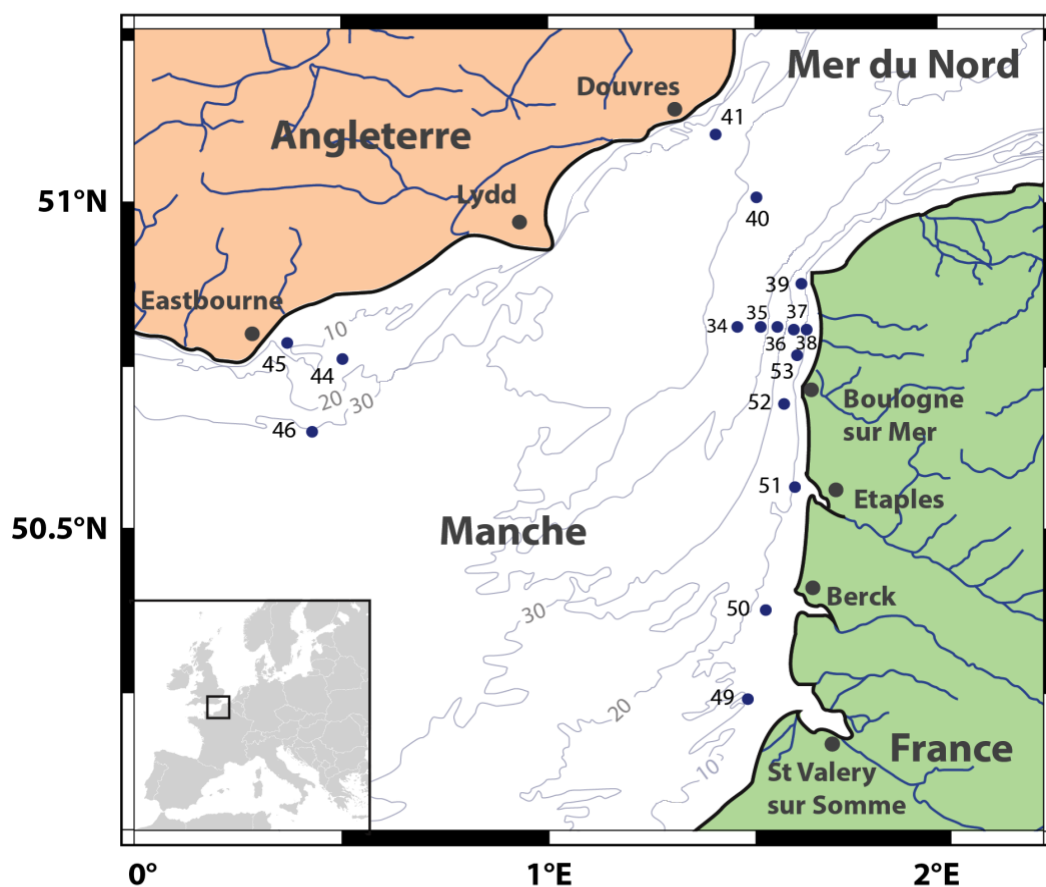


Figure 21. Localisation des stations discrètes (DPM) effectuées au cours du Leg 2 (27-29 Avril, 2012) de la campagne DYPHYMA (Projet INTERREG IV A « 2 Mers » DYMAPHY)

Les prélèvements pour l'HPLC ont été également réalisés sur des échantillons discrets (DPM) puis analysés au laboratoire LOG de Wimereux, avec la méthode mise au point par Zapata (Zapata *et al.*, 2000). Les analyses des données pigmentaires ont ensuite été réalisées par le laboratoire DYNECO-PELAGOS d'IFREMER (résultats détaillés dans le rapport de Lampert, 2014) en utilisant la méthode CHEMTAX (Mackey *et al.*, 1997 ; Matériel et Méthodes). Les

classes algales résolues par CHEMTAX sont : Diatomées, Dinoflagellés, Chlorophytes, Cyanobactéries, Cryptophytes, Coccolitophoridées et *Phaeocystis* sp. (Lampert, 2014).

Les données de l'Algae Online Analyser (A.O.A., bbe Moldaenke[®]) sont issues de l'enregistrement en continu effectué lors du Leg 2 de la campagne océanographique DYPHYMA (Chapite III-1). En complément, des profils ont été réalisés sur des stations de mesure (DPM, Figure 21) au moyen du Fluoroprobe (seules les données de surface sont prises en compte dans cette étude).

III. Résultats - Discussion

1. Abondance cellulaire mesurée par microscopie optique et cytométrie en flux

En premier lieu, nous constatons que les abondances cellulaires sont la plupart du temps sous-estimées par la technique microscopique, en raison de la difficulté de compter correctement les micro-organismes nanoplanctoniques et l'impossibilité de détecter le picoplancton (*Synechococcus* spp., picoeucaryotes). Afin d'avoir une meilleure vision des deux techniques, seuls *Phaeocystis globosa* et le microphytoplancton (assimilé à des diatomées pour ce qui est du CytoSense) sont conservés (Figure 22).

Les observations obtenues par microscopie optique présentent un nombre de groupes taxonomiques identifiés similaires. Toutefois, le peu de données communes ainsi que des différences d'estimation d'abondance de certains groupes par les experts assurant les comptages, rendent difficile une intercomparaison exhaustive des résultats. Les comptages réalisés par cytométrie en flux, révèlent une dynamique cellulaire de *P. globosa* similaire (non testée statistiquement) à l'approche microscopique, et mettent en évidence des maxima atteints en face des estuaires picards et de la Côte d'Opale côté français (DPM 49 à 53) et des minima localisés côté Anglais et dans le détroit du Pas de Calais (DPM 40 à 46).

La microscopie optique a mis en évidence la sous-estimation des diatomées par les comptages cytométriques, ce qui peut être expliqué en grande partie par le fait que le cytomètre en flux utilisé (CytoSense) permet à la base d'estimer un nombre de particules mais ne peut pas, avec

le logiciel d'exploitation fourni avec l'instrument, réaliser un comptage des cellules au sein des colonies. La concentration cellulaire des espèces en colonies est ainsi sous-estimée par cette méthode. De plus, le CytoSense n'aura analysé que quelques cm^{-3} d'échantillon à un seuil de 10 mV, favorisant une détection préférentielle des petites particules au dépend des grosses particules, moins abondantes dans la colonne d'eau. Au contraire les comptages microscopiques qui ont concentré entre 10 et 25 cm^{-3} , favorisent une meilleure représentation des grosses particules.

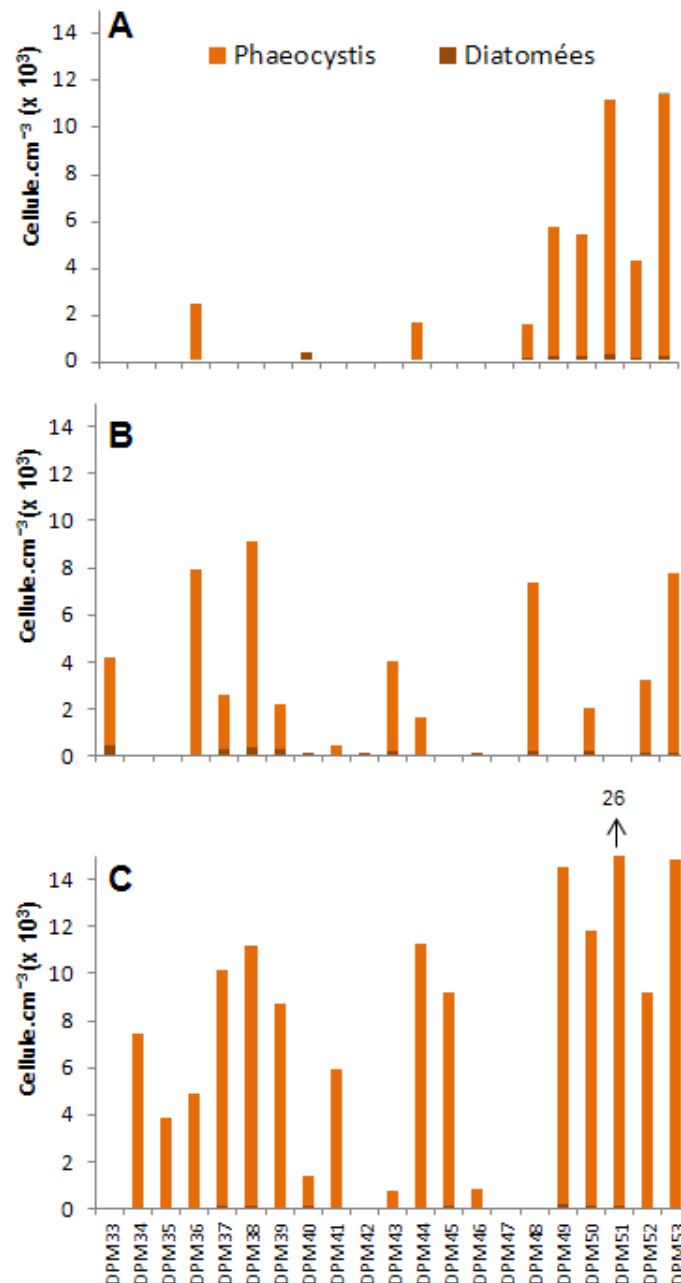


Figure 22. Abondance cellulaire des groupes phytoplanctoniques résolus par microscopie optique (diatomées et *Phaeocystis globosa*), à l'IFREMER (A), au LOG (B), et par cytométrie en flux – CytoSense (C) – campagne DYPHYMA – Leg 2, Manche Orientale, 27-29 avril 2012

2. Groupes pigmentaires déterminés par HPLC-CHEMTAX et le CytoSense

Les groupes pigmentaires détectés par la méthode CHEMTAX (Figure 23A) sont majoritairement dominés par les diatomées et *Phaeocystis* sp. Lors de la campagne de fin avril 2012, les diatomées représentaient en moyenne 25% de la chlorophylle *a* totale dans les eaux françaises, tandis que du côté anglais elles comptaient pour 50% de la chlorophylle *a* totale. A l'inverse, *Phaeocystis* dominait avec 61% les eaux françaises, alors qu'il ne représentait que 36% dans les eaux côtières anglaises. Cette forte dominance s'explique par le bloom printanier de *Phaeocystis globosa* en Manche Orientale, principalement au niveau des côtes françaises (mais pas exclusivement) également mis en évidence par microscopie optique. Les dominances moyennes des dinoflagellés n'ont pas dépassé 3%. Cependant des valeurs isolées supérieures à 10% sont présentes au niveau des côtes françaises à la station DPM52. Les Coccolithophoridés ont été répartis de façon homogène en avril avec des dominances moyennes d'environ 4% sur l'ensemble des zones d'études. Les Cryptophytes représentaient par secteur entre 1 et 5% des pigments. Les plus forts pourcentages ont été observés au large des côtes anglaises, où la plus forte valeur individuelle est identifiée à la station DPM43, les Cryptophytes contribuant pour 16% au contenu pigmentaire. Les algues vertes, probablement des Chlorophytes, ont été très peu représentées dans l'ensemble de la Manche Orientale (entre 0 et 3%), seul un échantillon arbore une valeur d'environ 10% (DPM 46). A l'image des Chlorophytes, les Cyanobactéries étaient très minoritaires avec des dominances de l'ordre de 1% sur l'ensemble des zones échantillonnées et avec des dominances maximales individuelles de 6% (DPM 52).

Il se dégage de ces résultats la nette dominance de *Phaeocystis* et des diatomées en cette période d'efflorescence printanière, sur les côtes françaises ainsi que sur quelques stations des eaux anglaises. Les autres classes algales restent très minoritaires face aux diatomées et *Phaeocystis*, avec des valeurs de contribution inférieures à 10%. Il est toutefois intéressant de noter qu'une forte variabilité est observée par station sur les différentes classes phytoplanctoniques, et ce des deux cotés de la Manche Orientale.

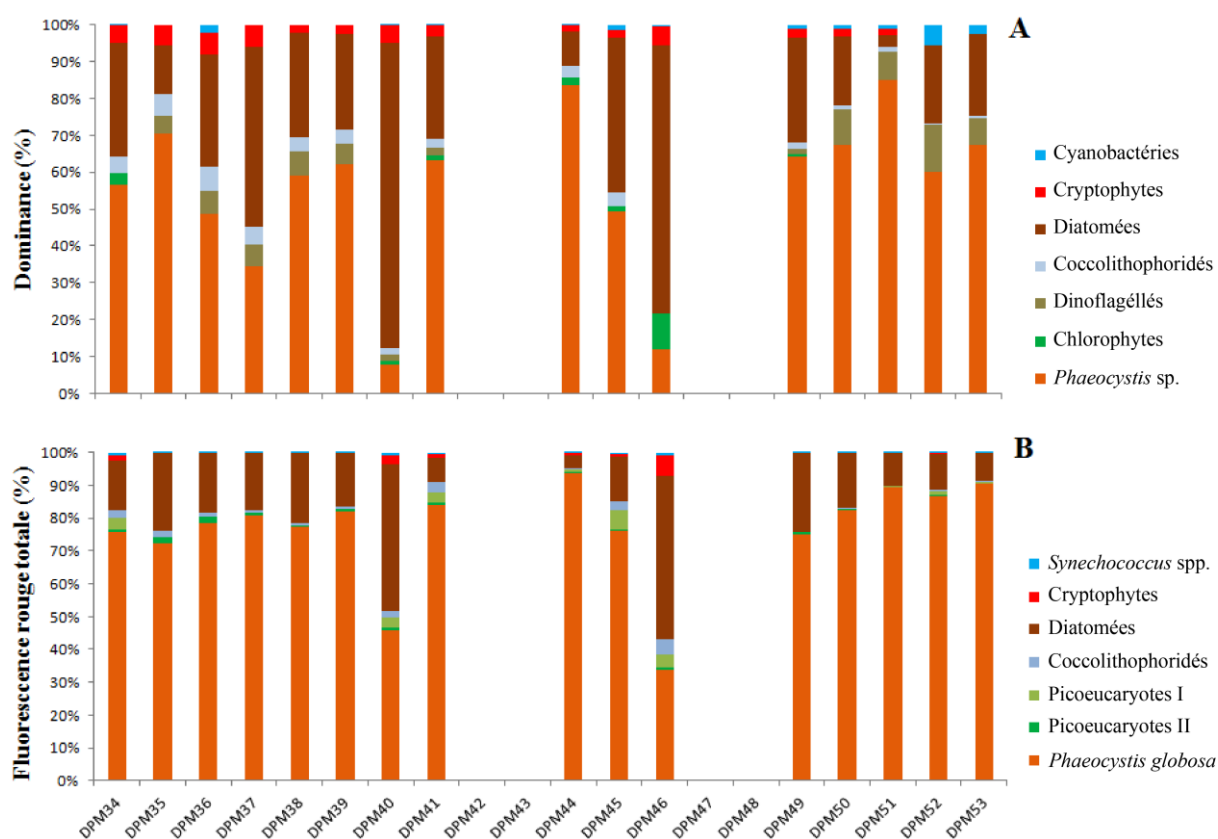


Figure 23. Importance relative des groupes pigmentaires déterminés par HPLC-CHEMTAX (A) et spectraux déterminés par cytométrie en flux – CytoSense (B) au cours du Leg 2 - campagne DYPHYMA (27 au 29 avril 2012)

En comparant les échantillons discrets (DPM) analysés au cytomètre en flux aux résultats HPLC, nous avons pu mettre en évidence des corrélations entre la fluorescence rouge par échantillon estimée par cytométrie et les teneurs totales en chlorophylle *a* estimées par HPLC (Tableau 5). Il est facile d'observer les mêmes tendances d'évolution de la contribution de chaque groupe phytoplanctonique au sein des différentes stations. Une corrélation de rang de Spearman a mis en évidence une relation entre le signal *Phaeocystis* détecté par cytométrie et par HPLC ($n=16$; $r= 0,60$; $p<0,01$) ainsi qu'entre le signal attribué aux diatomées par les deux approches ($n=16$; $r= 0,52$; $p<0,05$). Cette relation pourrait être encore plus forte si la contribution des diatomées et/ou des colonies de *P. globosa*, à la fluorescence rouge n'était pas biaisée les photomultiplicateurs qui saturent lors de l'enregistrement des signaux de cellules trop riches en chlorophylle *a* (donc à forte fluorescence rouge), entraînant une sous-estimation de leur contribution en termes de « biomasse chlorophyllienne ». Cette sous-estimation est renforcée par le fait que ces particules sont moins concentrées dans le milieu

marin et donc faiblement représentées dans un échantillon de $1,99 \pm 0,60 \text{ cm}^{-3}$ (volume moyen analysé lors du Leg 2 par le CytoSense), alors qu'une filtration de plusieurs litres pour les analyses HPLC a été effectuée. Il convient cependant de noter que la fluorescence rouge totale, représentant un proxy de l'ensemble de la chlorophylle *a* présente dans un échantillon, soutient une bonne comparaison avec l'HPLC et la mesure par chlorophylle *a* extraite (Tableau 5).

Pour les autres groupes pouvant être comparés, à savoir les Cryptophytes et les Cyanobactéries aucune relation statistique n'a pu être établie. L'absence de significativité peut être due à une trop faible représentativité en termes de fluorescence rouge de ces groupes au sein des échantillons, et la non détection des Chlorophytes par le CytoSense pourrait être due à une juxtaposition de certains groupes phytoplanctoniques au sein d'un même cytogramme.

	Fluorescence rouge totale (CytoSense)	Chlorophylle <i>a</i> (HPLC)	Chlorophylle <i>a</i> (fluorimétrie)
Fluorescence rouge totale (CytoSense)		n=15 ; r=0,76 ; p<0,01	n=14 ; r=0,82 ; p<0,01
Chlorophylle <i>a</i> (HPLC)	n=15 ; r=0,76 ; p<0,01		n=13 ; r=0,90 ; p<0,01
Chlorophylle <i>a</i> (fluorimétrie)	n=14 ; r=0,82 ; p<0,01	n=13 ; r=0,90 ; p<0,01	

Tableau 5. Corrélations de rang de Spearman (test non paramétrique) entre la fluorescence rouge totale issue du CytoSense et les concentrations en chlorophylle *a* issues des analyses HPLC et fluorimétrie extractive. Où n est le nombre d'échantillons comparés, r est le coefficient de corrélation et p la probabilité de rejeter l'hypothèse

De plus, la méthode HPLC-CHEMTAX se base sur des matrices de rapports pigmentaires, par conséquent elle assume que tous les représentants de la même classe algale ont le même rapport pigmentaire. Il faudrait donc s'assurer que ces rapports définis correspondent aux espèces dominantes de la classe considérée et donc avoir une connaissance préliminaire de la composition des communautés phytoplanctoniques pour connaître leur pool pigmentaire ainsi que les variations de celui-ci dans des conditions différentes de lumière et de nutriments. A

cet inconvénient méthodique, s'ajoute un autre biais qui est le manque de spécificité de certains biomarqueurs pour une classe algale, comme la fucoxanthine (diatomées, prymnésiphytes, chrysophytes), la zéaxanthine (cyanophytes, chlorophytes), la chlorophylle *b* (chlorophytes, prasinophytes, euglénophytes, quelques dinoflagellés). Ceci peut conduire à des aberrations dans l'interprétation écologique et contribuer à accentuer les différences avec les résultats obtenus par le CytoSense.

3. Comparaison entre l'AOA, le Fluoroprobe et le CytoSense

La discrimination des différents groupes phytoplanctoniques réalisée par le CytoSense, au cours des trois jours de campagne (Figure 24), souligne des différences d'abondance et de fluorescence entre les communautés phytoplanctoniques.

Les abondances enregistrées d'une rive à l'autre de la Manche, de même magnitude, correspondent à des groupes phytoplanctoniques et classes de taille différents, même si ponctuellement nous avons pu enregistrer des situations intermédiaires similaires de part et d'autre ainsi qu'au milieu de la Manche. Cette différence d'abondance s'observe aussi pour la fluorescence rouge totale, présentant à la fois des gradients côte-large et également un gradient décroissant depuis la haute Normandie vers le Pas de Calais, essentiellement dû à l'importance décroissante des diatomées. Toutefois, la faible contribution des groupes picophytoplanctoniques, des Coccolithophoridés et des Cryptophytes, à la fluorescence rouge totale (excepté au milieu de la Manche) simplifie considérablement l'analyse à haute fréquence, où le seul suivi des diatomées et de *P.globosa* suffirait presque à caractériser les fluctuations des groupes pigmentaires dans la Manche Orientale, à cette période précise du cycle saisonnier.

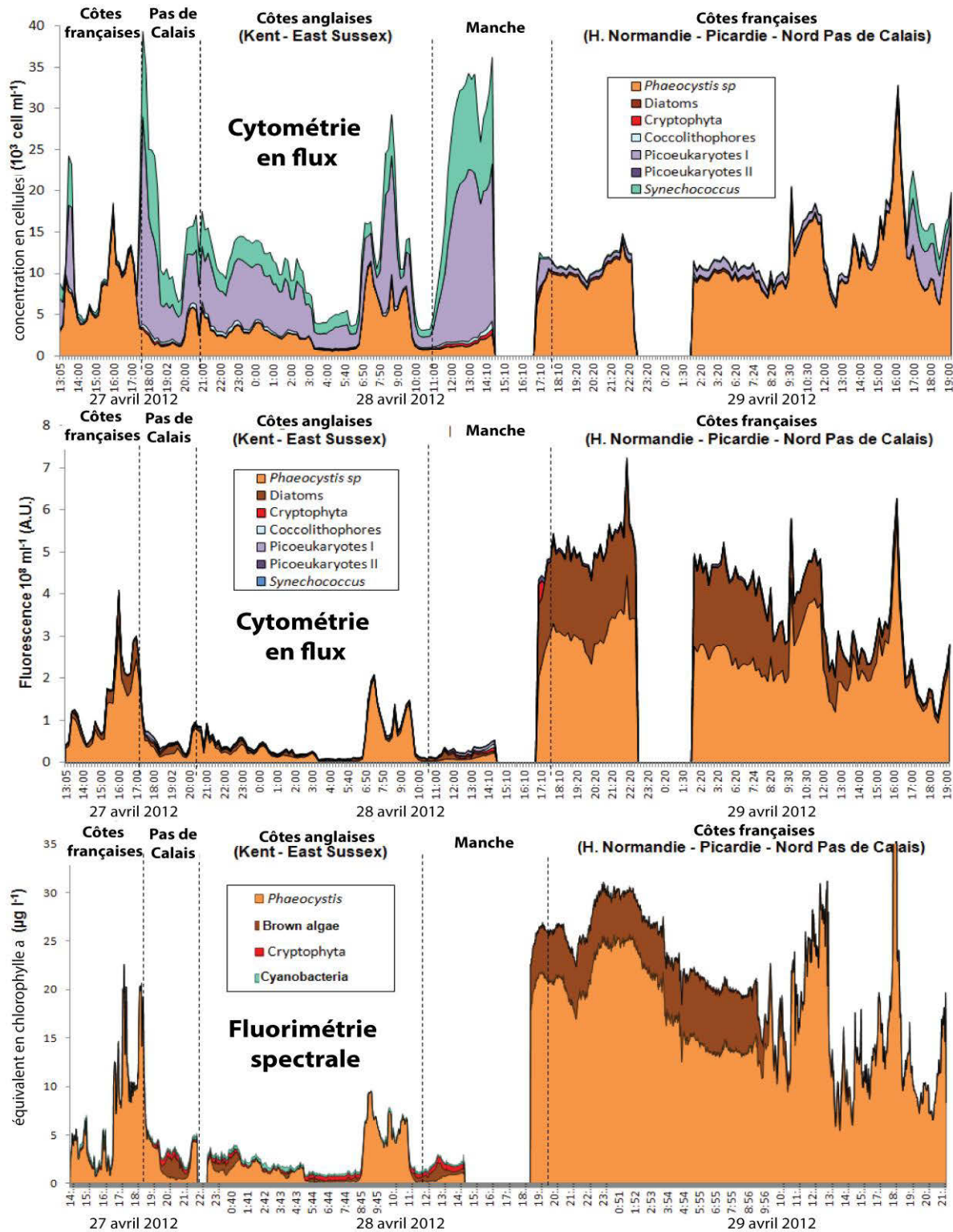


Figure 24. Distribution des groupes phytoplanctoniques enregistrés en continu, exprimés en concentration cellulaire et fluorescence relative (cytométrie en flux, haut et centre) et en équivalents de chlorophylle *a* (Fluorimétrie spectrale, bas) – campagne DYPHYMA – Leg 2, Manche Orientale, 27-29 avril 2012

Ce même patron de distribution est mis en évidence avec les enregistrements de fluorescence spectrale (A.O.A.), avec toutefois une moindre importance relative des diatomées. Les mesures réalisées sur des échantillons discrets par le Fluoroprobe (stations DPM) ont pu être également comparées aux données cytométriques (Figure 25). Les Coccolithophoridés étant inclus dans le groupe des Haptophytes n'ont pu être discriminés par cette technique (AOA ou Fluoroprobe), tout comme les chlorophycées étant donné que nous avons privilégié la détection de la nouvelle empreinte réalisée à partir de *Phaeocystis globosa* (Houliez *et al.*, 2012) au détriment de l'empreinte constructeur des « algues vertes ».

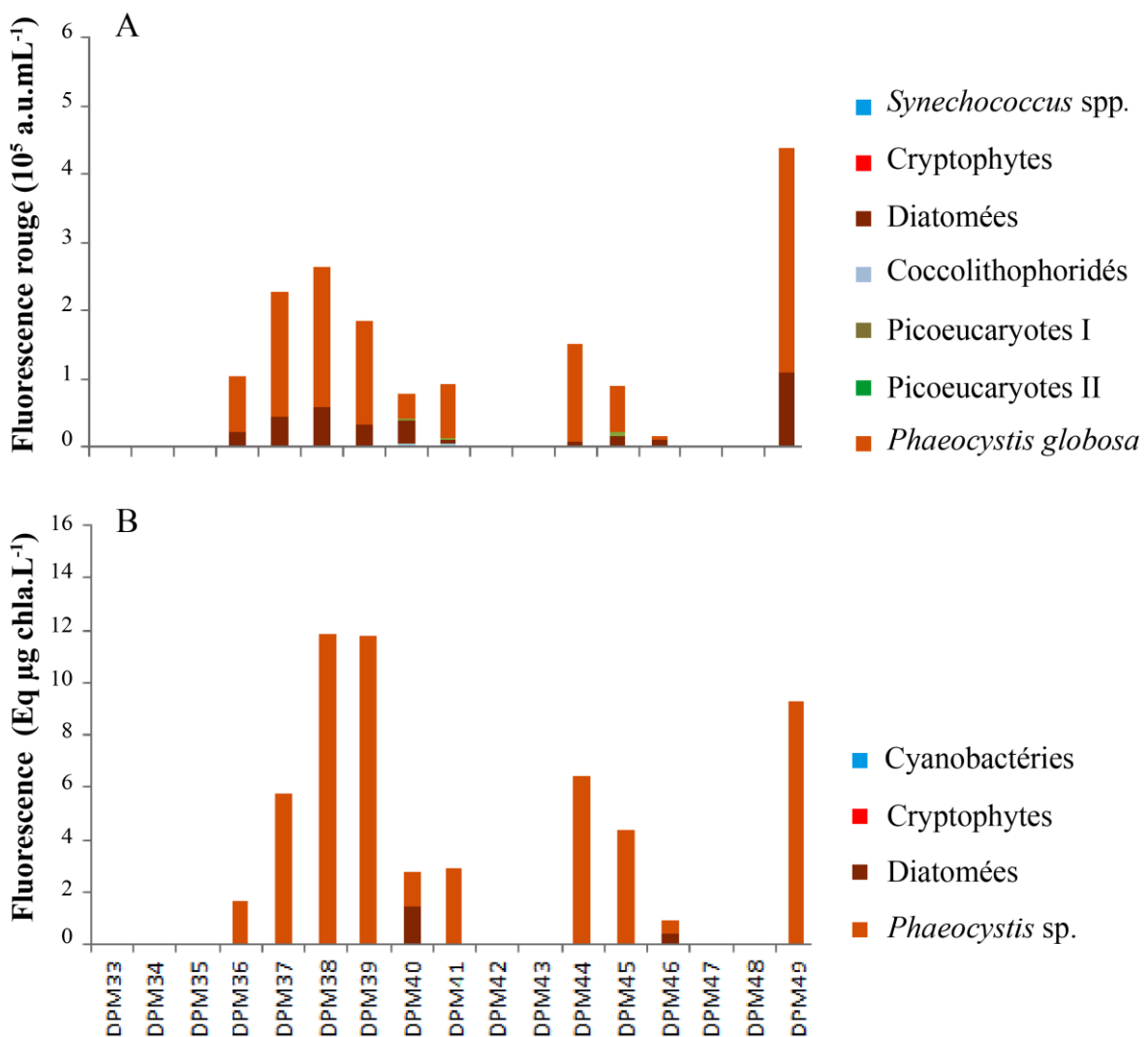


Figure 25. Importance absolue des groupes spectraux déterminés par cytométrie en flux – CytoSense (A) et par fluorimétrie spectrale- Fluoroprobe (B) au cours du Leg 2 - campagne DYPHYMA (27 au 29 avril 2012)

Aucune comparaison statistique n'a été possible entre la variabilité de la fluorescence spectrale et la fluorescence rouge issue du CytoSense. Ce résultat a deux explications plausibles : i) une surestimation des diatomées par le CytoSense due à une inclusion, dans le groupe cytométrique assimilé aux diatomées, de colonies de *Phaeocystis globosa* et/ou ii) une surestimation de la contribution de *P. globosa* à la fluorescence par l'AOA à partir d'une concentration « seuil » ($\approx 70\%$ de dominance de *P. globosa*) comme cela a pu être mis en évidence lors de précédents travaux et calibrage dans le cadre du projet DYMAPHY (www.dymaphy.eu) ainsi que les travaux de Houliez *et al.* (2012). Ce deuxième point a entraîné des analyses se distinguant fortement du reste des estimations, avec une fluorescence due à 100% à *P. globosa*, là où l'HPLC et le CytoSense sur les mêmes DPM trouvaient au minimum 5 groupes y contribuant. Malgré cela, le Fluoroprobe reste un bon indicateur de biomasse totale et par groupe spectral, et son utilisation dans des conditions contrastées (*P. globosa* moins dominant, d'avantage d'échantillons) peuvent rendre compte d'une meilleure corrélation avec le CytoSense (voir analyse saisonnière, Houliez *et al.*, 2012). De plus, nous avons pu mettre en évidence une bonne corrélation entre les estimations par fluorimétrie spectrale et la chlorophylle *a* extraite analysée par fluorimétrie (corrélation de Spearman ; $n=14$, $r=0,91$, $p<0,01$).

IV. Conclusion

Le suivi combiné de la distribution spatiale phytoplanctonique à haute résolution, au cours d'une campagne océanographique au milieu du printemps 2012, a permis d'estimer par des techniques complémentaires, l'abondance cellulaire (cytométrie en flux, comptages microscopiques) et les changements de dominance d'un groupe phytoplanctonique par rapport à un autre (en termes de contribution à la concentration en chlorophylle *a* totale), répondant à des changements des conditions du milieu. En outre, malgré des tendances similaires, les résultats de cette étude montrent une variabilité des communautés pico- et nanophytoplanctonique qui est différente de celle de la communauté microphytoplanctonique. Cette constatation souligne l'intérêt d'utiliser d'autres méthodes que l'observation microscopique pour rendre compte de la variabilité phytoplanctonique. Aussi, la chémotaxonomie a déjà permis d'estimer la présence de *P. globosa* en faibles quantités là où la microscopie ne la détectait pas (Muylaert *et al.*, 2006). Le Fluoroprobe a lui obtenu une bonne corrélation entre la biomasse de *P. globosa* et son abondance cellulaire mesurée par

cytométrie sur une année d'observation en eaux littorales de la Manche orientale échantillonnées à une fréquence hebdomadaire (Houliez *et al.*, 2012). Quant à la cytométrie, elle permet de détecter les petites particules et de mieux estimer le nanophytoplancton, de même que de détecter et suivre les variations d'abondance des diatomées (même si globalement sous-estimées)

Les analyses pigmentaires ont permis de compléter les données de référence auxquelles les techniques semi-automatisées telles que la cytométrie en flux (CytoSense) et la fluorimétrie spectrale ont pu être comparées en termes de % représenté au sein de la concentration en chlorophylle *a* totale (proxy de biomasse phytoplanctonique). Sur une échelle spatiale, les deux approches (cytométrie et HPLC) montrent une image similaire. Néanmoins, la contribution du microphytoplancton est probablement surestimée par l'approche pigmentaire au détriment des autres classes de taille, puisque son calcul est basé sur l'hypothèse que les diatomées et les dinoflagellés ont comme marqueurs pigmentaires la fucoxanthine et la péridinine qui ne seraient présents que dans cette classe de taille. Mais ces deux marqueurs pigmentaires peuvent avoir des représentants également chez les espèces picoplanctoniques (Gao *et al.*, 2003 ; Moon-van der Staay *et al.*, 2001) et inversement certains pigments associés au picophytoplancton pourrait également être présent dans des espèces microphytoplanctoniques. Une autre étude (Eker-Develi *et al.*, 2012) révèle la non détection d'*E. huxleyi* par analyse CHEMTAX car une autre espèce contenant le même pigment (19'-hexanoyloxyfucoxanthin) pourrait être présente en plus grande quantité et ainsi masqué la présence d' *E. huxleyi*. Ainsi, l'estimation à base de pigments de la contribution de chaque classe de taille a quelques incertitudes dues à l'impossibilité d'attribuer certains pigments marqueurs à une certaine classe de taille. Pour cette raison, la cytométrie en flux pourrait permettre une meilleure estimation notamment, au niveau picophytoplanctonique, dans la mesure où il permet également la détection de petites cellules ne portant pas de pigments marqueurs (Wollschläger *et al.*, 2015). Les bonnes corrélations entre la fluorescence rouge totale du CytoSense et des autres techniques pigmentaires, apportent une plus value à cette technique, qui pourrait être utilisée comme un instrument de mesure haute fréquence du proxy de la Chl *a*.

Toutes les méthodes utilisées lors de cette campagne sont nécessaires pour avoir un aperçu de la communauté de phytoplancton. Le choix des techniques utilisées devrait au final dépendre de la question scientifique. Pour la recherche taxonomique détaillée, la microscopie optique est encore la méthode de choix, mais son utilité diminue avec la taille des cellules. De plus, la technologie évolue rapidement, en particulier dans le domaine moléculaire dont les méthodes permettent de discriminer jusqu'à l'espèce les cellules picoplanctoniques. La cytométrie en flux automatisée peut être considérée comme très utile en raison de sa capacité à fournir un aperçu rapide sur la distribution de taille et des groupes pigmentaires majeurs au sein de la communauté. L'approche à base de pigments comme la chémotaxonomie fournit des informations complètes sur la structure de la communauté au niveau de la classe. Cependant, la précision de l'information dépend de la connaissance préliminaire des rapports de pigments présents dans la région étudiée (comme l'assimilation des groupes cytométriques à des espèces dépend également d'une connaissance préalable des espèces présentes). La mise en application à haute résolution spatio-temporelle de l'approche pigmentaire reste le point faible de cette technique.

Ces techniques permettent de mieux appréhender la diversité du phytoplancton dans son hétérogénéité de répartition et de mieux comprendre sa variabilité dans le cadre de programmes de recherche. Mais elles pourraient aussi être utilisées par des organismes chargés de surveiller le phytoplancton et de rendre compte du bon état écologique du milieu marin en liaison avec les différentes directives (Directive Cadre sur l'Eau, Directive Cadre pour une Stratégie du Milieu marin). Cela passerait par une meilleure standardisation des procédures opérationnelles (initiée dans le cadre de DYMAPHY, cf. rapports actions 1, Annexe) pour chaque technique employée. Pour la cytométrie, cela pourrait se décliner avec l'emploi d'un même type de billes de calibrage, d'un même seuil de détection des particules (trigger level), d'un même volume analysé et surtout d'une même classification des groupes cytométriques. Pour la fluorescence spectrale, l'adaptation (a posteriori) des jeux d'empreintes appliquées en fonction des connaissances préalables des groupes phytoplanctoniques susceptibles d'être présents sur la zone étudiée, et, si les conditions le permettent (groupe phytoplanctonique similaire dans des régions différentes), d'un même jeu d'empreintes, dans l'attente de pouvoir appliquer de nouveaux algorithmes aux données brutes (travail en cours et initié par le LISIC dans le cadre du projet DYMAPHY), permettant de discriminer d'avantage de groupes spectraux qu'actuellement.

Chapitre IV :

Suivi saisonnier du phytoplancton sur une radiale côte-large en Manche Orientale

Résumé

Après avoir étudié, dans le précédent chapitre, la variabilité à haute résolution spatiale du phytoplancton et d'en obtenir une image synoptique à l'échelle de la Manche Orientale à la fin du mois d'avril 2012, ce chapitre aborde, à une échelle locale, sa variabilité saisonnière le long d'un gradient côte-large (échantillonné à résolution kilométrique), en relation avec les variables environnementales. Dans ce système côtier considéré comme méso-eutrophe, l'importance en termes d'abondance relative du picoplancton (47%) et du nanophytoplancton (44%) a été clairement établie, sur l'ensemble de la période étudiée (de février à juillet 2012). Des gradients spatiaux et une distribution très hétérogène du phytoplancton ont été caractérisés au cours de cette étude, avec notamment une diminution des diatomées, de *Phaeocystis globosa* haploïde, des Coccolithophoridés, et d'un groupe de picophytoplancton à haute fluorescence (II) vers les eaux du large et *a contrario*, une augmentation des *Synechococcus* spp. Cependant, la variabilité temporelle, pendant les 6 mois échantillonnés, représente la majeure partie (71%) de la variabilité totale (masquant potentiellement la variabilité spatiale). Durant ce suivi saisonnier, il a été possible d'établir une succession de groupes phytoplanctoniques sur 5 périodes : i) En début du suivi (fin d'hiver, Février) le milieu a été dominé (en termes d'abondance) par *Synechococcus* spp. et un groupe de picophytoplancton à faible fluorescence, ii) le début du printemps caractérisé par une forte abondance de Cryptophytes et Coccolithophoridés, rapidement suivie iii) par l'efflorescence printanière (Avril-Mai) de *P. globosa* et accompagnée par l'augmentation des diatomées, iv) le milieu et la fin du printemps, caractérisés par le développement de petites espèces comme les picoeucaryotes à forte fluorescence, v) l'été (Juin-Juillet), structuré par les *Synechococcus* spp., picoeucaryotes à faible fluorescence, Cryptophytes et Coccolithophoridés. Les relations entre les variables environnementales et les assemblages phytoplanctoniques ont indiqué que les nutriments et le niveau d'éclairement étaient les plus importantes variables structurant la transition hiver-printemps-été de la plupart des groupes de phytoplancton. Par exemple le développement des cellules de *P. globosa* semble être lié à l'augmentation de la lumière. Même si les variables environnementales considérées expliquent une grande partie de la variabilité saisonnière chez la plupart des groupes phytoplanctoniques, certains groupes (picoeucaryotes à faible fluorescence, Cryptophytes et Coccolithophoridés) n'étaient pas corrélés avec les variables environnementales mesurées à une résolution spatiale inférieure à celles des données de phytoplancton.

Spatio-temporal patterns in phytoplankton assemblages in inshore-offshore gradients using flow cytometry: a case study in the eastern English Channel.

Article soumis à Journal of Marine Systems en février (en cours de correction)

Simon Bonato¹, Elsa Breton¹, Morgane Didry¹, Fabrice Lizon², Vincent Cornille¹, Eric Lécuyer³,
Urania Christaki¹, Luis Felipe Artigas^{1*}

¹ Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG – UMR CNRS 8187), Université du
Littoral Côte d'Opale, Wimereux, France

² Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG – UMR CNRS 8187), Université de Lille 1,
Wimereux, France

³ Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG – UMR CNRS 8187), Wimereux, France

*Corresponding author: felipe.artigas@univ-littoral.fr

Abstract

A pulse-shape recording flow cytometer (CytoSense[®]) was applied to the monitoring of changes in phytoplankton distribution along an inshore-offshore transect across the eastern English Channel (EEC), on 13 occasions during the main productive period of the year. Amongst the eight phytoplankton groups discriminated, picophytoplankton (picoeukaryotes and *Synechococcus* spp.) and *Phaeocystis globosa* nanoflagellates were the main contributors to total phytoplankton abundance, while Diatoms-like, Coccolithophores, and Cryptophytes represented each one less than 5%. High spatial resolution revealed important changes on relatively short distances. Moreover, a general decrease of Diatoms-like, *P. globosa* haploid cells, Coccolithophores, and picoeucaryotes abundance was evidenced from inshore to offshore waters, associated to an increase of *Synechococcus* spp. abundance. Seasonal variability accounted for 71% of phytoplankton abundance changes. Compared to previous studies in the area the CytoSense allowed to highlight new players during the winter-spring-summer phytoplankton succession: (i) high abundance of *Synechococcus* spp. and picoeukaryotes I in winter and of *Synechococcus* spp. also in the summer, (ii) a transient abundance peak of picoeukaryotes II, and (iii) high abundance of Coccolithophores and Cryptophytes during the wax of *P. globosa* bloom and in the summer. The relationships between environmental variables and phytoplankton assemblages indicated that nutrients and the daily light intensity were the most important parameters in structuring the winter-spring-summer transitions.

Keywords: Pico-, nano-, micro-phytoplankton; Seasonal and spatial variability; Flow cytometry.

1. Introduction

Phytoplankton microorganisms, both prokaryotic and eukaryotic, are responsible for about 45% of annual global photosynthesis, and their community structure plays a key role in the link between biogeochemical cycles (Falkowski, 1994; Falkowski et al., 1998; Gregg et al., 2003) and trophic web dynamics (Cloern, 1996). Therefore, it is crucial to address the general pattern of their temporal and spatial variability, and the factors controlling the observed changes in the phytoplankton community structure.

Previous studies on phytoplankton composition in the mesotrophic and well-mixed coastal waters of the eastern English Channel (EEC), based upon microscopic counts, showed that colonial diatom abundance, which gradually decreases towards offshore waters (Dupont, 1980; Hédin-Bougard, 1980), forms the bulk of phytoplankton biomass except during the spring bloom of the Prymnesiophyte *Phaeocystis globosa* (Breton et al., 2000; Gómez and Souissi, 2007; Schapira et al., 2008; Lamy et al., 2009; Grattepanche et al., 2011a,b; Lefebvre et al., 2011). Pigment signatures confirmed these results showing the dominance of *P. globosa* and the lower contribution of other taxa such as Cryptophytes, Chlorophyceae and Cyanobacteria, despite their occurrence throughout the year (Breton et al., 2000).

Although light microscopy allows identification and enumeration of microphytoplankton and in particular diatoms, it has several drawbacks: (1) it makes difficult or impossible to obtain an accurate identification and quantification of small cells ($< 5\mu\text{m}$), (2) the requirement of fixatives to preserve samples may cause bias by modifying the shape and also the integrity of the naked organisms (e.g. Breteler, 1985; Zarauz and Irigoien, 2008). Pigment analysis by HPLC has often been used to complement light microscopy and to reveal the phytoplankton composition, especially of small sized phytoplankton groups. However, some marker pigments (e.g. fucoxanthin) are present in several phytoplankton classes and some classes present various pigment signatures, such as Prymnesiophytes (Jeffrey and Wright, 1994). Recently, molecular analysis made it possible to reveal the whole eukaryotic in the EEC but this innovative technique has the major drawback of being semi-quantitative (e.g Christaki et al., 2014). Besides, there is not yet the possibility of applying sequencing in studies that focus on high spatial or temporal

resolution and real time monitoring of phytoplankton dynamics. Compared to a conventional FCM, the CytoSense (CytoBuoy[®]) pulse-shaped recording flow cytometer (FCM) allows the analysis of larger volumes of water samples and can detect a larger size range of cells and/or colonies, from $\sim 1 \mu\text{m}$ to $\sim 800 \mu\text{m}$. The CytoSense can discriminate particles on the basis of their optical properties (Dubelaar et al., 1999), including size, shape, and fluorescence derived parameters, (Rutten et al., 2005; Thyssen et al., 2008a,b). Another advantage of the CytoSense is its capacity for a rapid enumeration of live samples allowing the possibility of performing a relative high spatio-temporal resolution.

Recently, the use of the CytoSense flow cytometer during a survey carried out in the EEC (Bonato et al., 2015) highlighted the presence of picophytoplankton in relatively high abundance in offshore waters, which had been overlooked in previous studies using light microscopy and/or pigment signatures (Breton et al., 2000). These observations were also confirmed through sequencing studies in the area (Christaki et al., 2014; Genitsaris et al., 2015). Moreover, this previous study showed that phytoplankton abundance and composition varied greatly over short distances as small as $\sim 10 \text{ km}$ in the French part compared to the English one (Bonato et al., 2015), probably caused by a mosaic of different freshwater signatures along the French coast. However, no attempts have been made to relate this spatial variability to that of the major environmental factors driving phytoplankton variability such as nutrients and light. Finally, the relative magnitude of spatial variability compared to the temporal one was not evaluated.

The present study aimed at complementing this recent high spatial resolution study during a short period of time (Bonato et al., 2015) by applying this same high spatial resolution approach on an ecological gradient and including the seasonal variability of phytoplankton. Important environmental factors driving phytoplankton variability such as nutrients and light were also integrated in the present study. This was accomplished by monitoring changes in phytoplankton distribution along an inshore-offshore transect across the EEC, at high spatial resolution, and on 13 occasions during a winter to summer transition including the phytoplankton spring bloom period. Finally, multivariate statistical analysis was used in order to relate the main environmental parameters (temperature, salinity, daily light intensity and nutrients availability) and phytoplankton spatial and seasonal variability.

2. Material and methods

2.1. Sampling strategy and physico-chemical variables

Subsurface seawater (-2 m) samples were collected for FCM analysis, using a 8 dm³ Niskin bottle onboard the “*Sepia II*” Station Research Vessel (CNRS INSU) on 13 occasions from February to July 2012, along an inshore-offshore transect of a total length of ~10 km, at high spatial resolution (9 samples; Fig. 1). Sea surface Temperature (SST, °C), and salinity (SSS) were measured at a depth of 2 m with a CTD Seabird probe (SBE 19) equipped with a PAR sensor (QSP 2300, Biospherical Instrument). The diffuse attenuation coefficient for downwelling irradiance (k , m⁻¹) was assessed from instantaneous vertical CTD profiles. The average subsurface daily light intensity (I , E m⁻² d⁻¹) experienced by phytoplankton (over the last 6 days before the cruises) was estimated using the formula of Riley (1957):

$$I = \frac{I_0(1 - e^{-kz})}{kz} \quad (1)$$

With z corresponding to the depth where phytoplankton was collected ($z=2$ m), and I_0 , the daily incident light estimated from global solar radiation (GSR, W m⁻²) measured continuously with a time step of 5 min with a solar radiation sensor (Vantage Pro, Davis) mounted on the roof of our laboratory bordering the seashore, by the sampling area. Before calculating the coefficient, GSR was converted to PAR by assuming PAR being 50% of GSR and by considering $1 \text{ W m}^{-2} = 0.36 \text{ E m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Morel and Smith, 1974).

In addition, seawater samples for nutrient (silicate [DSi], phosphate [DIP], and nitrate + nitrite [DIN]) analysis were collected only at 5 stations over 9 (S1, S3, S5, S7 and S9). Nutrient concentrations (μM) were assessed according to the methodologies outlined in Aminot and Kérouel (2004), using the *Integral Futura* autoanalyser system (*Alliance Instruments*).

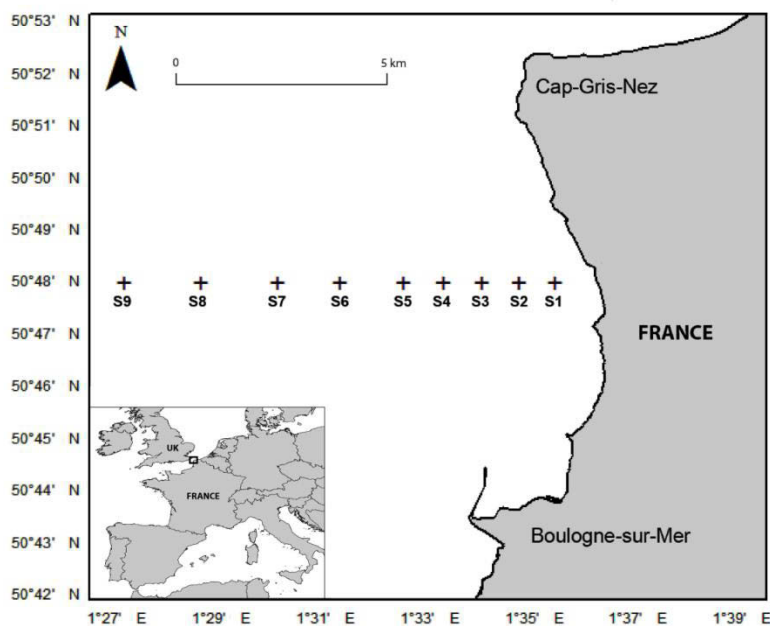


Figure 1. Map of the study area showing the location of the 9 sampling stations in the eastern English Channel (Saint Jean Bay, near the Strait of Dover)

2.2. Flow cytometry analysis

Single samples per station were taken at one depth only (about -2 m) and were stored in an icebox in the dark until they were taken back to the laboratory for analysis 2.5 hours from the first sampling. Then, they were analysed with a CytoSense pulse-shape recording flow cytometer (FCM; CytoBuoy[®] b.v., Netherlands). Before being analysed, the samples were stored at 4°C. Single-cells and colonies were analysed through a laser beam (excitation wavelength of 488 nm, 50 mV). A sheath fluid was used to separate, align and drive the particles to the laser. The sheath flow rate was 80 cm³ min⁻¹. Two different runs were performed sequentially on each sample: one at low red fluorescence trigger level (i.e. 10 mV, just over the baseline fluorescence noise) during a short time analysis (i.e. around 4 min) for detecting pico- and nano-phytoplankton, and another one at high trigger level (i.e 25 mV) during a longer time (i.e. around 8 min) to detect the larger and less numerical dominant species containing high amounts of chlorophyll *a*, i.e. diatom cells and colonies. The mean volume analyzed using the high FLR trigger level (25mV) was 3.9 ± 0.99 cm³ and for low FLR trigger level (10mV) was 1.22 ± 0.33 cm³. The version of this CytoSense was equipped with one optional module of “High Sensitivity” photomultiplier tubes, which made

it possible to differentiate and provide reliable picophytoplankton counts. The stability of the optical unit and the size calibration were checked using Fluorescents beads (Polybead®) of 10 µm in diameter added to the sample.

Samples were analysed with the Cytoclus® software, and phytoplankton clusters were manually classified. Clusters were selected by taking into account the amplitude and the shape of the five optical signals characterising each particle: forward scatter (FWS), sideward scatter (SWS) and three fluorescence signals collected by the photomultiplier tubes (red [FLR, 668-734 nm], orange [FLO, 601-668 nm] and yellow [FLY, 536-601]). FWS was collected by a PIN photodiode. Mathematical variables were assigned to each signal shape: inertia, fill factor, asymmetry, number of peaks, length, and apparent size. All these values were plotted into several two-dimensional cytograms of retrieved information from the 5 pulse shapes obtained for each single cell, mainly the integral (total signal) and the peak of the pulse shape signal (maximum height).

The Diatoms-like group showed the highest FLR and FWS signals because this group comprises large and rich in chlorophyll *a* cells and/or colonies (Fig. 2A, 2D). According to previous FCM studies in EEC waters and in the North Sea (Rutten, 2005; Guiselin, 2010), *P. globosa* haploid and diploid cells are characterized by lower FLR and FWS signals than those of diatom cells and/or colonies (Fig. 2A, 2D). *P. globosa* diploid cells showed higher FLR and FWS signals than *P. globosa* haploid cells (Fig. 2B, 2D). Picoeukaryotes (<2 µm) showed low FLR and FWS signals, resulting from their minute size (Fig. 2A, 2D). Picoeukaryotes I and picoeukaryotes II were differentiated from each other based on the amplitude of their red fluorescence signal, which was assumed to be due to a higher chlorophyll *a* content in picoeukaryotes II than in picoeukaryotes I. Picoeukaryotes II were also less fluorescent and smaller than *P. globosa* haploid and diploid cells. Although Coccolithophores (Fig. 2D) have the same FLR and FWS signals as *P. globosa* haploid and diploid cells, their SWS signal is higher (Fig. 2C) due to their CaCO₃ platelet coverings (Olson et al., 1989). The *Synechococcus* spp. cluster showed a characteristic signature with low FWS because of their minute size and a significant peak in orange fluorescence (FLO) caused by their high phycoerythrin content (Fig. 2A, 2C). The larger size of Cryptophytes allowed distinguishing them from *Synechococcus* spp., resulting in higher FLO and FWS signals (Olson et al., 1989) (Fig. 2A, 2C).

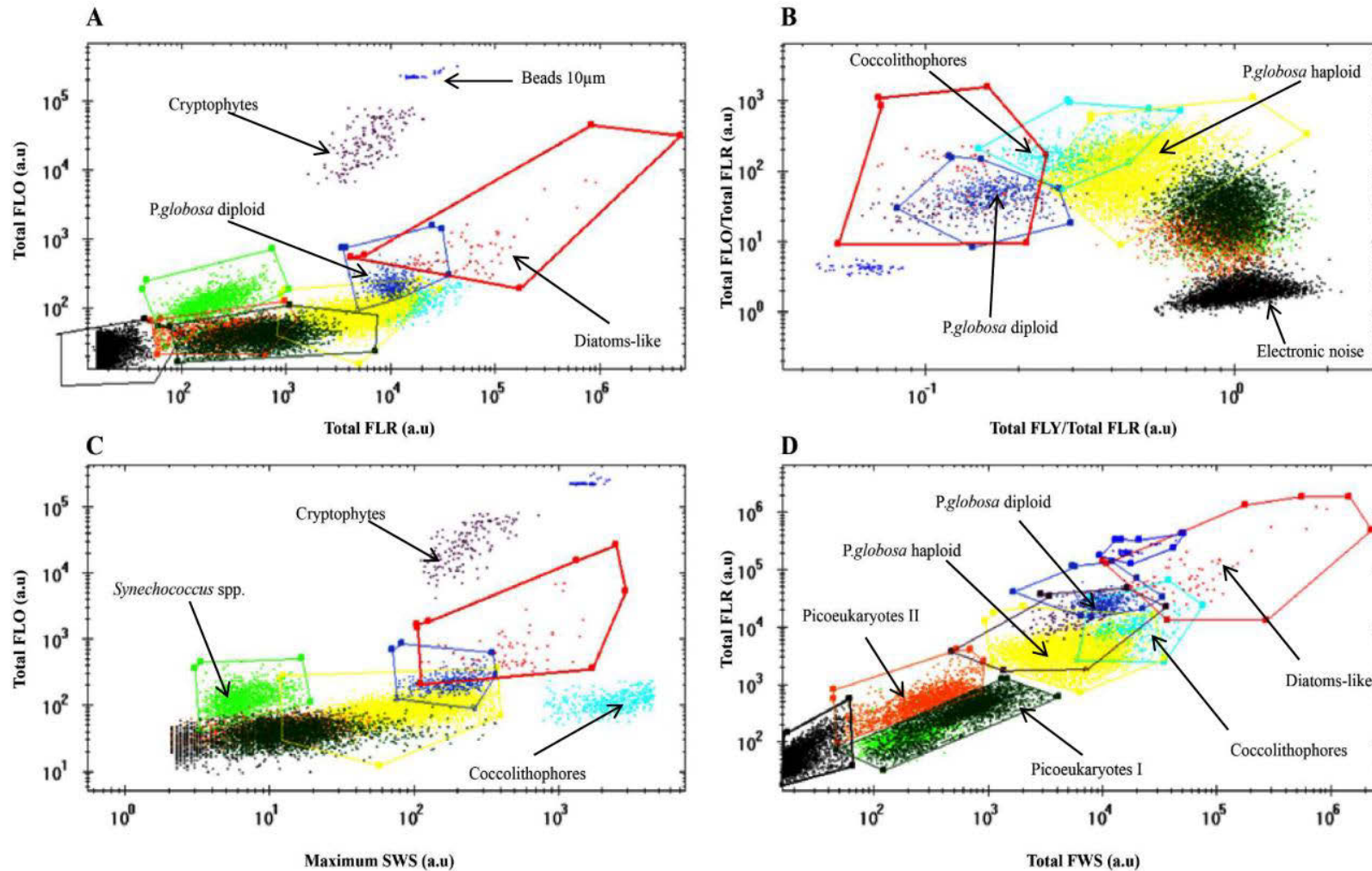


Figure 2. Main cytograms allowing the discrimination of the various phytoplankton groups (*Phaeocystis globosa* haploid and diploid cells, picoeukaryotes I and II, Cryptophytes, Coccolithophores, Diatoms-like and *Synechococcus* spp.) occurring from February to July 2012 in subsurface waters of the eastern English Channel. (A) Cytogram of Total red fluorescence [Total FLR (a.u.)] vs. Total orange fluorescence [Total FLO (a.u.)]. (B) Cytogram representing the ratio Total yellow fluorescence/Total FLR [Total FLY (a.u.)/Total FLR (a.u.)] vs. the ratio [Total FLO (a.u.)/Total FLR (a.u.)]. (C) Cytogram of Maximum side scatter [Maximum SWS (a.u.)] vs. Total FLO (a.u.). (D) Cytogram of Total FLR (a.u.) vs. Total forward scatter [Total FWS (a.u.)]. (a.u) corresponding to arbitrary units

2.3. Data analysis

Prior to the statistical analysis, the abundance of each phytoplankton cluster identified by flow cytometry, as well as the environmental variables, were $\log(x+1)$ transformed to minimize the influence of high values and to ensure a normal distribution (Legendre and Legendre 1998). To depict the spatial variability trends of all phytoplankton clusters throughout the whole study period, a between-class principal component analysis (Table I, Doledec and Chessel, 1987) was performed on a matrix crossing 9 classes (i.e sampling stations) and the eight phytoplankton clusters. In addition, in order to estimate the relative importance of the spatial versus the seasonal effect in the total variability of phytoplankton abundance, a between-date PCA was also computed. In the case of spatial variability, this discriminating method seeks for axes, which will separate as best as possible the centre of gravity of each station, by focusing on the between-station differences. In addition, in order to have in view the temporal variability at each station, the original data of each sampling date was projected as supplementary rows around the center of gravity of each station. The statistical significance of spatial and seasonal effect in the overall abundance of phytoplankton clusters was separately tested using Monte Carlo permutation procedure (Manly, 1997) with 1000 permutations.

To depict the common seasonal structure of phytoplankton assemblages among zones, a Partial Triadic Analysis (PTA, Thioulouse and Chessel, 1987) was performed on covariance PCA of the phytoplankton abundance tables (Table I). By performing simultaneous principal component analyses (PCA) of several data tables X_k ($k=1,2,3,\dots$ i.e. zones) with same variables (i.e. phytoplankton cluster abundances) and same individuals (i.e. sampling dates), this multi-table method of the STATIS family (Lavit et al. 1994) allows finding a common structure Y of these

tables (named as “compromise”). This average matrix is built so that $Y = \sum_{k=1}^k \alpha_k X_k$, with α_k

weights chosen so that $\sum_{k=1}^k \alpha_k^2 = 1$ and searching to maximize the average covariance among each pair of matrices X_k . Then, the synthetic matrix Y is analysed by PCA, and the rows and columns of each matrix X_k are projected as supplementary individuals and supplementary variables, respectively. In practice, the weights give the contribution of each zone to the building of the

Table I : List of the descriptive multivariate methods used in this study

Main goal	Descriptive multivariate method*	Reference
Assessing difference between stations/dates in phytoplankton assemblages, associated variance contribution, and identify phytoplankton clusters responsible of the observed difference	Between-station PCA/Between-date PCA (i.e. PCA of the table of the 9 station /13 date means)	Dolédéc and Chessel 1987
Assessing the common seasonal structure of phytoplankton assemblages between the 3 zones	Partial Triadic Analysis (i.e. PCA of a series of 3 PCAs)	Thioulouse and Chessel 1987
Assessing phytoplankton clusters-environment relationships	Co-inertia analysis (i.e. PCA of the table of cross-covariances between the variables of the environmental table and those of phytoplankton cluster one)	Dolédéc and Chessel 1994 Dray et al. 2003

* see the review of Thioulouse 2011

compromise. Accordingly, a zone with a lower α_k than other ones means a relative lower similarity compared to others, and therefore a lower contribution of this zone to the building of the compromise. In addition, the accuracy of the compromise is assessed by the $\cos^2$ between each matrix zone and the compromise, which allows appreciating its quality. Hence, $\cos^2$ expresses the degree of representation of the seasonal structure of each zone on the compromise. To ascertain distinct phytoplankton assemblages, an ascendant hierarchical classification (AHC) with Ward's aggregation criterion was built from the two first component coordinates of the compromise. Before, an "inter-structure" analysis allowed studying the similarity between zones in the seasonal variability of phytoplankton taxa, and depicting differences between zones, respectively.

Finally, in order to investigate the coupling between phytoplankton assemblages and environment, a co-inertia analysis (Dolédéc and Chessel, 1994, Dray et al. 2003) was performed (Table I). This multivariate method consists in finding co-inertia axes by maximizing covariance, between rows coordinates of environment and phytoplankton matrices. It is a general and flexible descriptive method allowing the analysis of different types of data tables with any analytical method (PCA, CA, MCA...), and with no restriction on the number of variables (Dray et al. 2003). In our case, a PCA-PCA co-inertia analysis was performed, which is closely related to the "classical" RDA. Although the former is a symmetric method (consequently, a descriptive approach) based on partial least-squares regression, the last one is an asymmetric one (consequently, a predictive approach) based on multiple regressions, results are often similar (Dray et al. 2003). To estimate the strength of the coupling between the two tables, a multidimensional correlation coefficient (RV) was calculated, and the statistical significance was tested using the Monte Carlo permutation procedure with 1000 permutations. All statistical analyses were carried out with the "ade4" software (Chessel et al., 2004, Dray et al., 2007). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Environmental conditions

The range of different environmental conditions recorded during the study is reported in Fig. 3. Values of environmental parameters (Fig. 3) were within the range of those usually recorded in English Channel waters (Napoléon et al., 2012; Houliez et al., 2013). For example, SST, k (attenuation coefficient, data not shown) and DIN (nitrate + nitrite), were in the ranges 5.82-17.11°C, 0.16-1.1 m⁻¹ and 0.02-13.54 µM, respectively. Accordingly, SST and daily light intensity values progressively increased towards the end of the time-series, while DIN, DSi and DIP values peaked in February, and thereafter decreased by late winter and early spring. More specifically, DSi and DIN became exhausted (DSi < 2 µM and DIN < 1 µM) at mid-March and at the end of April, respectively. DIP showed maximum values recorded in early February, and became depleted at the end of February (< 0.5 µM). Spatially, SSS and daily light intensity, exhibited a more or less pronounced coastal-offshore gradient with the highest and lowest values recorded in offshore and inshore waters, respectively, resulting from the influence of several river discharges into the coastal zone, enhancing particulate matter resuspension at the lower zone and inducing a higher influence of particulate matter resuspension at the shallower-depth inshore stations, especially in mid spring.

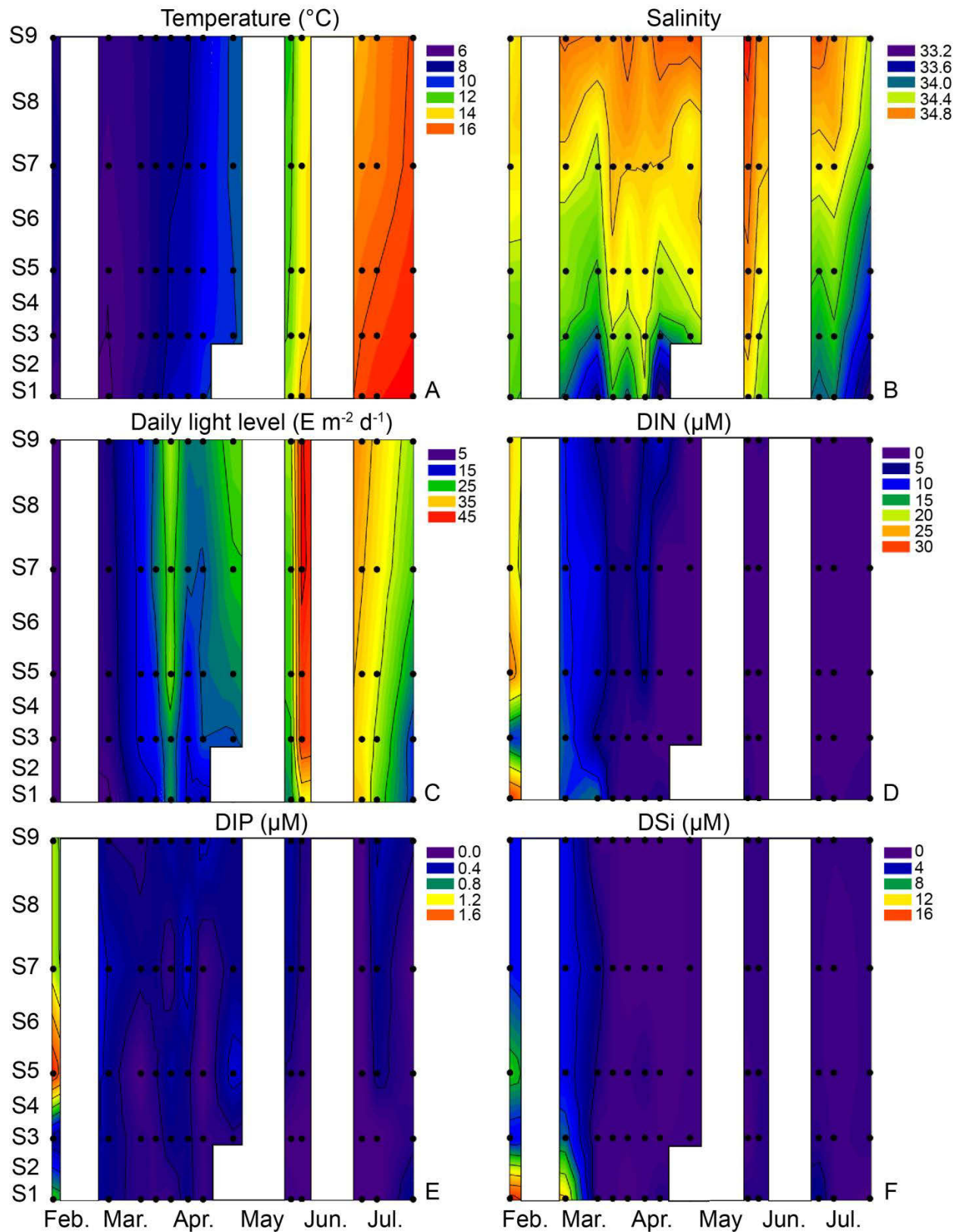


Figure 3. Spatio-temporal distribution of (A) Sea Surface Temperature - SST, (B) Sea Surface Salinity - SSS, (C) daily light level, (D) DIN (Nitrates+Nitrites) concentrations, (E) DIP concentrations, and (F) DSi concentrations, from February to July 2012 in subsurface waters of the eastern English Channel

3.2. *Phytoplankton composition, spatial and temporal patterns*

In the EEC, between February and July 2012, the eight identified phytoplankton clusters were present at all dates and stations. Picophytoplankton clusters (Fig. 4), including *Synechococcus* spp., and picoeukaryotes I and II, were the dominant groups over the whole sampling period, contributing, on average, up to 47% of total phytoplankton abundance determined by flow cytometry. The haploid and diploid stages of *P. globosa* were the next most abundant clusters, representing, on average, about 44 % of the phytoplankton abundance. Diatoms-like, Cryptophytes and Coccolithophores accounted for less than 5% on average.

An important spatial variability in phytoplankton distribution was observed all along the sampling area (Fig. 4). The high spatial resolution recorded by the flow cytometry revealed large changes in relatively short distances. *Synechococcus* spp. abundance was high along the studied transect in February with an abundance maximum of $6.2 \cdot 10^3$ cells cm^3 at S9. Moreover, high abundances were detected mainly in offshore waters, especially in summer. Picoeukaryote I (max. $7 \cdot 10^3$ cells cm^3 , S8) and Cryptophytes (max. $3.9 \cdot 10^2$ cells cm^3 , S2) were more abundant in offshore waters before the *P. globosa* bloom while their distribution became more homogeneous over the whole transect during the *P. globosa* bloom. The Coccolithophores maximum abundance (up to $8.5 \cdot 10^2$ cells cm^3) was registered along the transect on April 06, whereas at all the other dates, Coccolithophores were more abundant in inshore waters. Finally, picoeukaryotes II showed maximum abundance at S6 at the end of March ($7 \cdot 10^3$ cells cm^3) as well as at coastal stations at the end of April during the wax and wane of the *P. globosa* spring bloom, respectively. However, picoeukaryotes II seemed to be the dominant group in May when the others groups were less concentrated. Diatoms-like were mostly represented in inshore waters in particular during spring, when they reached their maximum values ($14.3 \cdot 10^2$ cells cm^3 , at the station S3). *P. globosa* haploid cells were present in February-March and were more abundant than *P. globosa* diploid cells as they reached a maximum of $14.7 \cdot 10^3$ cells (S3, April 27). On the contrary, *P. globosa* diploid abundance was lowest in early April, followed by a sharp increase to reach its highest value ($11.8 \cdot 10^3 \text{ cm}^3$) in inshore waters (S3), and decreased again sharply thereafter to practically became undetectable by late spring and summer.

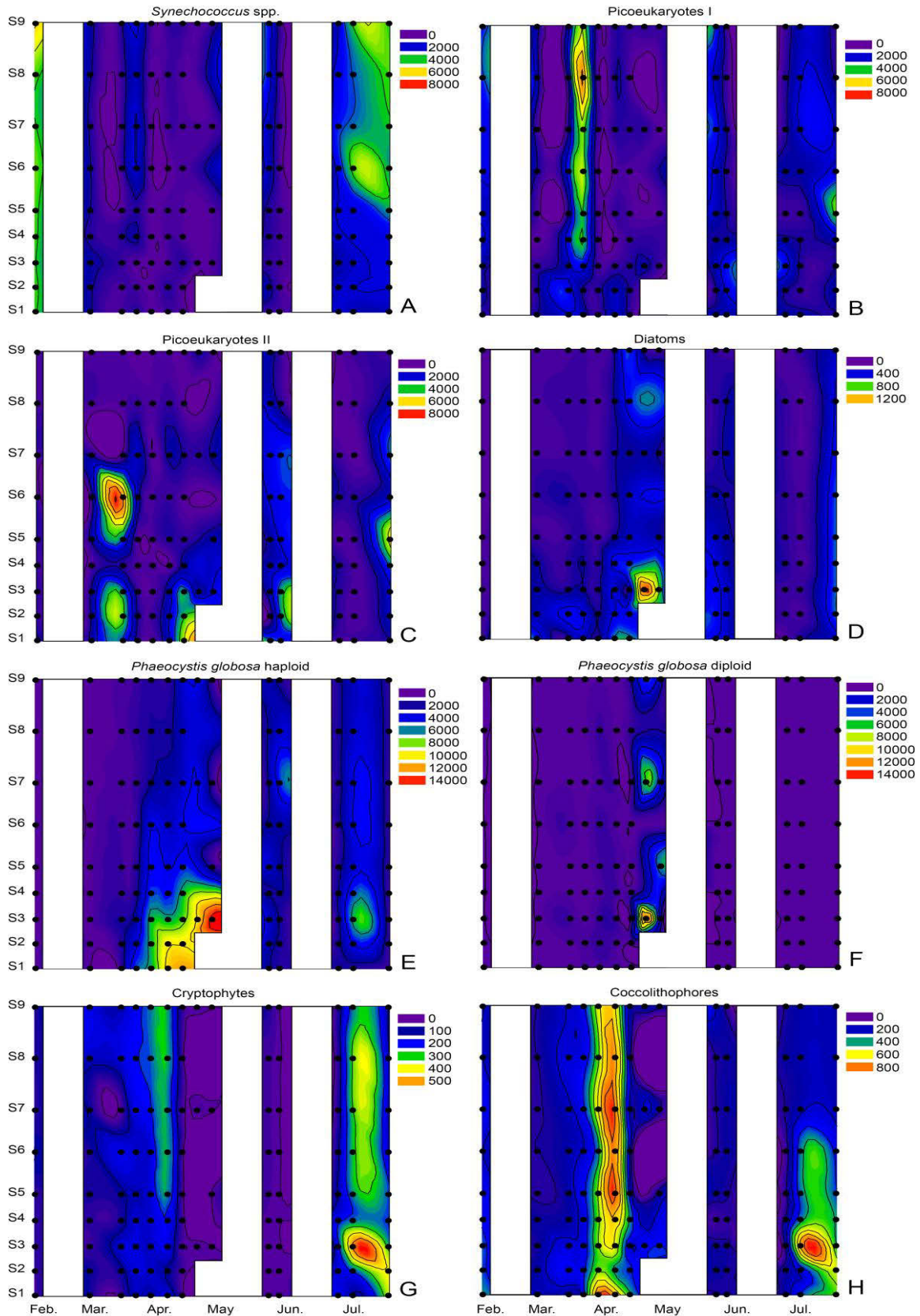


Figure 4. Spatio-temporal abundance (cells cm³) of (A) *Synechococcus* spp., (B) picoeukaryotes I, (C) picoeukaryotes II, (D) Diatoms-like, (E) *Phaeocystis globosa* haploid, (F) *Phaeocystis globosa* diploid, (G) Cryptophytes, and (H) Coccolithophores, from February to July 2012 in subsurface waters of the eastern English Channel

The permutation test carried out on the between-station analysis showed a significant difference in the spatial distribution of phytoplankton assemblages ($p < 0.0001$). This spatial variability contributed only to 21% of the total data variability in phytoplankton abundance data during the period studied. The first and second axis of the between-station analysis explained 75 and 9% of the total data variability (Fig.5A). The first axis showed *Synechococcus* spp. abundance increasing gradually towards offshore, while Diatoms-like, Coccolithophores, picoeucaryotes II and, to a lesser extent, the haploid stage of *P. globosa* abundance, decreased (Fig.5A, 5B). Cryptophytes and picoeucaryotes I groups presented also on some occasions an offshore-inshore gradient depending on the season and thus, it was not significant for all the sampling period. Distinct phytoplankton assemblages were highlighted relatively to the station's position by the HAC with Ward's method, discriminating stations S1, S2, and S3; stations S4, S5, and S6; and stations S7, S8, and S9 (Fig.5B).

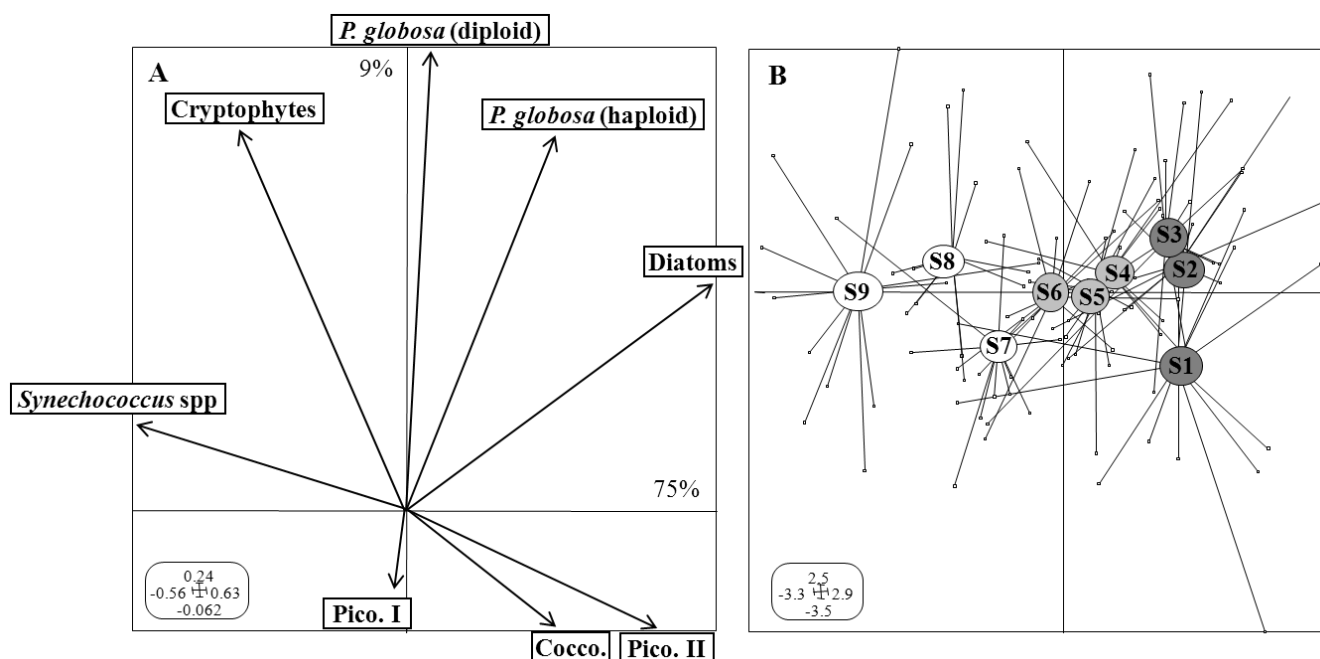


Figure 5. Between-station PCA analysis of phytoplankton assemblages. A. Projection of the variables on the first factorial plane explaining 84% of the total inertia. B. Projection of the sampling stations. Note the different scales. Dark and light grey, and colorless symbols correspond to the three groups of stations revealed by the HAC with Ward' method of the station coordinates onto the factorial map

The HAC with Ward's method of the phytoplankton cluster coordinates projected onto the factorial map allowed distinguishing five phytoplankton groups, all contributing significantly to the seasonal structure: (1) Cryptophytes and Coccolithophores, on the lower side of the

second axis, whose abundance contributed the most in early April and early July; (2) the haploid and diploid stage of *P. globosa* on the left side of the first axis, which dominated phytoplankton abundance in April, just after Cryptophytes and Coccolithophores early spring maximum ; (3) Diatoms-like both on the left side of the first axis and on the upper side of the second axis, showing the highest abundance contribution in late April; (4) picoeukaryotes II on the upper side of the second axis which were the major contributors to the phytoplankton abundance in May; and (5) *Synechococcus* spp. and picoeukaryotes I, on the right side of the first axis, whose abundance was dominant in February and also in June-July (mainly for *Synechococcus* spp.).

3.3. Relationships between environmental variables and phytoplankton assemblages

Picoeukaryotes I and *Synechococcus* spp. abundance increased from February to March when relatively low light intensity prevailed but DIN and DIP showed high concentration (Fig. 3), and in July when DIN and DIP were depleted (<1 and $0.1 \mu\text{M}$, respectively) but light intensity showed high levels. Moreover, Coccolithophores, Cryptophytes and *P. globosa* abundance increased soon after the start of the DSi depletion and, for the first two groups, also in early July, when all nutrients were depleted and light was relatively high. Co-inertia analysis (Fig. 6B) revealed a significant coupling ($p < 0.001$, $RV = 0.27$) between phytoplankton groups and environmental variables. Accordingly, the first two axes were clearly dominant and both explained 93 % of the total variance. The results of this analysis indicated that DIN, DSi, DIP and daily light intensity (I) were the most important variables in structuring the winter to summer transition of phytoplankton groups. Moreover, the relative central position on the factorial map of both picoeukaryotes I, Cryptophytes, and Coccolithophores, indicated that none of the environmental variables used in this analysis could explain significantly their seasonal variations. The two *P. globosa* groups were associated with waters showing relatively low DSi, DIN and DIP concentrations and high daily light intensity (Fig. 6B), while *Synechococcus* spp. was associated with low light intensity and high DIP, DSi and DIN concentrations. It should be noted that, the diploid stage of *P. globosa* seemed to be associated with DSi depletion, whereas the haploid stage of *P. globosa* was associated with DIN and DIP depletion. Finally, the picoeukaryote II and Diatoms-like groups were related to relatively high SST and low SSS values.

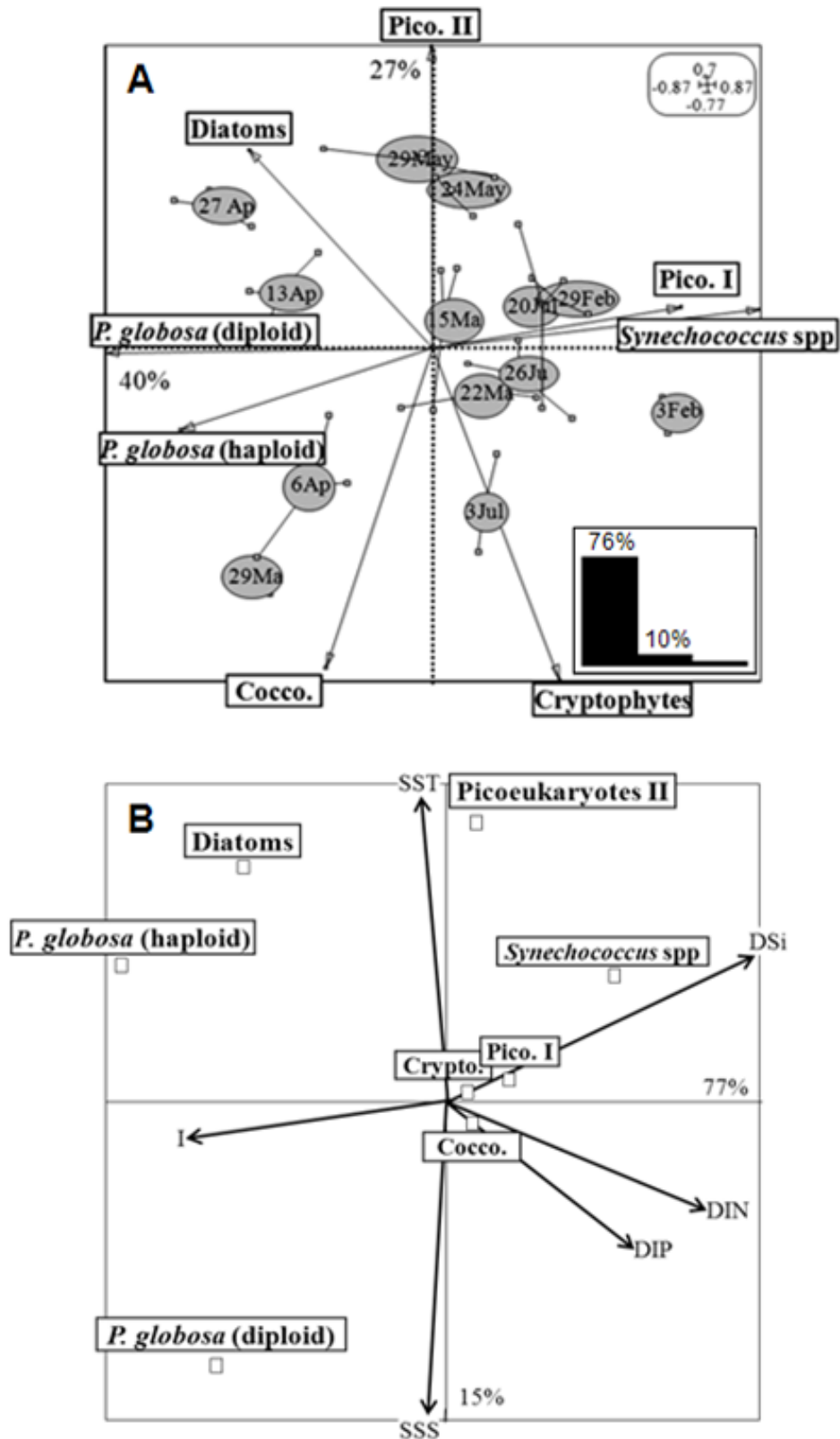


Figure 6. Seasonal variations in phytoplankton assemblages recorded between February and July 2012 along the eastern English Channel. (A). Projections of phytoplankton groups, and all the zones (grey square) and days barycentre (grey circle) on the two first axes with eigenvalues of the inter-structure analysis. (B) Co-inertia analysis performed on the environmental variables and the phytoplankton groups abundance

4. Discussion

Although the sampling was limited to a single surface water sample and FCM provided only broad taxonomic resolution of major cytometric groups, this study allowed us to improve our knowledge on the occurrence and spatio-temporal distribution of the main phytoplankton groups inhabiting coastal waters of the eastern English Channel (EEC) and highlighted new players during the winter-spring-summer phytoplankton succession. Previous studies in coastal and open marine waters of EEC, focused on microplankton abundance by applying conventional microscopy (Gómez and Souissi, 2007; Schapira et al., 2008; Lefebvre et al., 2011; Grattepanche et al., 2011a, b; Hernández-Fariñas et al., 2013), and pigment analysis (Brunet et al., 1996; Breton et al. 2000). The FCM made it possible to refine the abundance assessment of Cryptophytes in this area, which was on average one order of magnitude higher than when assessed by inverted microscopy (*data not shown*) due probably to fixatives, which may deteriorate their membranes (Klaveness, 1985).

The present study revealed that picophytoplankton dominated numerically at all dates and stations considered, except during the *P. globosa* spring bloom, when the abundance of the smallest cells dropped by a factor of two, resulting mainly from the decline of both picoeucaryotes I and *Synechococcus* spp. These two picophytoplankton groups exhibited similar variations, with abundance maxima in February and July. Abundance maxima of *Synechococcus* spp. were similar to those found in coastal waters of the adjacent western English Channel (Not et al., 2004) and in the German Bight (Knefelkamp, 2009). Moreover, their decline during the *Phaeocystis* bloom was also observed in Norwegian coastal waters (Larsen et al., 2004). The ubiquity of *Synechococcus* spp. during our study, confirms the ability of this genus to adapt to variable environments, resulting from its ability to (1) saturate both photosynthesis and growth at very low light level (Morris and Grover, 1991; Stockner, 1988) and (2) outcompete larger cells for nutrient uptake (Reynolds, 1984) due to its high surface:volume ratio reducing the “package effect” (Finkel et al., 2001), and increasing nutrient diffusion (Raven, 1998), compared to larger cells. Moreover, *Synechococcus* spp. have the capacity to use dissolved organic nitrogen and phosphorus to grow when DIN and DIP are depleted (Glibert et al., 2004). All these characteristics may explain why *Synechococcus* spp. and also picoeucaryotes I, have maintained relatively high abundances in conditions of low light intensity in February and/or DIN and DIP depletion in July. In general, during the whole sampling period, these phytoplankton groups were more concentrated where

the light intensity and salinity were the highest, leading to the inshore-offshore observed gradient. Although such a large amount of variability can be attributed to light levels and nutrient concentrations it is worthy to note that the environmental variables considered here cannot be the only explanatory factors. Hence, other factors such as sedimentation (Brussard et al., 1995), turbulence (Huisman et al., 2004), as well as biotic interactions amongst co-occurring taxa could be the main structural drivers of temporal assemblages in the EEC (Genitsaris et al., 2015).

Picoeukaryotes II exhibited different temporal and spatial abundance variations compared to *Synechococcus spp.* and picoeukaryotes I, with a first abundance maxima at the end of March and then from the end of April to late May. The end of March was marked by the well-documented DIN depletion and increase in NH_4^+ concentration (Gentilhomme and Lizon, 1998; Tungaraza et al., 2003) triggering an intense microbial food web (Becquevort et al., 1998; Lamy et al., 2006). Picoeukaryotes II were related to the seasonal increase in SST and decrease in SSS (Fig. 6B), but the NH_4^+ pulse (not measured but probable) may have given advantage to this picophytoplankton group.

The abundance of Diatoms-like ($7 - 809 \text{ cells cm}^3$) and *P. globosa* (up to $1.7 \cdot 10^4 \text{ cells cm}^3$) were within the range of values previously reported on this coastal area (Grattepanche et al., 2011a, b; Lefebvre et al., 2011; Hernández Fariñas et al., 2013). It should be noted, however, that flow cytometry tends to underestimate the abundance of chain- or colony-forming taxa, such as diatoms and *P. globosa* because: (1) each particle is counted as an entity, whether it is a single cell or a colony embedding several thousands of cells (i.e. *P. globosa* colonies), and (2) the upper particle size limit of $\sim 800 \mu\text{m}$ prevents counting the large *P. globosa* colonies, which may reach several mm (Schoemann et al., 2005), but also large chain-forming diatoms. Nevertheless, a recurrent seasonal succession of Diatoms-like and *P. globosa* was detected to a certain extent, as in previous studies using inverted microscopy (Hédin-Bougard, 1980; Breton et al., 2000; Lamy et al., 2009; Guiselin, 2010; Grattepanche et al., 2011a; Hernández Fariñas et al., 2013). The Diatoms-like presented an inshore-offshore decreasing gradient of abundance. The positive relation to SST and negative relation to SSS highlighted that cell abundance was sustained by fluctuating riverine inputs and probable nutrient regeneration (Brunet et al., 1996).

The Prymnesiophyte *P. globosa* represented the second main component of phytoplankton during this study. Previous studies in temperate systems considered that *Phaeocystis* spp. develop blooms only once DSi has been depleted (e.g. Egge and Aksnes, 1992; Rousseau et al., 2002). In our study, *P. globosa* spring bloom developed two weeks after the start of DSi limitation ($\text{DSi} < 2 \mu\text{M}$). The light intensity of about $26 \text{ Em}^{-2}\text{d}^{-1}$ measured during this period was close to the threshold value observed by Peperzak ($36 \text{ Em}^{-2} \text{ d}^{-1}$, 1993). However, the present study showed also that even a light intensity as low as $4 \text{ E m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ may sustain “seeds” of *Phaeocystis* populations in winter. This is congruent with Moisan and Mitchell (1999), who highlighted the ability of the genus *Phaeocystis* to develop at low light intensity. The haploid-diploid-haploid successions observed in the present study are in accordance with the previous studies on the *P. globosa* life cycle (Rousseau et al., 1994; Peperzak et al., 2000; Rousseau et al., 2007). Even though their abundances represented a minor part of phytoplankton except in spring, their biomass contributions (data not shown) were much more important (Breton et al., 2000; Bonato et al., 2015) and the small increase in Diatoms-like abundance in winter was certainly at the origin of the DSi depletion (Egge and Aksnes 1992).

The maximum Coccolithophore abundance recorded during this study was similar to that found in adjacent areas of the North Sea (Tyrrell and Merico, 2004). Cryptophytes and Coccolithophores followed similar temporal trends, with an abundance peak in April over the whole transect, and at the end of June in inshore waters. Although the environmental variables measured in this study could not explain their variations, their first abundance peak period clearly started one week after the DSi limitation. There is a typical “lag time” that is associated with a perturbation (like increasing nutrients) and a response from the community. For example, if nutrients are high at a given sampling event it may be days later before there is an observed increase in autotroph abundance as these nutrients are converted into biomass. This observation is congruent with the conclusion of the review of Tyrrell and Merico (2004), who considered a low DSi level as the main environmental factor favouring the bloom development of Coccolithophores. The ecology of Cryptophytes is overall poorly documented because these delicate flagellates are often difficult to identify by optical microscopy and/or lost because of fixation. Nevertheless, previous studies have shown Cryptophytes being associated with high DIN (Högländer et al., 2013; Mendes et al., 2013) and DIP levels (Levine et al., 1997). They are also considered to be well adapted to low light intensity thanks to their particular light harvesting complexes (Hammer et al., 2002; Houliez et al., 2013), and their capacity to uptake dissolved organic carbon to counteract low light conditions (Hammer

et al., 2002; Marshall et al., 2002). Our study suggested that DSi limitation could be a supplementary triggering factor for the Cryptophytes and Coccolithophores development.

5. Conclusion

The present study clarified some of the processes structuring the spatial and temporal phytoplankton distributions in a coastal ecosystem under the influence of river discharges. The high spatial resolution recorded by the flow cytometry revealed large changes on relatively short distances and revealed an inshore-offshore gradient of phytoplankton abundance sustained by fluctuating riverine inputs and probable nutrient regeneration (Brunet et al., 1996). The temporal changes in phytoplankton abundance fell into five distinct seasonal patterns: i) the winter, with *Synechococcus* spp. and picoeukaryotes as dominant groups [these small cells can grow even under limited resources (nutrients and light), their morphology providing a high surface:volume ratio, enabling rapid nutrient exchange through the cell surface (Reynolds, 1984)], ii) the early spring, characterized by high abundances of Cryptophytes and Coccolithophores, rapidly followed by iii) the bloom of *P. globosa* coupled to the increase of Diatoms-like from mid to late April, iv) mid to late spring, when the low nutrient concentrations support the development of small cells as picoeukaryotes II, v) the summer, characterized by the dominance of *Synechococcus* spp., picoeukaryotes I, Cryptophytes and Coccolithophores as main structuring phytoplankton groups. Even though the environmental variables considered explained a significant part of the seasonal abundance variation of most phytoplankton groups, some of the groups were not correlated with the environmental variables, measured at a lower spatial resolution than phytoplankton data. The incorporation of functional traits -such as size, pigments, biomass and photosynthetic features- in the analysis of future phytoplankton studies at high spatial and/or temporal resolution, could lead to a comprehensive interpretation of abundance data into a broader ecological perspective.

Acknowledgements

We thank the captain and the crew of the R.V. “*Sepia II*” (INSU-CNRS) for their help during the cruises. Marine Verne is acknowledged for her technical assistance during the sampling and analysis. We thank Valérie Gentilhomme for the nutrient analysis. We thank the three anonymous reviewers for their constructive comments and suggestions for improving the original version of the manuscript, as well as Dr. Luff for language correction. This study was supported by the DYMAPHY (INTERREG IVA “2 Mers Seas Zeeën”) project (www.dymaphy.eu) co-funded by the European Regional Development Funds (ERDF). S. Bonato was supported by a Ph.D. grant co-funded by the DYMAPHY project and the Syndicat Mixte de la Côte d’Opale (SMCO).

References

- Aminot, A., & Kérouel, R. (2004). *Hydrologie des écosystèmes marins: paramètres et analyses*. Editions Quae.
- Becquevort, S., Rousseau, V., Lancelot, C., 1998. Major and comparable roles for free-living and attached bacteria in the degradation of *Phaeocystis*-derived organic matter in Belgian coastal waters of the North Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, 14, 39–48.
- Bonato, S., Christaki, U., Lefebvre, A., Lizon, F., Thyssen, M., Artigas, L.F., 2015. High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area, in spring: The eastern English Channel. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 154, 214–223.
- Breteler, W.C.M.K., 1985. Fixation artifacts of phytoplankton in zooplankton grazing experiments. *Hydrobiol. Bull.*, 19, 13–19.
- Breton, E., Rousseau, V., Parent, J.-Y., Ozer, J., Lancelot, C., 2006. Hydroclimatic modulation of diatom/*Phaeocystis* blooms in nutrient- enriched Belgian coastal waters (North Sea). *Limnol. Oceanogr.*, 51, 1401–1409.
- Breton, E., Brunet, C., Sautour, B., Brylinski, J.-M., 2000. Annual variations of phytoplankton biomass in the Eastern English Channel: comparison by pigment signatures and microscopic counts. *J. Plankton Res.*, 22, 1423–1440.
- 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. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 43, 469–483.
- Brylinski, J.M., 1991. Le “fleuve cotier”: un phénomène hydrologique important en Manche orientale (exemple du Pas-de-Calais). *Ocean. Acta*, 11, 197–203.
- Chessel, D., Dufour, A.B., Thioulouse, J., 2004. The ade4 package-I-One-table methods. *R News.*, 4, 5–10.
- Cloern, J.E., 1996. Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: A review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Rev. Geophys.*, 34(2), 127–168.

- Christaki, U., Kormas A.K., Genitsaris, S., Georges, C., Sime-Ngando, T., Viscogliosi, E., Monchy, S., 2014. Winter–Summer Succession of Unicellular Eukaryotes in a Meso- eutrophic Coastal System. *Microb. Ecol.*, 67, 13-23.
- Dolédéc, S., Chessel, D., 1994. Co-inertia analysis: an alternative method for studying species–environment relationships. *Freshw. Biol.*, 31, 277–294.
- Dolédéc, S., Chessel, D., 1989. Rythmes saisonniers et composantes stationnelles en milieu aquatique. II: Prise en compte et élimination d'effets dans un tableau faunistique. *Acta Oecologica Oecologia Gen.*, 10, 207–232.
- Dray, S., Dufour, A.B., Chessel, D., 2007. The ade4 Package-II: Two-table and K-table Methods. *R news*. 7, 47-52.
- Dubelaar, G.B.J., Gerritzen, P.L., Beeker, A.E.R., Jonker, R.R., Tangen, K., 1999. Design and first results of CytoBuoy: A wireless flow cytometer for in situ analysis of marine and fresh waters. *Cytometry*, 37, 247–254.
- Dubelaar, G.B.J., Geerders, P.J.F., Jonker, R.R., 2004. High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics. *J. Environ. Monit.*, 6, 946–952.
- Dupont, J., 1980. Suivi hydrobiologique du détroit du Pas de Calais. II Pigments végétaux-Phytoplankton. DEA, Universités de Paris VI et Lille I, Station Marine de Wimereux, France, 141 pp.
- Egge, J.K., Aksnes, D.L., 1992. Silicate as regulating nutrient in phytoplankton competition. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 83, 281-289.
- Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science*, 281, 200–206.
- Falkowski, P.G., 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynth. Res.*, 39, 235–258.
- Finkel ZV., 2001. Light absorption and size scaling of light limited metabolism in marine diatoms. *Limnol. Oceanogr.*, 46, 86–94.
- Galand, P.E., Lovejoy, C., Hamilton, A.K., Ingram, R.G., Pedneault, E., Carmack, E.C., 2009. Archaeal diversity and a gene for ammonia oxidation are coupled to oceanic circulation. *Environ. Microbiol.* 11, 971–980.
- 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.
- Glibert, P.M., Heil, C.A., Hollander, D.J., Revilla, M., Hoare, A., Alexander, J., Murasko, S., 2004. Evidence for dissolved organic nitrogen and phosphorus uptake during a cyanobacterial bloom in Florida Bay. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 280, 73.
- Gómez, F., Souissi, S., 2007. Unusual diatoms linked to climatic events in the northeastern English Channel. *J. Sea Res.*, 58, 283–290.
- Grattepanche, J.-D., Breton, E., Brylinski, J.-M., Lecuyer, E., Christaki, U., 2011a. Succession of primary producers and micrograzers in a coastal ecosystem dominated by *Phaeocystis globosa* blooms. *J. Plankton Res.*, 33, 37-50.
- Grattepanche, J.-D., Vincent, D., Breton, E., Christaki, U., 2011b. Microzooplankton herbivory during the diatom–*Phaeocystis* spring succession in the eastern English Channel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 404, 87–97.
- Gregg, W.W., Conkright, M.E., Ginoux, P., O'Reilly, J.E., Casey, N.W., 2003. Ocean primary production and climate: Global decadal changes. *Geophys. Res. Lett.*, 30, 1809.

- Guiselin, N., 2010. Caractérisation des événements phytoplanctoniques en zone côtière : test des techniques alternative et développement d'indicateurs de qualité des masses d'eau. PhD Thesis in Biological Oceanography. Université du Littoral Côte d'Opale, France. 183 pp..
- Hammer, A. *et al.* 2002. Light and temperature acclimation of *Rhodomonas salina* (Cryptophyceae): photosynthetic performance. *Aquat. Micr. Ecol.*, 29: 287–296.
- Hédin-Bougard, M., 1980. Hydrobiologie littorale: phytoplancton (région de Dunkerque-Mer du Nord). Thèse Université Lille I, Station Marine de Wimereux, France, 204 pp.
- Hernández-Fariñas, T., Soudant, D., Barillé, L., Belin, C., Lefebvre, A., Bacher, C., 2013. Temporal changes in the phytoplankton community along the French coast of the eastern English Channel and the southern Bight of the North Sea. *ICES J. Mar. Sci. J. Cons.* 71, 821-833.
- Högländer, H., Karlson, B., Johansen, M., Walve, J., Andersson, A., 2013. Overview of coastal phytoplankton indicators and their potential use in Swedish waters.
- Houliez, E., Lizon, F., Thyssen, M., Artigas, L.F., Schmitt, F.G., 2012. Spectral fluorometric characterization of Haptophyte dynamics using the FluoroProbe: an application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *J. Plankton Res.*, 34, 136-151.
- Houliez, E., Lizon, F., Artigas, L.F., Lefebvre, S., Schmitt, F.G., 2013. Spatio-temporal variability of phytoplankton photosynthetic activity in a macrotidal ecosystem (the Strait of Dover, eastern English Channel). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 129, 37–48.
- Klavessen, D., 1985. Classical and Modern Criteria for Determining Species of Cryptophyceae. *Bulletin of Plankton Society of Japan.*, 32, 111-123.
- Lamy, D., Obernosterer, I., Laghdass, M., Artigas, F., Breton, E., Grattepanche, J., 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. *Aquat. Microb. Ecol.*, 58, 95–107.
- Lamy, D., Artigas, L.F., 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. *J. Sea Res.*, 56, 227–238.
- Larsen, A., Flaten, G.A.F., Sandaa, R.-A., Castberg, T., Thyrraug, R., Erga, S.R., Jacquet, S., Bratbak, G., 2004. Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: microbial community succession and diversity. *Limnol. Oceanogr.*, 49, 180–190.
- Leblanc, C., Falciatore, A., Watanabe, M., Bowler, C., 1999. Semi-quantitative RT-PCR analysis of photoregulated gene expression in marine diatoms. *Plant Mol. Biol.* 40, 1031–1044.
- Lefebvre, A., Guiselin, N., Barbet, F., Artigas, F.L., 2011. Long-term hydrological and phytoplankton monitoring (1992-2007) of three potentially eutrophic systems in the eastern English Channel and the Southern Bight of the North Sea. *ICES J. Mar. Sci.*, 68, 2029–2043.
- Levine, S.N., Shambaugh, A. d., Pomeroy, S.E., Braner, M., 1997. Phosphorus, Nitrogen, and Silica as Controls on Phytoplankton Biomass and Species Composition in Lake Champlain (USA-Canada). *J. Gt. Lakes Res.* 23, 131–148.

- Marshall, W., Laybourn-Parry, J., 2002. The balance between photosynthesis and grazing in Antarctic mixotrophic Cryptophytes during summer. *Freshw. Biol.*, 47, 2060–2070.
- Manly, B.J.F., 1997. Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology, 2nd edition. London: Chapman and Hall.
- Marie, D., Shi, X.L., Rigaut-Jalabert, F., Vaulot, D., 2010. Use of flow cytometric sorting to better assess the diversity of small photosynthetic eukaryotes in the English Channel. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 72, 165–178.
- Mendes, C.R.B., Tavano, V.M., Leal, M.C., Souza, M.S. de, Brotas, V., Garcia, C.A.E., 2013. Shifts in the dominance between diatoms and Cryptophytes during three late summers in the Bransfield Strait (Antarctic Peninsula). *Polar Biol.*, 36, 537–547.
- Moisan, T.A., Mitchell, B.G., 1999. Photophysiological acclimation of *Phaeocystis antarctica* Karsten under light limitation. *Limnol. Oceanogr.*, 44, 247–258.
- Monchy S, Grattepanche J-D, Breton E, Meloni D, Sancier G, Delhaes, L., Viscogliosi, E., Sime-Ngando, T., Christaki, U., 2012 Microplanktonic Community Structure in a Coastal System Relative to a *Phaeocystis* Bloom Inferred from Morphological and Tag Pyrosequencing Methods. *PLoS ONE* 7(6): e39924.
- Morel, A., Smith, R.C., 1974. Relation between total quanta and total energy for aquatic photosynthesis. *Limnol. Ocean.*, 19, 591–600.
- Not, F., Latasa, M., Marie, D., Cariou, T., Vaulot, D., Simon, N., 2004. A Single Species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the Western English Channel. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 4064–4072.
- Nzigou, A-R, Lefebvre, A., 2013. The regional nutrients monitoring network of the coastal zone of the Nord Pas-de-Calais Picardie Region. Annual report for 2012.
- Olson, R.J., Zettler, E.R., Anderson, O.K., 1989. Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry*, 10, 636–643.
- Penna, A., Bertozzini, E., Batocchi, C., Giacobbe, M. G., Galluzzi, L., Garcés, E., Vila, M., Lugliè, A., and Magnani, M., 2007, Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular techniques. *J. Plank. Res.* 29: 19–38.
- 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.
- Peperzak, L., 1993. Daily irradiance governs growth rate and colony formation of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *J. Plankton Res.*, 15, 809–821.
- Raven J.A., 1984. A cost-benefit analysis of photon absorption by photosynthetic unicells. *New Phytol.* 98, 593–625
- Riley, G.A., 1957. Phytoplankton of the north central Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.*, 2, 252–270.
- Reynolds, C.S., 1984. Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. *Freshw. Biol.*, 14, 111–142.
- Rousseau, V., Chrétiennot-Dinct, M.-J., Jacobsen, A. Verity, P., Whipple, S., 2007. The life cycle of *Phaeocystis*: state of knowledge and presumptive role in ecology. *Biogeochemistry*, 83, 29–47.
- Rousseau, V., Leynaert, A., Daoud, N., Lancelot, C., 2002. Diatom succession, silicification and silicic acid availability in Belgian coastal waters (Southern North Sea). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 236, 61–73.

- Rousseau, V., Vault, D., Casotti, R., Cariou, V., Lenz, J., Junkel, J., Baumann, M., 1994. The life cycle of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae): evidence and hypothesis. In: Lancelot, C., Wassmann, P. (Eds.), Ecology of *Phaeocystis*-dominated Ecosystems. J. Mar. Syst., 5, 23–39.
- Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T., 2005. Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: A successful approach? Cytometry Part A, 64A, 16–26.
- Schapira, M., Vincent, D., Gentilhomme, V., Seuront, L., 2008. Temporal patterns of phytoplankton assemblages, size spectra and diversity during the wane of a *Phaeocystis globosa* spring bloom in hydrologically contrasted coastal waters. J. Mar. Biol. Assoc. United Kingd., 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. J. Sea Res., 53, 43–66.
- Stockner, J.G., 1988. Phototrophic picoplankton: An overview from marine and freshwater ecosystems. Limnol. Oceanogr., 33, 765–775.
- Thioulouse, J., Chessel, D., 1987. Les analyses multitableaux en ecologie factorielle. I: de la typologie d'état à la typologie de fonctionnement par l'analyse triadique. Acta Oecologica Oecologia Gen., 8, 463–480.
- 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. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 292, 19– 41.
- Thyssen, M., Mathieu, D., Garcia, N., Denis, M., 2008a. Short-term variation of phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged flow cytometer. J. Plankton Res., 30, 1027–1040.
- Thyssen, M., Tarran, G.A., Zubkov, M.V., Holland, R.J., Grégori, G., Burkill, P.H., Denis, M., 2008b. The emergence of automated high-frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability. J. Plankton Res., 30, 333–343.
- Tyrrell, T., Merico, A., 2004. *Emiliania huxleyi*: bloom observations and the conditions that induce them, in: Coccolithophores. Springer, 75–97.
- Valero, M., Richerd, S., Perrot, V., Destombe, C., 1992. Evolution of alteration of haploid and diploid phases in life cycles. Trends Ecol. Evol., 7, 25–29.
- Zarauz, L., Irigoien, X., 2008. Effects of Lugol's fixation on the size structure of natural nano– microplankton samples, analyzed by means of an automatic counting method. J. Plankton Res. 30, 1297–1303.

Chapitre V :

Relation entre les traits fonctionnels et la structuration temporelle du phytoplancton des eaux côtières de la Manche Orientale

Résumé

Ce chapitre relate les différents résultats observés sur la pertinence d'une approche fondée sur les traits fonctionnels afin d'expliquer les fluctuations temporelles des assemblages de phytoplancton et comment ils influencent l'utilisation des ressources dans les eaux côtières de la Manche orientale. Cette étude est basée sur un suivi de 3 ans (prélèvements hebdomadaires à mensuels) par cytométrie en flux, sur un point (côtier) de la radiale précédemment décrite (Chapitre IV). L'abondance de 7 groupes phytoplanctoniques (diatomées, *P.globosa* haploïdes, *P.globosa* diploïdes, Coccolithophoridés, Cryptophytes, picoeucaryotes et *Synechococcus* spp.) et leurs caractéristiques (traits fonctionnels) morphologiques (biovolume, motilité, capacité de stockage) et physiologiques (taux de croissance, affinité avec les nutriments) ont ainsi été analysés.

Les résultats obtenus ont montré un axe principal de différenciation fonctionnelle liée à l'utilisation des ressources et aux stratégies de croissance, en soulignant plusieurs compromis écologiques fondamentaux, tous animés par un gradient temporel de ressources. Les résultats ont montré qu'une faible luminosité aurait agi comme filtre environnemental sur la composition hivernale (*Synechococcus* spp., picoeucaryotes) de la communauté fonctionnelle phytoplanctonique. Par la suite, les interactions biotiques auraient progressivement modifié la structure fonctionnelle des communautés phytoplanctoniques avec l'augmentation du nombre de cellules nano- et microphytoplanctoniques, alors que l'intensité lumineuse augmentait et que les nutriments inorganiques diminuaient. Les « traits d'effet » étudiés sont significativement corrélés à l'utilisation des ressources. Cependant une plus grande significativité a été mesurée pour l'identité fonctionnelle (pondération des traits par l'abondance) qui confirmeraient l'importance de « l'hypothèse du ratio de masse » (Grime, 1998). Selon cette hypothèse ce sont les espèces dominantes et leurs traits fonctionnels qui déterminent les processus écosystémiques comme les flux de matière et d'énergie. Ces résultats confirment l'importance de prendre en compte en plus de la diversité spécifique, l'abondance relative de chaque espèce ou groupe et pourraient permettre de définir des espèces ou groupes bio-indicateurs du milieu.

Mechanisms of temporal phytoplankton succession in temperate coastal waters (eastern Channel): implications for resource use efficiency revealed by a functional trait-based approach.

Simon Bonato¹, Elsa Breton¹, Morgane Didry¹, Urania Christaki¹, Luis Felipe Artigas¹

¹ Laboratoire d'Océanologie et Geosciences (LOG – UMR CNRS 8187), Université du Littoral Côte d'Opale, Wimereux, France

*Corresponding author: simon.bonato@univ-littoral.fr

Abstract

Trait-based approaches to terrestrial plant communities help to reveal ecological strategies and processes driving community assembly across environmental gradients, and how this influences in turn ecosystem processes, but such approaches have not been often applied when addressing temporal changes and succession in natural marine phytoplankton communities. Here, the relevance of a trait-based approach in explaining temporal fluctuation in phytoplankton assemblages was evaluated, as well as the influence of these changes on the resource use efficiency, based on a 3-year time-series of flow-cytometry counting. Physiological trait values were computed from literature and from morphological measurements. Our results showed a primary axis of functional differentiation related to resource-use and growth strategies, highlighting several fundamental ecological trade-offs, all driven by a temporal resource gradient. Using functional identity and diversity indices, we showed how low light conditions acted as a filter on functional community composition in winter, and conversely, how biotic interaction, i.e. niche differentiation, progressively modified functional structure of phytoplankton communities as light intensity increased but inorganic nutrients decreased. The parallel shift in dominance, from specialists towards generalists, in the course of the season, strongly suggests environmental heterogeneity induced by biotic interactions, as a major driver of these changes. Effect traits, functional identity and functional diversity of phytoplankton communities were significantly related to resource use efficiency, but the latter in a greater extent than the functional diversity, confirming the importance of the mass-ratio hypothesis in driving some ecosystem process such as resource use efficiency.

Keywords: functional trait, functional identity, phytoplankton, community assembly, generalists, resource use efficiency.

1. Introduction

Phytoplankton community structure plays a major role in shaping the dynamics and functioning of ecosystems, including nutrient cycles (Falkowski *et al.*, 1998 ; Arrigo *et al.*, 1999), hence providing ecosystem services of high value, such as fishery yields and water quality. In coastal systems, phytoplankton represents usually almost the whole primary production (e.g. Cloern, 2001). Given the high value of such systems for human well-being (Costanza *et al.*, 1997, 2014), and the human induced nutrient-enrichment for many of them (Cloern, 2001 ; Lost *et al.*, 2006), it is crucial therefore, to understand how phytoplankton communities assemble in response to the variable environment they experience, and in turn whether this influences ecosystem processes.

Functional trait-based approach is a very powerful tool for such investigation. By considering a species as a multi-trait structure and not a taxonomic entity alone, it allows to draw the functional niche of each species by its position in the multidimensional trait space (Violle and Jiang, 2009). Thus, axes of functional differentiation across species, and therefore, differential ecological strategies can be defined, as a result of trade-offs in species performance preventing any “superspecies” from excluding all others (Cornwell and Ackerly, 2009 ; Diaz *et al.*, 2004 ; Grime *et al.* 1997 ; Kneitel and Chase, 2004). The trait-based approach may help also to get insights on the mechanisms of functional diversity in driving ecosystem processes, i.e. which of the “diversity hypothesis” (Tilman *et al.*, 1997) and the “mass-ratio hypothesis” (Grime, 1998) are considered to influence the most ecosystem processes. This question is of great importance given the loss and/or modification of biodiversity observed all around the world (Cardinale *et al.*, 2012). Accordingly, “the diversity hypothesis” stipulates that trait complementarity, and thus implying all the species and its attributes within a community, is the most important mechanism in driving ecosystem processes, while the “mass-ratio hypothesis” stipulates that it is the trait of the dominant species within a community which is the most important one.

In phytoplankton ecology, despite a call of interest in adopting a trait-based approach to get insights into the ecological strategies and the mechanisms of phytoplankton community assembly across natural environmental gradients, (e.g. Litchman and Klausmeier, 2008 ; Litchman *et al.*, 2015), studies using such approach are still few (Edwards *et al.*, 2013a,b ;

Fraisse *et al.*, 2013 ; Kruk *et al.*, 2011 ; Acevedo-Trejos *et al.*, 2015). One reason is the great difficulty to quantify ecophysiological functional traits of species in their natural environment except for morphological traits. An alternative, however, is to compile data of traits values from literature based on laboratory experiments (e.g. Edwards *et al.*, 2011 ; Edwards *et al.*, 2013a, b). As a result, most of fundamental trade-offs in phytoplankton species performance highlighted from theoretical/modelling works (Grover, 1997 ; Litchman *et al.*, 2001) and/or data compilations from experiments (e.g., Edwards *et al.*, 2011 ; Schwaderer *et al.*, 2011) have not been verified among natural phytoplankton communities (Pomatti *et al.*, 2013). For example, one predicted trade-off considered to be important in structuring phytoplankton communities is the “gleaner-opportunist” trade-off (Grover, 1997), whereby the resource competitive ability of a species (i.e. gleaners) trades off with its ability to grow fast (i.e. opportunists). Finally, how functional structure and composition of phytoplankton communities shape ecosystem processes, such as resource use efficiency (RUE), is yet to be investigated. In previous studies, RUE has been positively related to phytoplankton richness in various marine and freshwater systems (Patnik *et al.*, 2008 ; Striebel *et al.*, 2009), suggesting complementary resource use (“the diversity hypothesis”) as an enhancer of ecosystem processes (Tilman *et al.*, 1997 ; Cardinale, 2011). In such a case, RUE should be positively related to the within-community functional diversity, and thus increase as niche differentiation becomes more intense. However, it is also possible that functional identity (i.e. “the mass-ratio hypothesis”) may play an important role in influencing RUE, as it is increasingly shown for many ecosystems processes ensured by terrestrial plants (e.g. Mokany *et al.*, 2008) and animals (Gagic *et al.*, 2015).

Nutrients, light, temperature, and grazing pressure are the major drivers of phytoplankton growth (e.g. Margalef, 1978), and disturbance is considered essential in structuring communities and ecosystem functioning (Hooper *et al.*, 2005 ; Diaz *et al.*, 2007). Because mixotrophy is widespread among phytoplankton (Moore *et al.*, 2002, Sanderson *et al.*, 2008, Tittel *et al.*, 2003), and that variations of dissolved organic matter follow in general that of primary production (e.g. van der Zee and Chou, 2005), as the result of various biotic processes such as phytoplankton exudation (e.g. Sanderson *et al.*, 2008) and sloppy feeding by zooplankton (e.g. Eppley *et al.*, 1981), we expect, therefore, that light rather than nutrients could act as an environmental filter on phytoplankton functional traits in winter, favouring specialists able to capture efficiently light energy at that time. Conversely, we expect a shift

towards the dominance of opportunists increase in the course of the season. Moreover, as biotic interactions become more intense, niche differentiation could set up, and favour generalists as a result of an increase in biotic-mediated environmental heterogeneity (Levins, 1968 ; Kassen, 2002). However, specialists may be also favouring, depending on the intensity of environmental heterogeneity (Levins, 1968 ; Kassen 2002).

In this study, we applied a trait-based approach, based on a compilation of ecophysiological trait data from literature and our own morphological trait values, to pelagic phytoplankton assemblages detected by flow cytometry for about 3 years in coastal waters of the eastern English Channel. We first aimed to identify both the key functional traits promoting the fitness of phytoplankton groups in their environment (“response traits”, Lavorel and Garnier, 2002) and the major axes of functional differentiation across the phytoplankton groups (i.e. trade-offs of group performance). Then, we evaluated shifts in functional identity and functional diversity indices in order to assess the relative importance of abiotic factors and biotic interactions in driving phytoplankton community assembly. Finally, we aimed to identify functional traits affecting resource use efficiency (“effect traits”, Lavorel and Garnier, 2002), and assess the relative importance of functional identity and functional diversity in driving RUE.

2. Material and methods

2.1. Phytoplankton assemblage

Subsurface seawater (-2 m) samples for flow cytometer (FCM) analysis were collected using a 8L Niskin bottle, onboard the “*Sepia II*” Station Research Vessel (CNRS INSU) at 47 occasions (May 2011 to June 2014) , at the coastal station R1 (50°48’N ; 1°34’E) in the eastern English Channel. Analyses were performed immediately after coming back to the laboratory, with a CytoSense pulse-shape recording flow cytometer (FCM; Cytobuoy[®] b.v., Netherlands). In order to detect the widest range of phytoplankton cells and colonies as possible (from 1 µm to ~ 800 µm), two different runs were performed sequentially on each sample: one at low red fluorescence trigger level (i.e. around 10 mV, just over the baseline fluorescence noise) during a short time analysis (i.e. around 4 min) for detecting pico- and

nano-phytoplankton, and another one at high trigger level (i.e around 25 mV) during a longer time (i.e. around 8 min) for detecting the larger and less numerical dominant species containing high amounts of chlorophyll *a*, i.e. diatom cells and colonies. Fluorescent beads 10 μm (Polybead[®]) in diameter were used to normalize the SFCM size recordings.

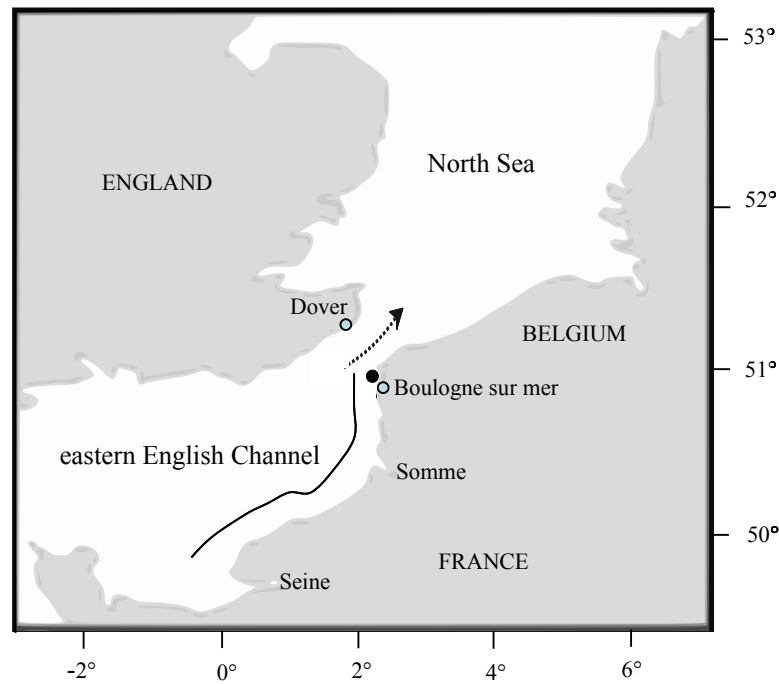


Figure 1. Map showing the residual circulation of water masses (hatched arrow) in the eastern English Channel and southern North Sea, and the location of Seine and Somme Rivers. Blue light and black dots indicate the location of Boulogne-sur-mer and Dover, and the sampling coastal station R1; respectively. The limit of the ‘coastal flow’ in the eastern English Channel is indicated by hatched line

2.2. Phytoplankton traits

Table I gives an overview of the 11 morpho-physiological traits used in this study and their function meanings, that most likely influence phytoplankton community assemblages (Raven, 1987; Litchman and Klausmeier, 2008 ; Schwaderer *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2012 ; Edwards *et al.*, 2013 ; Edwards *et al.*, 2015). These included biovolume [V] as the “master trait” for resource acquisition, reproduction and predatory (Litchman and Klausmeier, 2008), growth dependence on both temperature (maximum growth rate at 12.5°C [$\mu_{\text{max}12.5^\circ\text{C}}$, day⁻¹, Edwards *et al.*, 2013] and light (maximum growth rate under saturating irradiance [μ_{maxLight} , day⁻¹], Schwaderer *et al.*, 2011; Edwards *et al.*, 2015), those related to the

cellular requirements in nitrogen and phosphorous (C/N and C/P cell content ratio [C/N and C/P ratios, mol:mol]), the capacity of photoadaptation (saturating irradiance for growth [E_k , $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]), and those related to the competitive ability under light and/or nutrient limitation (Surface area to Volume cell ratio [S/V ratio], presence/absence of flagella, reserve-storage capacity, the initial slope of the growth-irradiance curve [α , $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Schwaderer *et al.*, 2011; Edwards *et al.*, 2015], and the nitrate scaled affinity [N_{aff} , $\text{L } \mu\text{mol}^{-1} \text{day}^{-1}$, Edwards *et al.*, 2012, 2013]). Traits data were compiled from published literature research (a total of 70 papers and reports including 57 species, see at the end of manuscript), except for morphological ones, which were determined based on measurements made by flow cytometry or inverted microscopy, depending on the phytoplankton group. As species differ in their trait values (Litchman *et al.*, 2007; Litchman and Klausmeier, 2008), and that some species display ecotypes, i.e. differences in their light and nutrient utilization (e.g. Ahlgren and Rocap, 2012), we aimed as possible to select species/strains from temperate systems. For example, only strains rich in phycoerythrin were considered for *Synechococcus* spp. If several data were available for one species or group, they were averaged. Note that although *Phaeocystis* diploid cells were predominantly represented by free-living cells from cytometry counts, these are from colonial origin or are supposed to form new colonies, corresponding to the same morphotype than cells embedded in colonies (Rousseau *et al.*, 2007). Therefore the choice in trait values for *Phaeocystis* diploid cells corresponded to those of *Phaeocystis* colonies.

Table I. List of phytoplankton life-traits used in this study, their abbreviations, unity, and function meaning

Life-trait	Code	Unity	Function meaning	How measurements have been made*
C/N ratio cell content	C/N ratio	mol:mol	Nitrogen requirement	Various sources compiled (26 papers-49 species)
C/P content	C/P ratio	mol:mol	Phosphorous requirement	Various sources compiled (17 papers-25 species)
Growth rate at 12,5°C under non-limiting conditions of light and nutrients	$\mu_{\max}(12,5^{\circ}\text{C})$	Day ⁻¹	Growth performance under non-limiting conditions of light and nutrients (Edwards et al. 2013)	Published equations of growth-temperature models (5 papers) except for <i>Synechococcus</i> spp. and picoeukaryotes where data from various sources (3 papers) were averaged per group
Growth rate under non-limiting conditions of light	$\mu_{\max}\text{Light}$	Day ⁻¹	Growth performance under saturating light	
initial slope of the growth-irradiance curve	$\alpha\mu$	$\mu\text{E}^{-1} \text{ m}^2 \text{ s day}^{-1}$	Growth efficiency under low light	Growth-irradiance model (Monod equation) applied on data from various laboratory experiments (30 papers-28 species)
Onset of light saturation under non-limiting nutrients conditions	Ek	$\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Capacity of photoadaptation	
Scaled Nitrate affinity	N_{affinity}	$\text{L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ day}^{-1}$	Competitive ability for nitrate under low nitrate concentration (Edwards et al 2012; 2013)	$N_{\text{aff}} = [V_{\max}/(K_s * Q_{\min})]$; allometric equation from Edwards et al. (2012)
Storage	Storage	n.u	Luxury uptake of nutrients and capacity to do reserves	Knowledge from literature (e.g. Raven (1997), Tozzi et al. (2004), Lancelot and Mathot (1985),
Flagella	Motility	n.u	Capacity to move under limiting conditions of light and nutrients	Knowledge from literature for picoeukaryote
Surface area to Volume cell ratio	S/V ratio	μm^{-1}	Capacity to harvest light and nutrients under limiting conditions	
Biovolume	V	μm^3	Master trait for resource acquisition, reproduction, and predator avoidance (Litchman and Klausmeier 2008)	Microscopic measurements except for coccolithophores, <i>Synechococcus</i> spp. and picoeukaryote which were measured by cytometry

* for published data sources see Appendix I

2.3. Mean traits values of each phytoplankton group

2.3.1. Photophysiological traits

All the mean traits values are presented in Table II. Because photophysiological parameters (μ_{maxLight} , [day^{-1}], $\alpha\mu$ [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s d}^{-1}$], E_k [$\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$]) are influenced by both temperature and nutrient conditions, we selected only published literature where phytoplankton cultures were grown at a temperature at or near 20°C, and in nutrient-replete media. Although the length of photoperiod is also an influencing factor, we did not correct it, because it is species specific (Paasche, 1968; Brand & Guillard, 1981). The photophysiological parameters were obtained by fitting curve according to the Monod equation (see Shwaderer *et al.*, 2011) for the similarity in the photophysiological parameter values with the common Platt equation [Platt *et al.*, 1980] :

$$\mu(I) = \frac{\mu_{\text{max}} I}{I + \frac{\mu_{\text{max}}}{\alpha}}$$

with I the irradiance ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), μ_{max} the maximal growth rate (d^{-1}), and α the initial slope of the growth-irradiance curve ($\mu\text{E}^{-1} \text{m}^2 \text{s d}^{-1}$). The onset of light saturation (E_k , ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was calculated as μ_{max}/α .

2.3.2. Growth dependence on temperature

Growth rate at 12.5°C was calculated from published growth-temperature equation when available based on the compilation of worldwide data. It was the case for *Phaeocystis* (Schoemann *et al.*, 2005), and the coccolithophore *Emiliana huxleyii* (Fielding, 2014). Maximal growth rate calculated for *E. huxleyii* was compared with data from laboratory experiments with 6 species of Coccolithophores (Buitenhuis *et al.*, 2008). For diatoms, we applied the equation established by Bessinger *et al.* (2008), based on a phytoplankton database from English waters (near Liverpool). Because we did not found any data on marine Cryptophytes, we used equations established for freshwater species (Cloern, 1977 ; Olaja 1993). Finally, maximal growth rate of *Synechococcus* spp. and picoeukaryotes were assessed

from a worldwide field database compiled by Chen *et al.* (2014) where media was nutrient-enriched, complemented by data from Stawiarski (2013) and Pittera *et al.* (2014).

2.3.3. *Physiological traits related to nutrients*

The Nitrate scaled affinity (N_{aff} , L $\mu\text{mol}^{-1} \text{d}^{-1}$) was calculated according to the allometric equation established by Edwards *et al.* (2012), based on the compilation of literature data for 64 marine species cultivated at or near 20°C with sufficient light:

$$\text{Log}N_{\text{aff}} = -0.63 \log V + 2.9$$

For C/N and C/P cell content ratios, only data where phytoplankton culture was grown in nutrient-replete media were compiled.

2.3.4. *Morphological traits and reserve-storage capacity*

Biovolume (μm^3) and surface area (μm^2) of each phytoplankton group were calculated using the geometrical formula given by Hillebrand *et al.* (1999), based on measurements by cytometry for *Synechococcus* spp., picoeukaryotes, *Phaeocystis* haploid cells, and Coccolithophores, and by inverted microscopy according to the Utermohl method for *Phaeocystis* colonies, diatom species, and Cryptophytes. For microscopy, 20 specimens of each diatom species, 20 ones of each size category of Cryptophytes, and all healthy *Phaeocystis* colonies were measured at each sampling date in a settled volume of 10 cm^{-3} . The resulting biovolume and S/V ratio of the diatoms and Cryptophytes communities were obtained by weighing each other to the abundance proportion of each species, and each size category, respectively. Finally, the biovolume and S/V ratio of each phytoplankton group used in this study correspond to their average over the entire period. Information on a significant reserve-storage capacity came from Raven (1997) for diatoms and from Lancelot *et al.* (1986) and Veldhuis and Admiraal (1987) for *Phaeocystis*.

Table II. Mean relative abundance and trait values calculated in this study

Phytoplankton group	Relative abundance	V	S/V ratio	Storage	Motility	C/N ratio	C/P ratio	$\mu_{\max}(12^{\circ}\text{C})$	$\mu_{\max}\text{Light}$	$\alpha\mu$	Ek	N_{affinity}
	%	μm^3	μm^{-1}	n.u	n.u	mol:mol	mol:mol	Day^{-1}	Day^{-1}	$\mu\text{E}^{-1} \text{m}^2 \text{s day}^{-1}$	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\text{Log L } \mu\text{mol}^{-1} \text{day}^{-1}$
Coccolithophore	3	22	2.52	0	1	8.3	113	1.11	1.33	0.046	35	2.05
Cryptophytes	2	68	1.79	0	1	5.7	155	0.41	1.13	0.06	32	1.75
Diatoms	5	10613	1.04	1	0	7.1	73	1.78	2.06	0.04	79	0.36
<i>Phaeocystis</i> diploid	10	997922	0.09	1	0	7.1	80	1.2	2.26	0.037	53	-0.88
<i>Phaeocystis</i> haploid	30	63	1.8	0	1	7.6	157	1.2	2.55	0.028	109	1.77
Picoeukaryote	27	3	4.1	0	0.5*	5.7	30	0.55	1.04	0.053	23	2.62
<i>Synechococcus</i> spp.	23	0.36	6.74	0	0	5.7	125	0.35	1.6	0.07	33	3.18

* Picoeukaryotes include both non-motile and motile species

2.4. Environmental variables

Range values of environmental variables are represented in Table III. Sea surface Temperature (SST, °C), and salinity (SSS) were measured at a depth of 2 m with a CTD Seabird probe (SBE 19) equipped with a PAR sensor (QSP 2300, Biospherical Instrument). The diffuse attenuation coefficient for downwelling irradiance (k , m^{-1}) was assessed from instantaneous vertical CTD profiles. The average subsurface daily light level (PAR, $E\ m^{-2}\ d^{-1}$) experienced by phytoplankton over the last 6 days before the cruises was estimated using the formula of Riley (1957):

$$PAR = \frac{I_0(1 - e^{-kz})}{kz}$$

with z the depth where phytoplankton was collected ($z=2\ m$), and I_0 , the daily incident light estimated from global solar radiation (GSR, $W\ m^{-2}$) measured continuously with a time step of 5 min with a solar radiation sensor (Vantage Pro, Davis) mounted on the roof of our laboratory bordering the seashore. GSR was converted to PAR by assuming PAR being 50% of GSR and by considering $1\ W\ m^{-2} = 0.36\ E\ m^{-2}\ d^{-1}$ (Morel and Smith, 1974). Wind speed ($m\ s^{-1}$) was obtained from the French Institute “Météo France”, based on hourly records at the coastal meteorological station of Boulogne-sur-mer, and was also normalized over the last 6 days before the cruises.

The water-column stability (Stab) was calculated using the formula of Li (2002):

$$Stab = (\sigma_2 - \sigma_1)/(z_2 - z_1)$$

with σ_1 and σ_2 the respective seawater density at depth (m) z_1 and z_2 . In addition, seawater for nutrient analysis (silicate [DSi], phosphate [DIP], and nitrate + nitrite+ammonium [DIN], $\mu mol\ dm^{-3}$) was collected, and assessed according to the methodologies outlined in Aminot and Kérouel (2004), using the *Integral Futura* autoanalyser system (*Alliance Instruments*).

Table III. Range of salinity, temperature and resource (nutrients and light) values characterizing during this study

Variable	Abbreviation	Unity	Range
Subsurface incident light	PAR	E m ⁻² day ⁻¹	4.5-55
Sea surface temperature	SST	°C	5-18
Sea surface salinity	SSS	n.u.	33.3-34.7
Dissolved inorganic nitrogen	DIN	μM	0.05-31.84
Dissolved inorganic phosphorus	DIP	μM	0.01-1.29
Dissolved silicates	DSi	μM	0.1-12.9

2.5. Resource use efficiency

Resource use efficiency (RUE= biomass per unit resource) was calculated for the limiting nutrients DIP and DIN as well as for both Particulate Organic Carbon (RUE_{POC-P}, RUE_{POC-N}) and chlorophyll *a* (RUE_{chl-a-P}, RUE_{chl-a-N}). Seawater for POC was collected at 32 occasions. POC was assessed on a NA2100 Frisons CHN analyzer after drying filters at 60°C for 24 h and exposure to vapours of HCL 1 N for 5 h. Chla was estimated by fluorimetry using the method and equations of Lorenzen (1967), after pigment extraction in acetone 90% for 12h at 4°C.

2.6. Data analysis

2.6.1. Depicting ecological strategies of phytoplankton through a succession of environmental conditions

To relate trait data to the environmental variability during the pluri-annual study, the three-table ordination RLQ method was used (Dolédéc *et al.*, 1996). Biovolume and maximal growth rates under saturating light were excluded from the RLQ analysis, because the first one was strongly correlated to the surface to volume ratio (S/V) and had been used to calculate the nitrogen scaled affinity (Naff, see supplementary material), and the second one because it was similar to maximal growth rate at 12.5°C. RLQ analysis consisted in relating a

R matrix (the environmental variables as columns and sampling dates as rows) to a Q matrix (phytoplankton groups as rows and traits as columns) by linking each other through a third matrix L (abundance of phytoplankton groups as columns and sampling dates as rows). Before, a factor analysis was performed on each matrix. First, a correspondence analysis (CA) was performed on the L matrix, which computes the highest possible correlation between sampling dates and species/genus/groups scores. For the two other matrices, the choice of the factor analysis depends on the kind of data available. In our case, a Principal Component Analysis (PCA) was performed on R matrix (numerical data), while a Hill-Smith PCA analysis (Hill-Smith, 1976) was performed on Q matrix, allowing the treatment of a table including numerical and nominal data (in our study presence/absence of flagella and significant reserve-storage capacity). Moreover, column and row scores of the CA of table L were used for ordination of tables R and Q, respectively, to be used as canonical factors in the next. Then, the RLQ analysis combined the three separate ordinations to maximize the covariance between the traits and environmental data via the use of co-inertia analysis. Prior to the RLQ analysis, trait data were standardized, and environmental data were log-transformed except for nutrients and stability index, which were quarter-root transformed. The significance of the R and Q relationship was tested with a 1000 permutation Monte Carlo randomization test.

2.6.2. Functional diversity indices of phytoplankton communities

As the number of species/genus/groups detected by flow cytometry was constant all through the study, only functional diversity indexes considering species/genus/group abundances were calculated, i.e. the community-level weighted means of trait values (CWM, Garnier *et al.*, 2004), functional evenness (FEve), functional dispersion (FDis; Laliberté and Legendre, 2010), functional specialization (FSpe, Bellwood *et al.*, 2006), and functional originality (FOri, Mouillot *et al.*, 2013).

The CMW corresponds to the mean trait value amongst each community (i.e at each sampling date) weighted by the relative abundance of each phytoplankton group (Garnier *et al.*, 2004). The FEve corresponds to the regularity with which phytoplankton group abundances in a community are distributed amongst co-occurring phytoplankton groups depending on their trait values (Villegger *et al.*, 2008). The FDis corresponds to the abundance-weighted average

distance to the centroid between the phytoplankton groups (Laliberté and Legendre, 2010). The FSpe shows how specialists (i.e., far to the center of the functional space linking all phytoplankton groups) tend to increase in abundance (Villegier *et al.*, 2010, Mouillot *et al.*, 2013). Finally, the FOr quantifies how changes in phytoplankton abundance modify the functional redundancy between species/groups (Mouillot *et al.*, 2008, 2013). All data analyses were performed using the R-CRAN software (R Development Core Team, 2015), with packages ADE-4, Ape, Geometry, and Rcd and the function “FSEC change” given by Mouillot *et al.*, (2013).

3. Results

3.1. Response traits to environmental variations

The RLQ analysis showed a strong association ($p < 0.0001$) between the environmental variables and phytoplankton traits mediated by the abundances of phytoplankton groups (Fig. 1). The first RLQ axis accounted for almost 99% of total variance of the phytoplankton assemblages. Moreover, the correlation between the traits and the environment models from the RLQ ordination and the initial correspondence analysis of the phytoplankton group table was high ($r = 0.52$). Therefore, only this first RLQ axis (RLQ1) was considered for the next. The RLQ1 opposed nutrients (DIN, DIP and DSi) located on the left side, to irradiance (PAR) and salinity (S) located on the right side. Note that the resource variability was strong (tab. S2). Accordingly, nutrients and light intensity varied by a two and one order of magnitude, respectively. Along this temporal resource gradient, 6 traits over the 9 ones pre-selected for the analysis were significantly correlated at 1% p level (Fig. 2B): the traits characterizing competitive capability for low resources (S/V ratio, $\alpha\mu$, and N_{aff}) displaying high values on the left side, and maximum growth rates (μ_{max}), photoadaptability (E_k), and C/N cell content, displaying high values on the right side of the RLQ1. This axis of functional differentiation separated phytoplankton groups characterized by a high competitive capability under low resource conditions but showing low growth rates when resources are sufficient (*Synechococcus* spp., picoeukaryotes, and Cryptophytes), from those characterized by high growth rates when resources are high, but low competitive capability when resources are low (diatoms and *Phaeocystis*). Coccolithophores took an intermediary position along this axis of functional differentiation.

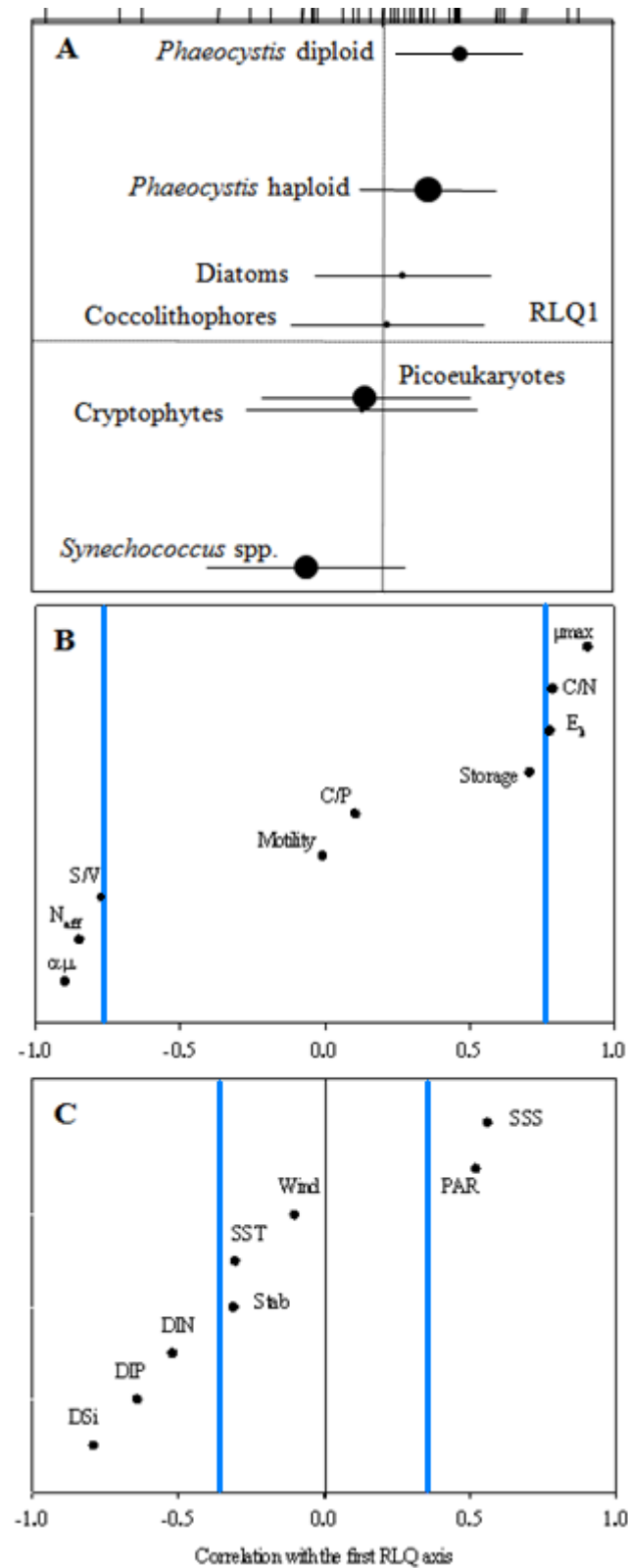


Figure 1. Ordination diagram (A) of the sampling dates (above) and phytoplankton groups along the first axis of the RLQ analysis, displaying the resource gradient. Pearson correlations between (B) the environmental variables and the coordinates of the sampling dates, and (C) the life-traits and the coordinates of the phytoplankton groups, on the first axis. The vertical lines in B and C indicate the threshold of critical p values ($p=1\%$)

3.2. Changes in functional identity and diversity along the axis of functional differentiation

Ecological strategies reflected by the primary axis of functional differentiation are represented by the scores of phytoplankton groups on the RLQ axis. We used these scores to relate the various ecological strategies to various functional diversity indices and functional identity (or CMW), in an attempt to reveal different mechanisms of phytoplankton community assembly.

Single-trait community-weighted means (CWM) of the 6 relevant traits previously highlighted from the RLQ analysis showed significant variations with the RLQ1 (Fig. 2). Accordingly, CMW for traits characterizing competitive capability (S/V ratio, $\alpha\mu$, and N_{aff}) for limiting conditions showed significant decreases along the axis of functional differentiation, whereas CWM for μ_{max} , E_k , and C/N cell content showed the inverse.

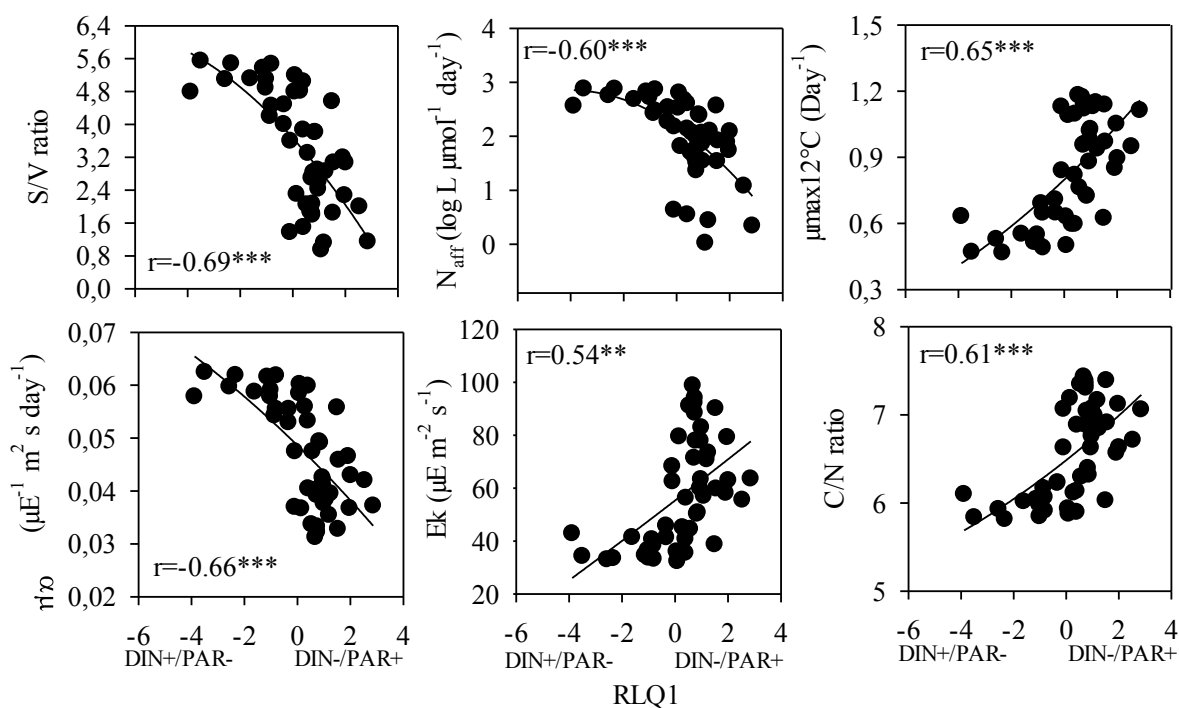


Figure 2. Abundance-weighted means (CWM) in phytoplankton communities along the resource gradient (RLQ1) for the six functional traits revealed by RLQ analysis (S/V ratio, C/N ratio cell content, maximal growth rate [$\mu_{max12^{\circ}C}$, day⁻¹], the initial slope of the growth-light curve [$\alpha\mu$, $\mu E^{-1} m^2 s day^{-1}$], the onset of light saturation under non-limiting nutrients conditions [E_k , $\mu mol E m^{-2} s^{-1}$], and affinity for nitrates [N_{aff} , log $\mu mol l^{-1} day^{-1}$]. Black lines represent significant regression (*p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0001). N: nutrient concentrations, PAR: light intensity for phytoplankton growth, +: high, -: low

Functional evenness (FEve) did not change (Fig. 3). By contrast, Functional dispersion (FDis) and functional originality (FOri) showed significant increases along the axis of functional differentiation, while functional specialization (FSpe) decreased.

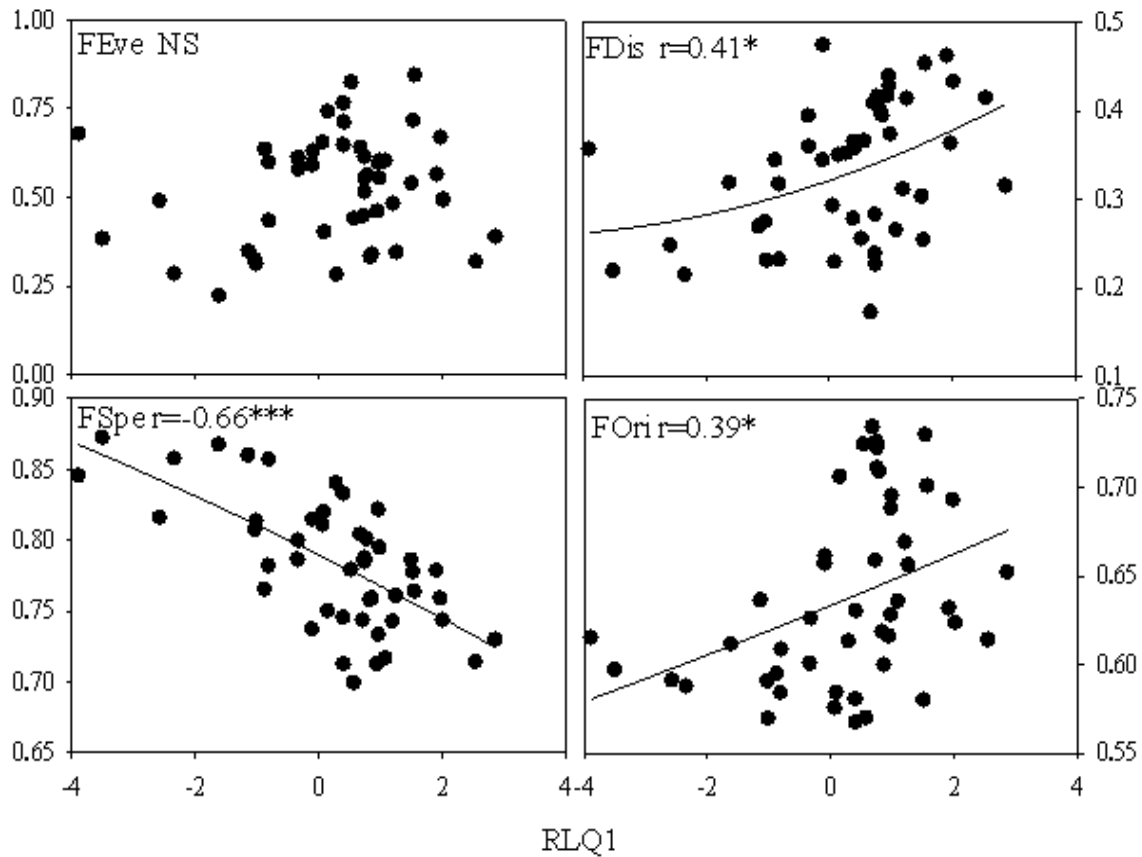


Figure 3. Response of different indices of phytoplankton community functional structure to the resource gradient (RLQ1 axis). For calculation, the six phytoplankton traits the most relevant in RLQ analysis (μ , S/V, Naff, μ max, C/N, and Ek) were taken into account. NS not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$. N: nutrient concentrations, PAR: light available for phytoplankton growth, +: high, -: low

3.3. Resource use efficiency related to effects traits, functional identity and diversity indices

As for relating traits to environment, the RLQ analysis to relate resource use efficiency (RUE) to traits mediated by the abundances of the different phytoplankton groups showed a significant association ($p < 0.0001$, $r = 0.40$, $RV = 0.14$) between them (Table. II). However, the correlation between the traits and RUE models from the RLQ ordination and the initial correspondence analysis of the phytoplankton group table was a little lower than the RLQ analysis relating traits to environment ($r = 0.41$). As for the first RLQ analysis (RLQ1), the first axis accounted for most of the total variance (99.6%) of the phytoplankton assemblages,

hence only this first RLQ axis (RLQ1) was considered for the next. The four components of RUE (RUE_{Chla-P} , RUE_{Chla-N} , RUE_{POC-P} , and RUE_{POC-N}) all displayed significant positive correlations with RLQ1. Of the nine phytoplankton traits pre-selected, four were significantly correlated at the 1% p level (Table. IV): the traits S/V ratio and $\alpha\mu$ displaying negative correlations with RLQ1, while μ_{max} , and C/N cell content displaying positive correlations with RLQ1.

Table IV. Pearson correlation between Resource Use Efficiency (RUE_{Chla-P} , RUE_{Chla-N} , RUE_{COP-P} , and RUE_{COP-N}) and effects traits and the first RLQ axis, which accounted for 99.6% of the total variance ($r=0.41$, $p<0.0001$). Only effect traits (i.e. traits showing significant correlations ($p<0.01$) with the first RLQ axis) are represented. * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.0001$**

	RLQ axis 1
<i>Ressource use efficiency</i>	
RUE_{Chla-P}	-0.71***
RUE_{Chla-N}	-0.90***
RUE_{COP-P}	-0.78***
RUE_{COP-N}	-0.94***
<i>Life-traits variables</i>	
S/V ratio	0.88*
$\alpha\mu$	0.92**
C/N ratio	-0.80*
μ_{maxT} (12.5°C)	-0.89*

Hence, the position of RUE along the RLQ1 followed those of μ_{max} , and C/N cell content, but opposed to S/V ratio and $\alpha\mu$. Co-inertia analysis (Table. V) revealed a significant coupling between RUE and functional identity ($p<0.001$, $r=0.56$, $RV=0.32$), and functional diversity indices ($p<0.0001$, $r=0.58$, $RV=0.21$). For the two co-inertia analyses, the first axis was clearly dominant, i.e. (99.9% and 96% of the total variance for functional identity and diversity, respectively), which excluded taking into account the second co-inertia axis.

Table V. Results of the co-inertia analyses between resource use efficiency (RUEChla-P, RUEChla-N, RUECOP-P, and RUECOP-N) and (1) functional identity ($r = 0.59$, $p < 0.01$) and (2) functional diversity indices ($r = 0.59$, $p < 0.01$). Only significant correlations ($p < 0.01$) with the first co-inertia axis, which represented 99.9 and 96% of the total variance for functional identity and functional diversity, respectively, are represented. For calculation, the six most relevant phytoplankton traits ($\alpha\mu$, S/V, Naff, $\mu_{\max}$, C/N, and Ek) were taken into account. * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.0001$**

	COI axis 1
<i>Co-structure RUE-functional identity</i>	
S/V ratio	-0.53**
$\alpha\mu$	-0.56**
C/N ratio	0.58**
$\mu_{\max}T$ (12.5°C)	0.62***
Ek	0.60**
RUE _{Chla-P}	0.77***
RUE _{Chla-N}	0.91***
RUE _{COP-P}	0.84***
RUE _{COP-N}	0.86***
<i>Co-structure RUE-functional diversity</i>	
FEve	0.77***
FDis	0.54**
FOri	0.77***
RUE _{Chla-P}	0.84***
RUE _{Chla-N}	0.86***
RUE _{COP-P}	0.89***
RUE _{COP-N}	0.80***

The results of these analyses indicated first that the various components of RUE were more related to functional identity than to functional diversity of phytoplankton communities (high RV). Moreover, the results showed that, CWM of S/V ratio, $\alpha\mu$, C/N cell content, $\mu_{\max}$, and Ek; and FEve, FOr, and FDis, were all significant to predicting RUE. More specifically, the various components of RUE increased as all the various functional identity and functional diversity indices increased except for S/V ratio, $\alpha\mu$, which showed the inverse trend.

4. Discussion

4.1. Multiple ecological trade-offs allowing co-existence

Our data analysis showed that the temporal succession of flow-cytometric phytoplankton assemblages in coastal waters of the eastern English Channel was mainly driven by a temporal resource gradient, through a primary combination of co-varying functional traits, including traits related to resource-use strategies (high $\alpha\mu$, S/V, Naff, C/N ratio, and E_k) and one related to growth strategy ($\mu_{\max}$) (Fig.1). This primary axis of functional differentiation reflected several ecological trade-offs allowing the coexistence of the various phytoplankton groups. All these theoretical trade-offs have been described in the literature (see Litchman and Klausmeier 2008; Litchman *et al.*, 2015), but their verification has received less attention in natural ecosystems (but see Pomatti *et al.*, 2013). Here, our results highlighted three fundamental trade-offs acting simultaneously in structuring phytoplankton communities in coastal waters of the eastern English Channel. Hence, first of all, a “gleaner-opportunist” trade-off (Grover, 1997; Litchman and Klausmeier, 2001) showed how competitive ability for resources (high $\alpha\mu$, S/V, and Naff values), which expressed under low light conditions typically occurring each winter in North temperate systems (Houliez *et al.*, 2013; Bonato *et al.*, 2015), was progressively replaced in the season by a high growth rate strategy (high $\mu_{\max}$ values). Secondly, a “competitive ability-grazing resistance” trade-off (Grover, 1995) was suggested by the rather overall ordination according to size of the various phytoplankton groups along the axis of functional differentiation, with towards the upper end the colony-formation by *Phaeocystis* (i.e. *Phaeocystis* diploid cells). This induction of colony-formation by *Phaeocystis* under high grazing pressure has been demonstrated under laboratory conditions (Jakobsen and Tang, 2002). Third, the opposite direction of $\alpha\mu$ compared to C/N ratio and E_k , showed how the adaptation to low light conditions requires the increase in the allocation of nitrogen to proteins for the light-harvesting complex at the expense of carbon assimilation (Leonardos and Geider, 2004; Edwards *et al.*, 2015), but also a vulnerability to photoinhibition later in the season.

4.2. Different ecological processes driving functional structure of phytoplankton communities

Variations in functional diversity indices highlighted different ecological processes structuring phytoplankton community across the temporal resource gradient. First, the increasing trend, over time, of the functional dispersion and functional originality of phytoplankton community (Fig. 3) means that environmental stress concerning resource acquisition and growth overall decreased over time (Hedberg *et al.*, 2013), and suggests, therefore, that light limitation rather than inorganic nutrient depletion acted as an environmental filter on functional traits in this coastal area. This is in accordance with the progressive shift in dominance of stress-tolerant phytoplankton groups (e.g. *Synechococcus* spp.) towards the dominance of opportunists (diatoms and *Phaeocystis* sp.), later in the season. Given opportunists can grow once resources become sufficient (Grover 1997; Litchman and Klausmeier, 2001), this means that new nutrient resources, such as dissolved organic ones (van Boekel *et al.*, 1991), counteracted the inorganic nutrient depletion. In the EEC, the bulk of annual primary production corresponds mainly to the spring period of both successive diatoms and *Phaeocystis* blooms and depletion of inorganic nutrients (Lizon *et al.*, 1995; Gentilhomme and Lizon, 1998). Hence, these results could highlight mixotrophy as an important ecological strategy as inorganic nutrients became depleted.

The decrease in functional specialization of phytoplankton community over time indicated that the proportion of generalists increased progressively towards the upper end of the resource gradient; and thus; in parallel to a progressive setting up of niche differentiation, reflected by the increasing trend of functional diversity (FDis) over time. What mechanisms may have favored both functional diversification and generalists (opportunists) in this coastal area? We argue that disturbance through the generation of environmental heterogeneity as the result of multiple biotic processes, themselves sustained by the progressive increase of light intensity, was the main driver of the increase in functional diversity and generalists abundance over time (from winter to summer) in our coastal area. Hence, disturbance, and thus environmental heterogeneity, favors both generalists over specialists (Kassen, 2002) and niche differentiation (e.g. Brown *et al.*, 2013), and is a key driver of community structure and functioning (Hooper *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2007). Although niche differentiation amongst communities is caused by multiple biotic processes, such as resource competition (via limiting similarity, Mackane *et al.*, 2002), facilitation by a species to another ones via, for example,

the exudation of organic molecules (e.g. Verdu *et al.*, 2009), and/or selective grazing-mediated facilitation (e.g. van Gremberghe *et al.*, 2009), all promote environmental heterogeneity/disturbance. However, it has been shown that the balance of specialists/generalists and the degree of diversification depend on the intensity of the environmental heterogeneity (Levin, 1968; Kassen, 2002). If an organism encounters during its lifetime different environmental conditions, then, generalists should dominate. Conversely, if the organism encounters during its lifetime only one environmental condition, then specialist may dominate. Between these two extremes, at intermediary environmental heterogeneity, specialists and generalists may co-exist, and diversification is highest.

4.3. Overlap between response and effect traits and implication for resource use efficiency

Exploring the linkages between functional response and effect traits is very important, because in the case of a strong overlapping, this allows to directly link environmental variations to ecosystem processes (Chapin *et al.*, 2000; Lavorel and Garnier, 2002; Lavorel *et al.*, 2007), which are particularly interesting to make predictions in the context of global change. Moreover, in a context of widespread biodiversity loss (Cardinale, 2012), it is crucial to know which of the functional diversity (i.e. implying functional traits of all species), or functional identity (i.e. implying only functional traits of the dominant species in community), are the most important in driving ecosystem processes (Díaz *et al.*, 2007). Although this framework has been largely explored in terrestrial ecology (e.g. Mokany *et al.*, 2008; Gagic *et al.*, 2015), it has been poorly investigated in marine ecology, and has yet to be investigated in phytoplankton community. Here, we showed a strong overlap between response and effect traits. However, the fact that nutrients and light co-varied along the resource gradient, makes it very hard to predict for example how nutrient enrichment or warming through the increase in light intensity may alter ecosystem processes such as RUE. Effect-traits, functional identity and functional diversity were all significantly related to resource use efficiency (RUE) in the E. Channel coastal area. However, the RV coefficient for functional identity was the highest in explaining variations in RUE than did the functional diversity. Our results confirm the need to consider separately functional identity and functional diversity in order to advance in our understanding of mechanisms underlying biodiversity–ecosystem functioning relationships (Roscher *et al.*, 2012).

5. Conclusion

We explored in this study the relevance of a trait-based approach to get insights both in the nature of functional traits and in the underlying mechanisms structuring phytoplankton assemblages over time, and how in turn functional composition and structure may influence resource use efficiency (RUE). We showed first a primary axis of functional specialization combining resource-use traits and growth, reflecting several fundamental ecological trade-offs, such as the “gleaner-opportunist” one, all driven by a temporal resource gradient. Both environmental filtering associated to light limitation and niche differentiation, the later being probably associated to biotic-mediated environmental heterogeneity influenced the functional dispersion, the functional originality and functional specialization over time. In turn, functional identity, and in a lesser extent functional diversity, influenced resource use efficiency. Therefore, both the dominance of a species and niche differentiation were important for RUE. Because, to our best knowledge, this type of study is the first in marine phytoplankton ecology, it should be considered as a starting point for future research in this exciting topic.

Acknowledgements

We thank the captain and the crew of the RV “*Sepia II*” (INSU-CNRS) and Vincent Cornille for their help during the cruises and data collection. This study was supported by the DYMAPHY (INTERREG IVA “2 Mers Seas Zeeën”) project (www.dymaphy.eu) co-funded by the European Regional Development Funds (ERDF). S. Bonato was supported by a Ph.D. grant co-funded by the DYMAPHY project and the Syndicat Mixte de la Côte d’Opale (SMCO), as well as by a CNRS-ULCO-IFREMER research contract on the exploration of phytoplankton indices.

Trait Source References

- 1/Arrigo, K.R., Robinson, D.H., Worthen, D.L., Dunbar, R.B., DiTullio, G.R., VanWoert, M., Lizotte, M.P., Phytoplankton Community Structure and the Drawdown of Nutrients and CO₂ in the Southern Ocean. *Science* 283, 365–367 (1999).
- 2/Augustin, C. B., & Boersma, M., Effects of nitrogen stressed algae on different *Acartia* species. *J. Plankton Res.* 28(4), 429-436 (2006).
- 3/Aydın, G.S., Kocata, A., Büyük&i, B., others., Effects of light and temperature on the growth rate of potentially harmful marine diatom: *Thalassiosira allenii* Takano (Bacillariophyceae). *Afr. J. Biotechnol.* 8 (2009).
- 4/Bartual, A., Lubián, L.M., Gálvez, F.X., others, Effect of irradiance on growth, photosynthesis, pigment content and nutrient consumption in dense cultures of *Rhodomonas salina* (Wislouch)(Cryptophyceae). *Cienc. Mar.* 28, 381–392 (2002).
- 5/Bertilsson, S., Berglund, O., Karl, D. M., Chisholm, S. W., Elemental composition of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: Implications for the ecological stoichiometry of the sea. *Limnol. Oceanogr.* 48(5), 1721-1731 (2003).
- 6/Bi, R., Chemical composition of phytoplankton as the determinant of food quality. Kiel University (2013).
- 7/Broglio, E., Jonasdottir, S., Calbet, A., Jakobsen, H.H., Saiz, E., Effect of heterotrophic versus autotrophic food on feeding and reproduction of the calanoid copepod *Acartia tonsa*: relationship with prey fatty acid composition. *Aquat. Microb. Ecol.* 31, 267–278 (2003).
- 8/Burkhardt, S., Riebesell, U., Zondervan, I., Stable carbon isotope fractionation by marine phytoplankton in response to daylength, growth rate, and CO₂ availability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 184, 31–41 (1999).
- 9/Cochlan, W.P., Nitrogen uptake by marine phytoplankton: the effects of irradiance, nitrogen supply and diel periodicity. Ph.D. Thesis Department of Oceanography, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada, p. 238 (1989).
- 10/Cullen, J.J., Lewis, M.R., The kinetic of algal photoadaptation in the context of vertical mixing. *J. Plankton Res.* 10, 1039-1063 (1988).
- 11/Durbin, E.G., Studies on the Autecology of the Marine Diatom *Thalassiosira Nordenskiöldii* Cleve. 1. the Influence of Daylength, Light Intensity, and Temperature on Growth1. *J. Phycol.* 10, 220–225 (1974).
- 12/Edwards, K.F., Thomas, M.K., Klausmeier, C.A., Litchman, E., Allometric scaling and taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 57, 554–566 (2012).
- 13/Falkowski, P.G., Dubinsky, Z., & Wyman, K., Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 30, 311-321 (1985).
- 14/Falkowski, P.G., Owens, T.G., Light—shade adaptation two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol.* 66, 592–595 (1980).
- 15/Fielding, S.R., *Emiliana huxleyi* population growth rate response to light and temperature: a synthesis. *Aquat. Microb. Ecol.* 73, 163–170 (2014).

- 16/Fu, F. X., Warner, M. E., Zhang, Y., Feng, Y., & Hutchins, D. A., EFFECTS OF INCREASED TEMPERATURE AND CO₂ ON PHOTOSYNTHESIS, GROWTH, AND ELEMENTAL RATIOS IN MARINE SYNECHOCOCCUS AND PROCHLOROCOCCUS (CYANOBACTERIA) 1. J. Phycol. 43(3), 485-496 (2007).
- 17/Giovagnetti, V., Cataldo, M.L., Conversano, F., Brunet, C., 2010. Functional relation between growth, photosynthetic rate and regulation in the coastal picoeukaryote *Phaeomonas* sp. RCC 503 (Pinguiphyceae, Stramenopiles). J. Plankton Res. 32, 1501–1511 (2010).
- 18/Goldman, J. C., Hansell, D. A., Dennett, M. R., CHEMICAL CHARACTERIZATION OF 3 LARGE OCEANIC DIATOMS-POTENTIAL IMPACT ON WATER COLUMN CHEMISTRY. Mar. Ecol. Prog. Ser. 88(2-3), 257-270 (1992).
- 19/Guillard, R. R., & Ryther, J. H., Studies of marine planktonic diatoms :I. *Cyclotella nana* hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) gran. Canadian journal of microbiology, 8(2), 229-239 (1962).
- 20/Ho, T.-Y., Quigg, A., Finkel, Z.V., Milligan, A.J., Wyman, K., Falkowski, P.G., Morel, F.M.M., The Elemental Composition of Some Marine Phytoplankton1. J. Phycol. 39, 1145–1159 (2003).
- 21/Heinle, M., The effects of light, temperature and nutrients on Coccolithophores and implications for biogeochemical models. University of East Anglia (2013).
- 22/Heldal, M., Scanlan, D. J., Norland, S., Thingstad, F., Mann, N. H., Elemental composition of single cells of various strains of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus* using X-ray microanalysis. Limnol. Oceanogr. 48(5), 1732-1743 (2003).
- 23/Hoogstraten, A., Peters, M., Timmermans, K.R., de Baar, H.J.W., Combined effects of inorganic carbon and light on *Phaeocystis globosa* Scherffel (Prymnesiophyceae). Biogeosciences 9, 1885–1896 (2012).
- 24/Jahnke, J., The light and temperature dependence of growth rate and elemental composition of *Phaeocystis globosa* Scherffel and *P. pouchetii* (Har.) Lagerh. in batch cultures. Neth. J. Sea Res. 23, 15–21 (1989).
- 25/Kaeriyama, H., Katsuki, E., Otsubo, M., Yamada, M., Ichimi, K., Tada, K., Harrison, P.J., Effects of temperature and irradiance on growth of strains belonging to seven *Skeletonema* species isolated from Dokai Bay, southern Japan. Eur. J. Phycol. 46, 113–124 (2011).
- 26/Kana, T.M., Glibert, P.M., Effect of irradiances up to 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on marine *Synechococcus* WH7803—I. Growth, pigmentation, and cell composition. Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap. 34, 479–495 (1987).
- 27/Koski, M., Breteler, W. K., Schogt, N., Gonzalez, S., & Jakobsen, H. H., Life-stage-specific differences in exploitation of food mixtures: diet mixing enhances copepod egg production but not juvenile development. J. Plankton Res. 28(10), 919-936 (2006).
- 28/Kulk, G., de Poll, W.H. van, Visser, R.J.W., Buma, A.G.J., Distinct differences in photoacclimation potential between prokaryotic and eukaryotic oceanic phytoplankton. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 398, 63–72 (2011).

- 29/Lancelot, C., Mathot, S., Owens, N.J.P., Modelling protein synthesis, a step to an accurate estimate of net primary production: The case of *Phaeocystis pouchetii* colonies in Belgian coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 32, 193–202 (1986).
- 30/Lancelot-Van Beveren, C., A statistical method to estimate the biochemical composition of phytoplankton in the Southern Bight of the North Sea. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 10, 467–478 (1980).
- 31/Langdon, C., On the causes of interspecific differences in the growth-irradiance relationship for phytoplankton. Part I. A comparative study of the growth-irradiance relationship of three marine phytoplankton species: *Skeletonema costatum*, *Olisthodiscus luteus* and *Gonyaulax tamarensis*. *J. Plankton Res.* 9, 459–482 (1987).
- 32/La Roche, J., Geider, R. J., Graziano, L. M., Murray, H., Lewis, K., Induction of specific protein in eukaryotic algae grown under iron-, phosphorus-, or nitrogen-deficient conditions. *J. Phycol.* 29: 767–77 (1993).
- 33/Laws, E.A., Bannister, T.T., Nutrient-and light-limited growth of *Thalassiosira fluviatilis* in continuous culture, with implications for phytoplankton growth in the ocean¹. *Limnol. Oceanogr.* 25, 457–473 (1980).
- 34/Lewitus, A.J., Caron, D.A., Relative effects of nitrogen or phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition, and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Mar Ecol Prog Ser.* 61, 171–181 (1990).
- 35/Llewellyn, C. A., & Gibb, S. W., Intra-class variability in the carbon, pigment and biomineral content of prymnesiophytes and diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 193, 33–44 (2000).
- 36/Marañón, E., Cermeño, P., López-Sandoval, D.C., Rodríguez-Ramos, T., Sobrino, C., Huete-Ortega, M., Blanco, J.M., Rodríguez, J., Unimodal size scaling of phytoplankton growth and the size dependence of nutrient uptake and use. *Ecol. Lett.* 16, 371–379 (2013).
- 37/Martiny, A.C., Pham, C.T.A., Primeau, F.W., Vrugt, J.A., Moore, J.K., Levin, S.A., Lomas, M.W., Strong latitudinal patterns in the elemental ratios of marine plankton and organic matter. *Nat. Geosci.* 6, 279–283 (2013).
- 38/Moal, J., Martin-Jezequel, V., Harris, R. P., Samain, J. F., & Poulet, S. A., Interspecific and intraspecific variability of the chemical-composition of marine-phytoplankton. *Oceanologica acta*, 10(3), 339-346 (1987).
- 39/Morris, I., Glover, H., Physiology of photosynthesis by marine coccoid cyanobacteria—Some ecological implications. *Limnol. Oceanogr.* 26, 957–961 (1981).
- 40/Nejstgaard, J. C., Båmstedt, U., Bagøien, E., & Solberg, P. T. (1995). Algal constraints on copepod grazing. Growth state, toxicity, cell size, and season as regulating factors. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 52 (3-4), 347-357.
- 41/Nelson, D.M., D’elia, C.F., Guillard, R.R.L., Growth and competition of the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. II. Light limitation. *Mar. Biol.* 50, 313–318 (1979).
- 42/Nishikawa, T., & Yamaguchi. M., Effect of temperature on light-limited growth of the harmful diatom *Coscinodiscus wailesii*, a causative organism in the bleaching of aquacultured *Porphyra thalli*. *Harmful Algae* 7, 561-566 (2008).

- 43/Nishikawa, T., & Yamaguchi, M., Effect of temperature on light-limited growth of the harmful diatom *Eucampia zodiacus* Ehrenberg, a causative organisms in the discoloration of *Porphyra thalli*. *Harmful Algae*, 5, 141-147 (2006).
- 44/Paasche, E., Marine Plankton Algae Grown with Light-Dark Cycles. *Physiol. Plant.* 21, 66–77 (1968).
- 45/Peperzak, L., Daily irradiance governs growth rate and colony formation of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *J. Plankton Res.* 15, 809–821 (1993).
- 46/Popovich, C. A., & Gayoso, A. M., Effect of irradiance and temperature on the growth rate of *Thalassiosira curviseriata* Takano(Bacillariophyceae), a bloom diatom in Bahia Blanca estuary(Argentina). *J. Plankton Res*, 21(6), 1101-1110 (1999).
- 47/Post, A. F., Dubinsky, Z., Wyman, K., & Falkowski, P. G., Physiological responses of a marine planktonic diatom to transitions in growth irradiance. *Mar Ecol Prog Ser*, 25(2), 141-149 (1985).
- 48/Quigg, A., Finkel, Z.V., Irwin, A.J., Rosenthal, Y., Ho, T.-Y., Reinfelder, J.R., Schofield, O., Morel, F.M.M., Falkowski, P.G., The evolutionary inheritance of elemental stoichiometry in marine phytoplankton. *Nature* 425, 291–294 (2003).
- 49/Rey, C., Harris, R.P., Irigoien, X., Head, R., Carlotti, F., Influence of algal diet on growth and ingestion of *Calanus helgolandicus* nauplii. *Mar Ecol Prog Ser* 216:151–165 (2001).
- 50/Richardson, Ralph William, Florida Bay microalgae blooms: Physiological characteristics and competitive strategies of bloom forming cyanobacteria and diatoms of Florida Bay. Graduate Theses and Dissertations (2004).
- 51/Ríos, A. F., Fraga, F., Figueiras, F. G., Pérez, F. F., A modelling approach to the Redfield ratio deviations in the ocean. *Scientia Marina*, 62(1-2), 169-176 (1998).
- 52/Rodr guez, J., Blanco, J.M., Jiménez-G me z, F., Echevarr a, F., Gil, J., Rodr guez, V., Ruiz, J., Bautista, B., Guerrero, F., Patterns in the size structure of the phytoplankton community in the deep fluorescence maximum of the Alboran Sea (southwestern Mediterranean). *Deep-Sea Res. Part I* 45, 1577–1593 (1998).
- 53/Sakshaug, E., S. Demers, and C. M. Yentsch., *Thalassiosira oceanica* and *T. pseudonana*: Two different photoadaptational responses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 41, 275-282 (1987).
- 54/Sakshaug, E., Andresen, K., Mykkestad, S., & Olsen, Y., Nutrient status of phytoplankton communities in Norwegian waters (marine, brackish, and fresh) as revealed by their chemical composition. *J. Plankton Res.* 5(2), 175-196 (1983).
- 55/Seixas, P., Coutinho, P., Ferreira, M., Otero, A., 2009. Nutritional value of the cryptophyte *Rhodomonas lens* for *Artemia* sp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 381, 1–9 (2009).
- 56/Seixas, P., Rey-Méndez, M., Valente, L.M.P., Otero, A., Producing juvenile *Artemia* as prey for *Octopus vulgaris* paralarvae with different microalgal species of controlled biochemical composition. *Aquaculture* 283, 83–91 (2008).
- 57/Sharpe, S.C., Koester, J.A., Loebl, M., Cockshutt, A.M., Campbell, D.A., Irwin, A.J., Finkel, Z.V., Influence of Cell Size and DNA Content on Growth Rate and Photosystem II Function in Cryptic Species of *Ditylum brightwellii*. *PLoS ONE* 7, e52916 (2012).

- 58/Stawiarski, B., Picophytoplankton physiology and the microbial loop, in: EGU General Assembly Conference Abstracts. p. 10624 (2013).
- 59/Strom, S.L., Buskey, E.J., Feeding, growth, and behavior of the thecate heterotrophic dinoflagellate *Oblea rotunda*. *Limnol. Oceanogr.* 38, 965–977 (1993).
- 60/Strzepek, R.F., Harrison, P.J., Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. *Nature* 431, 689–692 (2004).
- 61/Strzepek, R.F., Price, N.M., Influence of irradiance and temperature on the iron content of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 206, 107–117 (2000).
- 62/Thomas, S.L., Campbell, D.A., Photophysiology of *Bolidomonas pacifica*. *J. Plankton Res.* 35, 260–269 (2013).
- 63/Thorel, M., Fauchot, J., Morelle, J., Raimbault, V., Le Roy, B., Miossec, C., Kientz-Bouchart, V., Claquin, P., Interactive effects of irradiance and temperature on growth and domoic acid production of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae* 39, 232–241 (2014).
- 64/Timmermans, K.R., Veldhuis, M.J.W., Brussaard, C.P.D., Cell death in three marine diatom species in response to different irradiance levels, silicate, or iron concentrations. *Aquat. Microb. Ecol.* 46, 253–261 (2007).
- 65/Timmermans, K.R., van der Wagt, B., Veldhuis, M.J.W., Maatman, A., de Baar, H.J.W., Physiological responses of three species of marine pico-phytoplankton to ammonium, phosphate, iron and light limitation. *J. Sea Res., Iron Resources and Oceanic Nutrients - Advancement of Global Environmental Simulations.* 53, 109–120 (2005).
- 66/Verity, P. G., Brussaard, C. P., Nejstgaard, J. C., van Leeuwe, M. A., Lancelot, C., & Medlin, L. K., Current understanding of *Phaeocystis* ecology and biogeochemistry, and perspectives for future research. In *Phaeocystis, major link in the biogeochemical cycling of climate-relevant elements* (pp. 311-330). Springer Netherlands (2007).
- 67/Verity, P. G., Robertson, C. Y., Tronzo, C. R., Andrews, M. G., Nelson, J. R., & Sieracki, M. E., Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 37(7), 1434-1446 (1992).
- 68/Verity, P.G., Smayda, T.J., Sakshaug, E., Photosynthesis, excretion, and growth rates of *Phaeocystis* colonies and solitary cells. *Polar Res.* 10, 117–128 (1991).
- 69/Verity, P.G., Villareal, T.A., Smayda, T.J., Ecological investigations of blooms of colonial *Phaeocystis pouchetti*. II. The role of life-cycle phenomena in bloom termination. *J. Plankton Res.* 10, 749–766 (1988).
- 70/Verity, P.G., Effect of temperature, irradiance, and daylength on the marine diatom *Leptocylindrus Danicus* Cleve. IV. Growth. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, Vol. 60, pp.209-222 (1982).

References

- Ahlgren, N. A., & Rocap, G. (2012). Diversity and distribution of marine *Synechococcus*: multiple gene phylogenies for consensus classification and development of qPCR assays for sensitive measurement of clades in the ocean. *Frontiers in microbiology*, 3:213.
- Aminot, A., & Kérouel, R. (2004). *Hydrologie des écosystèmes marins: paramètres et analyses*. Editions Quae.
- Arrigo, K. R., Robinson, D. H., Worthen, D. L., Dunbar, R. B., DiTullio, G. R., VanWoert, M., & Lizotte, M. P. (1999). Phytoplankton community structure and the drawdown of nutrients and CO₂ in the Southern Ocean. *Science*, 283(5400), 365-367.
- Bellwood, D. R., Wainwright, P. C., Fulton, C. J., & Hoey, A. S. (2006). Functional versatility supports coral reef biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1582), 101-107.
- Bonato, S., Christaki, U., Lefebvre, A., Lizon, F., Thyssen, M., & Artigas, L. F. (2015). High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area, in spring: the eastern English Channel. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*.
- Bissinger, J. E., Montagnes, D. J., & Atkinson, D. (2008). Predicting marine phytoplankton maximum growth rates from temperature: Improving on the Eppley curve using quantile regression. *Limnology and Oceanography*, 53(2), 487-493.
- Brand, L. E., & Guillard, R. R. L. (1981). The effects of continuous light and light intensity on the reproduction rates of twenty-two species of marine phytoplankton. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 50(2), 119-132.
- Brown, C., Burslem, D. F. R. P., Illian, J. B., Bao, L., Brockelman, W., Cao, M., Chang, L.W., Dattaja, H.S., Davies, S., Gunatilleke, C.V.S., Gunatilleke, I.A.U.N., Huang, J., Kassim, A.R., LaFrankie, J.V., Lian, J., Lin, L., Ma, K., Mi, X., Nathalang, A., Noor, S., Ong, P., Sukumar, R., Su, S.H., Sun, I.F., Suresh, H.S., Tan, S., Thompson, J., Uriarte, M., Valencia, R., Yap, S.L., Ye, W., Law, R. (2013). Multispecies coexistence of trees in tropical forests: spatial signals of topographic niche differentiation increase with environmental heterogeneity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1764), 20130502.
- Buitenhuis, E. T., Pangerc, T., Franklin, D. J., Le Qu  r  , C., & Malin, G. (2008). Growth rates of six coccolithophorid strains as a function of temperature. *Limnology and Oceanography*, 53(3), 1181-1185.
- Cardinale, B. J. (2011). Biodiversity improves water quality through niche partitioning. *Nature*, 472(7341), 86-89.

- Cardinale, B.J., Duffy, J.E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., Mace, G.M., Tilman, D., Wardle, D.A., Kinzig, A.P., Daily, G.C., Loreau, M., Grace, J.B., Larigauderie, A., Srivastava, D.S., Naeem, S., 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486, 59–67.
- Chapin III, F. S., Zavaleta, E. S., Eviner, V. T., Naylor, R. L., Vitousek, P. M., Reynolds, H. L., Hooper, D.U., Lavorel, S., Sala, O.E., Hobbie, S.E., Mack, M.C., Díaz, S. (2000). Consequences of changing biodiversity. *Nature*, 405(6783), 234-242.
- Grace, J.B., Larigauderie, A., Srivastava, D.S., Naeem, S., 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486, 59–67.
- Chen, B., Liu, H., Huang, B., & Wang, J. (2014). Temperature effects on the growth rate of marine picoplankton. *Mar Ecol Prog Ser*, 505, 37-47.
- Cloern, J. E. (1977). EFFECTS OF LIGHT INTENSITY AND TEMPERATURE ON CRYPTOMONAS OVATA (CRYPTOPHYCEAE) GROWTH AND NUTRIENT UPTAKE RATES1. *Journal of phycology*, 13(4), 389-395.
- Cloern, J. E. (2001). Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine ecology progress series*, 210(2001), 223-253.
- Cornwell, W. K., & Ackerly, D. D. (2009). Community assembly and shifts in plant trait distributions across an environmental gradient in coastal California. *Ecological Monographs*, 79(1), 109-126.
- Costanza, R., de Groot, R., Sutton, P., van der Ploeg, S., Anderson, S. J., Kubiszewski, I., Farber, S., & Turner, R. K. (2014). Changes in the global value of ecosystem services. *Global Environmental Change*, 26, 152-158.
- Díaz, S., Hodgson, J.G., Thompson, K., Cabido, M., Cornelissen, J.H.C., Jalili, A., Montserrat-Martí, G., Grime, J.P., Zarrinkamar, F., Asri, Y., Band, S.R., Basconcelo, S., Castro-Díez, P., Funes, G., Hamzehee, B., Khoshnevi, M., Pérez-Harguindeguy, N., Pérez-Rontomé, M. C., Shirvany, F. A., Vendramini, F., Yazdani, S., Abbas-Azimi, R., Bogaard, A., Boustani, S., Charles, M., Dehghan, M., de Torres-Espuny, L., Falczuk, V., Guerrero-Campo, J., Hynd, A., Jones, G., Kowsary, E., Kazemi-Saeed, F., Maestro-Martínez, M., Romo-Díez, A., Shaw, S., Siavash, B., Villar-Salvador, P., Zak, M.R., 2004. The plant traits that drive ecosystems: Evidence from three continents. *J. Veg. Sci.* 15, 295–304.
- Dolédec, S., Chessel, D., Ter Braak, C. J. F., & Champely, S. (1996). Matching species traits to environmental variables: a new three-table ordination method. *Environmental and Ecological Statistics*, 3(2), 143-166.
- Edwards, K. F., M. K. Thomas, C. A. Klausmeier, and Elena Litchman. 2015. Light and growth in marine phytoplankton: allometric, taxonomic, and environmental variation. *Limnol Oceanogr* (under press).
- Edwards, K. F., Litchman, E., & Klausmeier, C. A. (2013). Functional traits explain phytoplankton community structure and seasonal dynamics in a marine ecosystem. *Ecology letters*, 16(1), 56-63.
- Edwards, K. F., Litchman, E., & Klausmeier, C. A. (2013). Functional traits explain phytoplankton responses to environmental gradients across lakes of the United States. *Ecology*, 94(7), 1626-1635.

- Edwards, K. F., Thomas, M. K., Klausmeier, C. A., & Litchman, E. (2012). Allometric scaling and taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 57(2), 554-566.
- Eppley, R. W., Horrigan, S. G., Fuhrman, J. A., Brooks, E. R., Price, C. C., & Sellner, K. (1981). Origins of dissolved organic matter in southern California coastal waters: Experiments on the role of zooplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 6, 149-159.
- Falkowski, P. G., Barber, R. T., & Smetacek, V. (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 281(5374), 200-206.
- Fielding, S.R. (2014). *Emiliania huxleyi* population growth rate response to light and temperature: a synthesis. *Aquat. Microb. Ecol.* 73, 163–170.
- Fraisse, S., Bormans, M., & Lagadeuc, Y. (2013). Morphofunctional traits reflect differences in phytoplankton community between rivers of contrasting flow regime. *Aquatic Ecology*, 47(3), 315-327.
- Gagic, V., Bartomeus, I., Jonsson, T., Taylor, A., Winqvist, C., Fischer, C., Slade, E.M., Steffan-Dewenter, I., Emmerson, M., Potts, S.G., Tschardtke, T., Weisser, W., Bommarco, R., 2015. Functional identity and diversity of animals predict ecosystem functioning better than species-based indices. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282, 20142620.
- Garnier, E., Cortez, J., Billès, G., Navas, M. L., Roumet, C., Debussche, M., G. Laurent, A. Blanchard, D. Aubry, A. Bellmann, C. Neill, & Toussaint, J. P. (2004). Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology*, 85(9), 2630-2637.
- Gentilhomme, V., & Lizon, F. (1998). Seasonal cycle of nitrogen and phytoplankton biomass in a well-mixed coastal system (Eastern English Channel). *Hydrobiologia*, 361(1-3), 191-199.
- Grime, J. P. (1998). Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *Journal of Ecology*, 86(6), 902-910.
- Grime, J.P., Thompson, K., Hunt, R., Hodgson, J.G., Cornelissen, J.H.C., Rorison, I.H., Hendry, G.A.F., Ashenden, T.W., Askew, A.P., Band, S.R., Booth, R.E., Bossard, C.C., Campbell, B.D., Cooper, J.E.L., Davison, A.W., Gupta, P.L., Hall, W., Hand, D.W., Hannah, M.A., Hillier, S.H., Hodgkinson, D.J., Jalili, A., Liu, Z., Mackey, J.M.L., Matthews, N., Mowforth, M.A., Neal, A.M., Reader, R.J., Reiling, K., Ross-Fraser, W., Spencer, R.E., Sutton, F., Tasker, D.E., Thorpe, P.C., Whitehouse, J., 1997. Integrated Screening Validates Primary Axes of Specialisation in Plants. *Oikos* 79, 259–281.
- Grover, J. (1997). *Resource competition* (Vol. 19). Springer Science & Business Media.
- Hill, M. O., & Smith, A. J. E. (1976). Principal component analysis of taxonomic data with multi-state discrete characters. *Taxon*, 249-255.
- Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of phycology*, 35(2), 403-424.

- Hooper, D. U., Chapin III, F. S., Ewel, J. J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, J., Vandermeer, J., Wardle, D. A. (2005). Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological monographs*, 75(1), 3-35.
- Houliet, E., Lizon, F., Thyssen, M., Artigas, L.F., Schmitt, F.G., 2012. Spectral fluorometric characterization of Haptophyte dynamics using the FluoroProbe: an application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *J. Plankton Res.*, 34, 136-151.
- Jakobsen, H. H., & Tang, K. W. (2002). Effects of protozoan grazing on colony formation in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) and the potential costs and benefits. *Aquatic Microbial Ecology*, 27(3), 261-273.
- Kassen, R. (2002). The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *Journal of evolutionary biology*, 15(2), 173-190.
- Kneitel, J.M., Chase, J.M., 2004. Disturbance, predator, and resource interactions alter container community composition. *Ecology* 85, 2088–2093. doi:10.1890/03-3172
- Kruk, C., Peeters, E. T. H. M., Van Nes, E. H., Huszar, V. D. M., Costa, L. S., & Scheffer, M. (2011). Phytoplankton community composition can be predicted best in terms of morphological groups. *Limnology and Oceanography*, 56(1), 110-118.
- Laliberté, E., & Legendre, P. (2010). A distance-based framework for measuring functional diversity from multiple traits. *Ecology*, 91(1), 299-305.
- Lamy, D., Obernosterer, I., Laghdass, M., Artigas, L. F., Breton, E., Grattepanche, J. D., Lecuyer, E., Degros, N., Lebaron, P., Christaki, U. (2010). Temporal changes of major bacterial groups and bacterial heterotrophic activity during a *Phaeocystis globosa* bloom in the eastern English Channel. *Aquatic Microbial Ecology*, 58(1), 95.
- Lamy, D., Artigas, L. F., 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(3), 227-238.
- Lancelot, C., Mathot, S., Owens, N.J.P., Modelling protein synthesis, a step to an accurate estimate of net primary production: The case of *Phaeocystis pouchetii* colonies in Belgian coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 32, 193–202 (1986).
- Lavorel, S., & Garnier, E. (2002). Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional ecology*, 16(5), 545-556.
- Lavorel, S., Díaz, S., Cornelissen, J. H. C., Garnier, E., Harrison, S. P., McIntyre, S., Pausas, J.G., Pérez-Harguindeguy, N., Roumet, C., Urcelay, C. (2007). Plant functional types: are we getting any closer to the Holy Grail?. In *Terrestrial ecosystems in a changing world* (pp. 149-164). Springer Berlin Heidelberg.
- Leonardos, N., & Geider, R. J. (2004). Responses of elemental and biochemical composition of *Chaetoceros muelleri* to growth under varying light and nitrate: phosphate supply ratios and their influence on critical N: P. *Limnology and Oceanography*, 49(6), 2105-2114.
- Lorenzen, C. J. (1967). DETERMINATION OF CHLOROPHYLL AND PHEO-PIGMENTS: SPECTROPHOTOMETRIC EQUATIONS1. *Limnology and oceanography*, 12(2), 343-346.

- Li, W. K. W. (2002). Macroecological patterns of phytoplankton in the northwestern North Atlantic Ocean. *Nature*, 419(6903), 154-157.
- Litchman, E., & Klausmeier, C. A. (2001). Competition of phytoplankton under fluctuating light. *The American Naturalist*, 157(2), 170-187.
- Litchman, E., Klausmeier, C. A., Schofield, O. M., & Falkowski, P. G. (2007). The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. *Ecology letters*, 10(12), 1170-1181.
- Litchman, E., and C. A. Klausmeier. (2008). Trait-based community ecology of phytoplankton. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39: 615–639.
- Litchman, E., Edwards, K.F., Klausmeier, C.A., (2015). Microbial resource utilization traits and trade-offs: implications for community structure, functioning, and biogeochemical impacts at present and in the future. *Front. Syst. Microbiol.* 254.
- Lizon, F., Lagadeuc, Y., Brunet, C., Aelbrecht, D., Bentley, D., (1995). Primary production and photoadaptation of phytoplankton in relation with tidal mixing in coastal waters. *J. Plankton Res.* 17, 1039–1055.
- McKane, R. B., Johnson, L. C., Shaver, G. R., Nadelhoffer, K. J., Rastetter, E. B., Fry, B., Giblin, A.E., Kielland, K., Kwiatkowski, B.L., Laundre, J.A., Murray, G. (2002). Resource-based niches provide a basis for plant species diversity and dominance in arctic tundra. *Nature*, 415(6867), 68-71.
- Mokany, K., Ash, J., & Roxburgh, S. (2008). Functional identity is more important than diversity in influencing ecosystem processes in a temperate native grassland. *Journal of Ecology*, 96(5), 884-893.
- Moore, J. K., Doney, S. C., Kleypas, J. A., Glover, D. M., & Fung, I. Y. (2002). An intermediate complexity marine ecosystem model for the global domain. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49(1), 403-462.
- Morel, A., Smith, R.C. (1974). Relation between total quanta and total energy for aquatic photosynthesis. *Limnol.Ocean.*, 19, 591-600.
- Mouillot, D., Graham, N. A., Villéger, S., Mason, N. W., & Bellwood, D. R. (2013). A functional approach reveals community responses to disturbances. *Trends in ecology & evolution*, 28(3), 167-177.
- Ojala, A. (1993). EFFECTS OF TEMPERATURE AND IRRADIANCE ON THE GROWTH OF TWO FRESHWATER PHOTOSYNTHETIC CRYPTOPHYTES1. *Journal of phycology*, 29(3), 278-284.
- Paasche, E. (1968). Marine Plankton Algae Grown with Light-Dark Cycles. *Physiol. Plant.* 21, 66–77.
- Pittera, J., Humily, F., Thorel, M., Grulois, D., Garczarek, L., & Six, C. (2014). Connecting thermal physiology and latitudinal niche partitioning in marine *Synechococcus*. *The ISME journal*, 8(6), 1221-1236.
- Pomati, F., Kraft, N. J., Posch, T., Eugster, B., Jokela, J., & Ibelings, B. W. (2013). Individual cell based traits obtained by scanning flow-cytometry show selection by biotic and abiotic environmental factors during a phytoplankton spring bloom. *PloS one*, 8(8), e71677.

- Ptacnik, R., Solimini, A. G., Andersen, T., Tamminen, T., Brettum, P., Lepistö, L., Willén, E., & Rekolainen, S. (2008). Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton communities. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 105(13), 5134-5138.
- Rasband, W.S. (2006). *ImageJ*, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Raven, J. A. (1987). The role of vacuoles. *New Phytologist*, 106(3), 357-422.
- Riley, G.A., 1957. Phytoplankton of the north central Sargasso Sea. *Limnol. Oceanog.*, 2, 252-270.
- Rocha, M. R., Vasseur, D. A., & Gaedke, U. (2012). Seasonal variations alter the impact of functional traits on plankton dynamics. *PloS one*, 7(12), e51257.
- Rousseau, V., Chrétiennot-Dinet, M. J., Jacobsen, A., Verity, P. & Whipple, S. 2007. The life cycle of Phaeocystis: state of knowledge and presumptive role in ecology. *Biogeochemistry* 83: 29–47.
- Roscher, C., Schumacher, J., Gubsch, M., Lipowsky, A., Weigelt, A., Buchmann, N., Schmid, B., Schulze, E. D. (2012). Using plant functional traits to explain diversity–productivity relationships. *PLoS One*, 7(5), e36760.
- Sanderson, M. P., Bronk, D. A., Nejstgaard, J. C., Verity, P. G., Sazhin, A. F., & Frischer, M. E. (2008). Phytoplankton and bacterial uptake of inorganic and organic nitrogen during an induced bloom of Phaeocystis pouchetii. *Aquatic Microbial Ecology*, 51(2), 153.
- 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.
- Schwaderer, A. S., K. Yoshiyama, P. T. Pinto, N. G. Swenson, C. A. Klausmeier, and E. Litchman. 2011. Eco-evolutionary differences in light utilization traits and distributions of freshwater phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 56: 589– 598.
- Stawiarski, B. (2013). Picophytoplankton physiology and the microbial loop, in: EGU General Assembly Conference Abstracts.
- Striebel, M., Behl, S., & Stibor, H. (2009). The coupling of biodiversity and productivity in phytoplankton communities: consequences for biomass stoichiometry. *Ecology*, 90(8), 2025-2031.
- Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M., & Siemann, E. (1997). The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science*, 277(5330), 1300-1302.
- Tittel, J., Bissinger, V., Zippel, B., Gaedke, U., Bell, E., Lorke, A., & Kamjunke, N. (2003). Mixotrophs combine resource use to outcompete specialists: implications for aquatic food webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12776-12781.
- Van Boekel, W.H.M. (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(5), 959-970.
- Van Der Zee, C., & Chou, L. (2005). Seasonal cycling of phosphorus in the Southern Bight of the North Sea. *Biogeosciences*, 2(1), 27-42.

- Van Gremberghe, I., Vanormelingen, P., Van der Gucht, K., Mancheva, A., D'hondt, S., De Meester, L., & Vyverman, W. (2009). Influence of *Daphnia* infochemicals on functional traits of *Microcystis* strains (Cyanobacteria). *Hydrobiologia*, 635(1), 147-155.
- Veldhuis, M.J.W., Admiraal, W., 1987. Influence of phosphate depletion on the growth and colony formation of *Phaeocystis pouchetii*. *Mar. Biol.* 95, 47–54.
- Verdu, M., Rey, P. J., Alcantara, J. M., Siles, G., & Valiente-Banuet, A. (2009). Phylogenetic signatures of facilitation and competition in successional communities. *Journal of Ecology*, 97(6), 1171-1180.
- Villéger, S., Mason, N. W., & Mouillot, D. (2008). New multidimensional functional diversity indices for a multifaceted framework in functional ecology. *Ecology*, 89(8), 2290-2301.
- Villéger, S., Miranda, J. R., Hernández, D. F., & Mouillot, D. (2010). Contrasting changes in taxonomic vs. functional diversity of tropical fish communities after habitat degradation. *Ecological Applications*, 20(6), 1512-1522.
- Violle, C., & Jiang, L. (2009). Towards a trait-based quantification of species niche. *Journal of Plant Ecology*, 2(2), 87-93.

Chapitre VI :

Discussion et perspectives

Un des enjeux majeurs de l'écologie est de comprendre la composition et la structure des communautés en réponse aux facteurs environnementaux (biotiques et abiotiques). Le très grand nombre d'espèces phytoplanctoniques ainsi que les nombreuses interactions biotiques (compétition, prédation, lyse virale) et abiotiques qui contribuent au paradoxe de Hutchinson (Hutchinson, 1961), rendent cela complexe à réaliser. L'utilisation d'un cytomètre en flux spécialement dédié à l'analyse du phytoplancton dans toute sa gamme de tailles, *in vivo* et *in situ* (analyses en continu), permet d'obtenir de nouvelles avancées dans ce domaine de recherche.

L'objectif principal de ce travail était d'étudier les communautés phytoplanctoniques et leurs interactions avec l'environnement en Manche Orientale. L'originalité de ce travail repose sur la caractérisation de l'ensemble du spectre de taille phytoplanctonique en Manche Orientale à différentes échelles spatio-temporelles (Figure 26), en tenant compte des paramètres environnementaux susceptibles d'exercer un forçage sur la variabilité du phytoplancton. Cette section reprendra les points principaux des questions posées en introduction et discutera de certains aspects qui sont apparus intéressants au cours de ce travail.

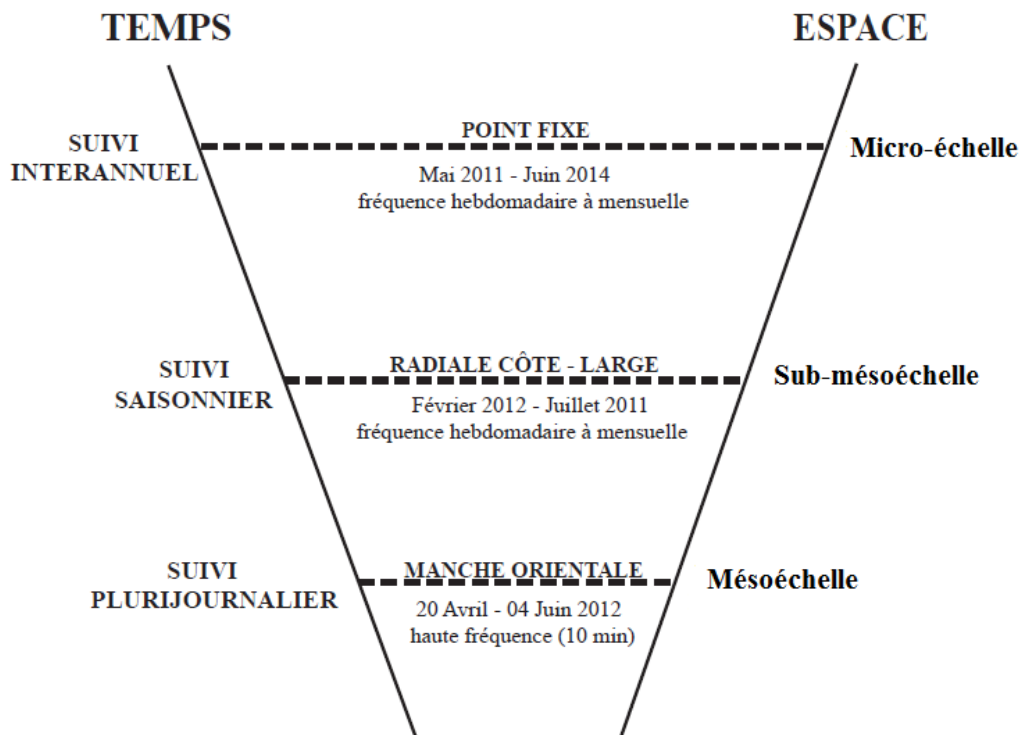


Figure 26. Schéma des différentes échelles spatio-temporelles étudiées au cours de cette thèse

Quelle est la variabilité spatiale du phytoplancton en Manche Orientale ?

Un des objectifs premiers du projet transfrontalier néerlandais-anglo-français DYMAPHY (2010-2014), visait à améliorer les connaissances et l'évaluation de la qualité des eaux marines de la Manche et de la Mer du Nord, à travers l'étude du compartiment phytoplanctonique et paramètres environnementaux associés, de par l'utilisation de techniques semi-automatisées permettant d'identifier et de quantifier le phytoplancton à haute résolution spatiale. Dans ce contexte l'utilisation du CytoSense pour des mesures automatisées à haute fréquence et des mesures en laboratoire, a permis d'étudier la variabilité spatiale puis définir des protocoles standards d'utilisation communs aux différents partenaires de DYMAPHY (www.dymaphy.eu).

Le temps d'analyse avec un CytoSense dépend de la densité de cellules présentes dans l'échantillon et n'excède en général pas 10 min. Au cours de la campagne DYPHYMA (fin avril 2012, Chapitre III) en utilisant ce pas de temps d'échantillonnage et en ajustant la vitesse du bateau à 5 nœuds, il a été possible d'avoir une fine résolution spatiale avec une analyse effectuée tous les 1,5 km. Cette étude a révélé des changements abrupts d'abondance et de composition. A sub-mesoéchelle cette étude a permis de délimiter à l'intérieur même de la Manche Orientale différentes zones géographiques reliées à différents assemblages phytoplanctoniques. Contrairement aux résultats de Thyssen *et al.* (2009) qui a étudié la dynamique à sub-mesoéchelle des abondances phytoplanctoniques sur une grande distance et en milieu ouvert (Atlantique Nord), les paramètres hydrologiques n'ont pu expliquer la répartition des assemblages phytoplanctoniques. La Manche Orientale ayant un hydrodynamisme complexe avec notamment l'impact du détroit du Pas-de-Calais et des masses d'eau difficilement délimitables, des processus physiques (turbulence) et biologiques (compétition, broutage, lyse virale, etc.) pourraient entrer en compte dans la délimitation de ces assemblages. Les résultats ont néanmoins montré l'impact des différents estuaires français. En effet dans cette zone une importante abondance de *P. globosa* et une forte fluorescence rouge ont été mesurées alors qu'au milieu de la Manche le picoplancton était dominant mais la fluorescence rouge était faible. Cette campagne a aussi révélé un mode de répartition en patches, où sur de courtes distances des changements de composition des assemblages phytoplanctonique ont eu lieu, ainsi que des gradients côte-large, comme au niveau du Déroit du Pas de Calais, ou bien au large de la ville d'Eastbourne.

Les résultats obtenus soulignent la grande complexité des processus structurant la variabilité spatiale du phytoplancton dans un écosystème côtier sous l'influence de d'apports fluviaux. Lors de la campagne DYPHYMA seuls quelques paramètres hydrologiques (température et salinité) ont été mesurés à haute fréquence grâce au couplage PFB-CytoSense. Par ailleurs, nous n'avons pas pu prendre en compte des mesures de courant pour compléter la caractérisation des masses d'eau. Il serait potentiellement intéressant de coupler les mesures réalisées sur le phytoplancton à des mesures de paramètres biogéochimiques à haute fréquence comme les sels nutritifs. Cependant si l'objectif est d'avoir une vue synoptique à un moment donné de l'ensemble d'une zone, l'obligation de réaliser des campagnes très courtes peut soulever la question de l'utilité d'une telle mise en place. En effet l'impact des sels nutritifs sur des populations phytoplanctoniques étant certainement nul à une échelle temporelle aussi courte. Au contraire il serait tout à fait pertinent d'équiper de ses dispositifs des navires de recherche ou d'opportunité de type ferrys effectuant des trajets réguliers (Rantajärvi *et al.*, 1998 ; Swertz *et al.*, 1999 ; Garcia-Soto et Pingree, 2009). Cela permettrait de pouvoir étudier la variabilité spatio-temporelle du phytoplancton sans perte d'information, comme cela a été le cas lors du suivi sur la radiale côte-large (Chapitre IV) où nous avons dû dégrader le signal haute fréquence de l'abondance phytoplanctonique afin de le corrélérer avec les paramètres environnementaux mesurés à plus basse résolution spatiale. Au cours de cette étude, la variabilité temporelle aurait masqué une partie de la variabilité spatiale (voir paragraphe plus bas).

Une forte hétérogénéité spatiale a également été observée lors de la campagne DYMAPHY-PROTOOL (8 au 12 Mai 2011, Thyssen *et al.*, 2014a), à laquelle ont participé des membres du projet, et où la résolution était pourtant moins fine ($2,2 \pm 1,8$ km) mais avec une plus grande surface échantillonnée (Figure 8) que lors des campagnes DYPHYMA. Dans cette étude les abondances ont varié en fonction de l'état hydrologique des eaux traversées, validant ainsi les résultats déjà observés par Thyssen *et al.* (2009) en Atlantique Nord (étude à plus grande échelle et traversant à la fois un grand plateau continental et des masses d'eau océaniques), où l'abondance, la fluorescence et la taille des groupes phytoplanctoniques variaient eux aussi en fonction des masses d'eau traversées. Dans l'aire d'étude de la campagne DYPHYMA soit l'hydrodynamisme était trop complexe à cause d'une accélération des courants au niveau du détroit ou d'une forte turbulence qui interagirait avec les facteurs de dispersion horizontaux des courants (Sentchev et Korotenko, 2005), soit notre zone d'étude

était trop petite pour rendre compte et décrire correctement des changements hydrologiques et les associer avec les abondances phytoplanctoniques.

La télédétection pourrait contribuer à résoudre l'hétérogénéité spatiale à l'échelle régionale. Mais pour cela les études satellites sont toujours limitées par la couverture nuageuse, le développement d'algorithmes (notamment dans les eaux côtières du Cas II) et ont impérativement besoin de données *in situ* à haute résolution. Les données cytométriques en continu pourraient s'avérer essentielles pour calibrer les algorithmes qui permettent aux satellites de retracer la signature de la couleur de l'eau (dérivée de la fluorescence due à la chlorophylle *a*, pigment universel du phytoplancton) dans l'océan (Platt, 1986 ; Behrenfeld et Falkowski, 1997). Depuis une dizaine d'années, des méthodologies ont été mises au point (dont la méthode PHYSAT) pour estimer la répartition spatiale de types fonctionnels phytoplanctoniques (PFT) présents dans les eaux de surface (Alvain *et al.*, 2005, 2008). PHYSAT repose sur l'identification des anomalies de spectres de rayonnement associées à la présence de groupes spécifiques de phytoplancton dans les eaux de surface. À ce jour, six groupes fonctionnels de phytoplancton dominant les eaux ouvertes ont été significativement liés à des anomalies spécifiques (Alvain *et al.*, 2008). Les anomalies ont été identifiées grâce à la comparaison avec des données HPLC *in situ*. Un nombre de groupes ou d'assemblages supplémentaires pourrait être ajouté avec une augmentation du nombre d'observations précises effectuées *in situ*. Lors de la campagne DYMAPHY-PROTOOL, le nombre de confrontations entre le CytoSense automatisé à haute fréquence et les images de télédétection a été 2 à 3 fois plus important (Thyssen *et al.*, 2014a) que lors des confrontations avec des techniques utilisées à basse fréquence. Les résultats obtenus suggèrent qu'il est possible d'étiqueter des anomalies PHYSAT non seulement avec les groupes dominants, mais au niveau de la structure de la communauté (Thyssen *et al.*, 2014a). Ce même type d'étude aurait dû être effectué lors de la campagne DYPHYMA mais une couverture nuageuse trop importante a empêché la prise en compte des images satellites. Au cours de l'intercomparaison de techniques (Chapitre III), les données de fluorescence rouge (sur l'ensemble des groupes) à haute fréquence se trouvent relativement bien corrélées avec les données HPLC basse fréquence (résultats proche de Thyssen *et al.*, 2014). Ceci pourrait faire de la cytométrie, à la fois un puissant outil pour corriger les anomalies satellites à la place de l'HPLC, mais aussi un outil servant de proxy de chlorophylle *a* pouvant aider à améliorer les

flux de matière via l'estimation de la biomasse chlorophyllienne (en gardant en vue que le rapport « Chla / C » est très variable, Falkowski *et al.*, 1985).

Quelle est la variabilité temporelle du phytoplancton en Manche Orientale ?

La fréquence d'échantillonnage est cruciale pour suivre la dynamique du phytoplancton (Dubelaar *et al.*, 2004 ; Kromkamp *et al.*, 2010). Les variations des abondances phytoplanctoniques à court terme s'échelonnent d'une échelle horaire à plusieurs jours. Plus l'échantillonnage s'effectue à basse fréquence plus la perte d'information est importante (Figure 27, Dubelaar *et al.*, 2004).

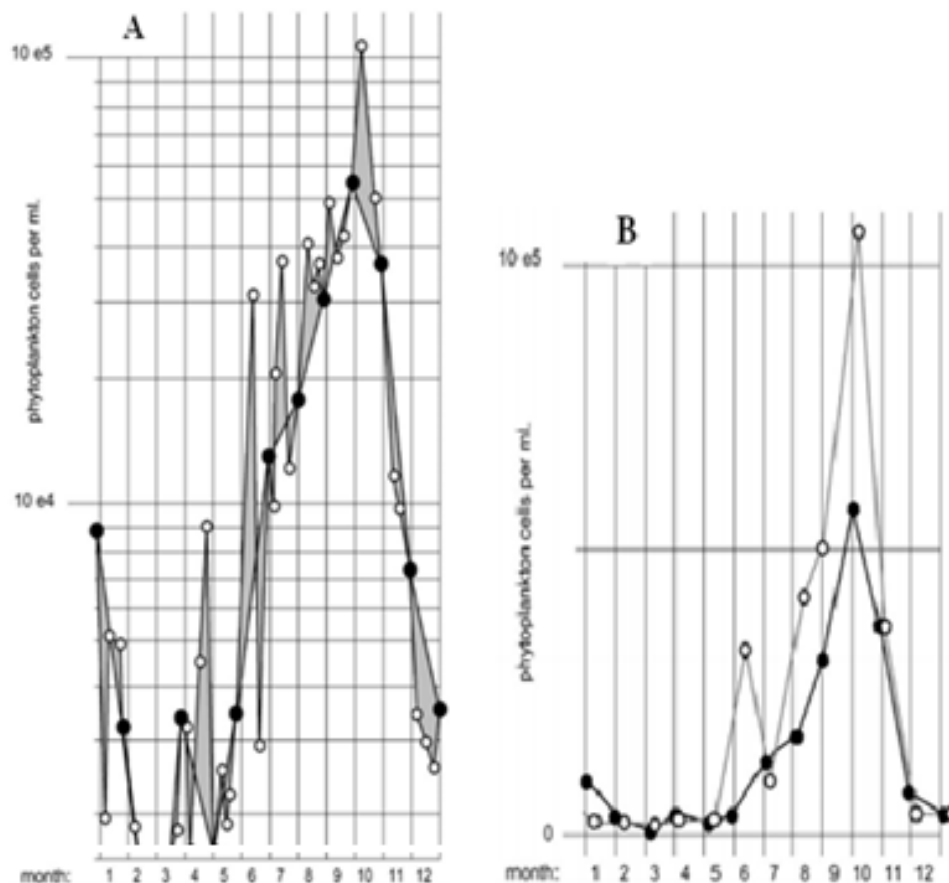


Figure 27. Comptages phytoplanctoniques réalisés au cytomètre en flux au cours d'un bloom. (A) indique la perte d'information (aires grises) causée par la réduction d'un échantillonnage mensuel (ronds noirs) par rapport à un échantillonnage hebdomadaire (ronds blancs). (B) indique le biais induit par la discrétisation de l'échantillonnage. Les ronds noirs reproduisent les valeurs mesurées chaque première semaine du mois et les ronds blancs indiquent les valeurs mesurées chaque deuxième semaine du mois (Dubelaar *et al.*, 2004)

Cette perte d'information n'est ni quantifiable ni qualifiable. Ainsi des espèces clés ou nuisibles (toxiques ou non toxiques, de type Harmful Algal Blooms - HAB) pourraient apparaître de manière sporadique sans être détectées avec cependant des conséquences environnementales et sanitaires. Ce scénario pourrait se produire et passer même inaperçu avec des suivis réguliers de systèmes d'observation et surveillance de type SOMLIT (Grattepanche *et al.*, 2011 ; Guilloux *et al.*, 2013) ou REPHY-SRN (Lefebvre *et al.*, 2011) à fréquence bi-hebdomadaire ou mensuelle. Il est entendu que les analyses microscopiques sont bien trop chronophages pour permettre une augmentation significative des fréquences d'échantillonnage en dehors de moments spécifiques définis par l'occurrence d'HABs. Les systèmes d'observation automatisés déjà existants pour ce qui est du suivi hydrologique et biogéochimique (bouée MAREL, EOL, etc.) s'avèrent donc logiquement la prochaine étape du monitoring du phytoplancton.

Le suivi hebdomadaire à bi-hebdomadaire sur une radiale côte-large en Manche Orientale (Chapitre IV) a permis d'étudier la succession saisonnière des principaux groupes et espèces phytoplanctoniques de l'écosystème Manche orientale. En accord avec les études antérieures réalisées (e.g Brunet *et al.*, 1996 ; Breton *et al.*, 2000 ; Schapira *et al.*, 2008 ; Lamy *et al.*, 2009 ; Guiselin, 2010 ; Lefebvre *et al.*, 2011 ; Monchy *et al.*, 2012 ; Hernández-Fariñas *et al.*, 2013), la période productive printanière, est principalement dominée par les diatomées et la Prymnésiophycée *Phaeocystis globosa*. Les variations temporelles de l'abondance des différents groupes phytoplanctoniques montre qu'ils se répartissent en 3 grandes phases saisonnières: i) l'hiver, avec *Synechococcus* spp. et picoeucaryotes, ii) le printemps, caractérisé par l'efflorescence de *Phaeocystis globosa* et des diatomées, iii) l'été, qui se caractérise par la prédominance des *Synechococcus* spp., picoeucaryotes à faible fluorescence rouge, Cryptophytes et Coccolithophoridés comme groupes structurants majeurs. Comme pour nos résultats, Not *et al.* (2004) ont montré que la part de l'abondance du picoplancton en Manche (Roscoff) était très importante tout au long de l'année excepté lors de l'efflorescence printanière. Il semblerait tout de même que la composition du picoplancton soit différente de celle observée en Manche Orientale. Not *et al.* (2004) montrent plutôt une composition picoplanctonique principalement due aux Chlorophycées (*Micromonas pusilla*), groupe qui n'a pas ou très peu été détecté par les techniques pigmentaires lors de différents suivis en Manche Orientale. Dans le Golfe de Gascogne, un même schéma de succession diatomées - *P. globosa* - diatomées a été observé par microscopie (Ansotegui *et al.*, 2003) avec une augmentation des petites cellules de diatomées (*Chaetoceros*, *Nitzschia*) après

l'efflorescence de *P. globosa* (déjà observé par Guiselin, 2010). Au niveau du picoplancton, Ansotegui *et al.* (2003) observent une augmentation progressive de son abondance vers les périodes chaudes. Des études par microscopie (Vaulot et Xiuren, 1988 ; Uysal et Köksalan, 2006) observent de fortes concentrations de *Synechococcus* en été mais aussi des variations de taille entre les communautés hivernales et estivales (Vaulot et Xiuren, 1988). Le picoplancton (dont *Synechococcus* spp.) hivernal et estival mesuré dans notre étude pourrait être génétiquement différent (Mühling *et al.*, 2005) et/ou avoir une plasticité phénotypique différente. De ce fait, le picoplancton hivernal pourrait être plutôt adapté aux lumières limitantes de par sa forte efficacité photosynthétique et le picoplancton estival aux milieux limités en nutriments de part sa forte affinité et un rapport S/V maximum pour l'absorption des nutriments. Cette succession saisonnière pourrait aussi être due aux contrôles effectués par les cyanophages (Mühling *et al.*, 2005).

L'étude sur la radiale côte-large nous a permis de définir les variations saisonnières de l'abondance des communautés phytoplanctoniques en relation avec les différents facteurs environnementaux, en essayant de réduire, en fonction des conditions météorologiques, le pas de temps entre chaque radiale en comparaison avec le pas de temps des suivis d'observation réguliers. Comme Houliez *et al.* (2013), il ne nous a pas été permis d'étudier convenablement le gradient spatial ainsi que sa variabilité dans le temps. L'observation du gradient spatial pourrait s'avérer plus efficace via la régionalisation (Anneville *et al.*, 2002) au cours d'une étude pluriannuelle.

Il est possible de d'augmenter la fréquence d'échantillonnage grâce à l'automatisation. Cela permettrait d'observer la variabilité phytoplanctonique à courte échelle temporelle et pourrait révéler des variations abruptes d'abondance phytoplanctonique liées à des changements sporadiques des conditions environnementales (Thyssen *et al.*, 2008 ; Dugenne *et al.*, 2014 ; Thyssen *et al.*, 2014b). Ces mesures à haute fréquence passent par l'appui de stations de mesures automatiques qui réalisent déjà des mesures hydrologiques, chimiques, biologiques et météorologiques à haute fréquence temporelle, comme les bouées MAREL ou du RESOMAR (SOLEMIO, SOLA, etc). Ce type de couplage déjà réalisé en milieu oligotrophe sur la bouée EOL (Thyssen *et al.*, 2014b) en partenariat avec le projet DYMAPHY, a pu notamment montrer comment un apport de nutriments (par des précipitations et/ou une remontée des eaux profondes), engendre une augmentation plus ou moins sporadique des cellules pico- et

nanophytoplanctoniques. En Manche Orientale, la bouée MAREL-Carnot en service depuis 2004 (Lefebvre et Repecaud, 2006), pourrait être utilisée pour coupler le CytoSense et les paramètres environnementaux à haute fréquence, et aussi permettre de pallier aux contraintes météorologiques qui empêchent le suivi en période hivernale. Malheureusement, le groupe électrogène installé lors de la mise en place de la bouée en 2004 n'étant pas assez puissant pour pouvoir accueillir d'autres instruments que ceux déjà présents, cette expérience qui aurait dû se réaliser au printemps 2014 n'a pu finalement se concrétiser. Cependant, un groupe électrogène plus puissant a été installé récemment sur la bouée MAREL, prenant en compte la demande énergétique du CytoSense et du PocketFerryBox, pour une possible mise en place future de cette expérience en milieu eutrophe (projet CPER MARCO 2015-2020).

Comment se structurent les communautés phytoplanctoniques en eaux côtières en Manche Orientale ?

L'utilisation des traits fonctionnels pour caractériser les communautés phytoplanctoniques le long d'un gradient de ressources n'est pas récente. Margalef (1978), pionnier dans le domaine, a utilisé les traits morpho-fonctionnels pour observer la réponse des différents groupes phytoplanctoniques face aux variations environnementales et a pu établir ainsi son notable "Mandala", dans lequel les nutriments et la turbulence seraient les forçages principaux responsables des successions entre des espèces à stratégie « r » et à stratégie « K ». Par la suite Reynolds (Reynolds, 1984 ; Reynolds *et al.*, 2002) a ajouté les traits physiologiques à cette classification et a proposé son "Intaglio" basé sur 3 stratégies principales : la compétition (C), la tolérance au stress (S) et la stratégie rudérale (R).

L'étude (Chapitre V) sur les traits fonctionnels (caractéristiques morphologiques et physiologiques des espèces) et leurs relations avec l'environnement démontre que la lumière serait le paramètre structurant majeur des communautés phytoplanctoniques des eaux côtières de la Manche orientale (station R1 de la radiale de la Baie Saint-Jean suivie pendant 3 années). Ainsi, une faible luminosité aurait agi comme filtre environnemental sur la composition de la communauté en hiver et aurait sélectionné des spécialistes (*Synechococcus* spp., Cryptophytes et picoeucaryotes) capables de l'utiliser (Liere et Walsby, 1982 ; Schwaderer *et al.*, 2011). Chez les cyanobactéries, la grande efficacité d'utilisation de la lumière pourrait être due à la faible luminosité solaire (Milo, 2009) au moment de leur

apparition sur terre, il y a 3,8 millions d'années. L'adaptation des cyanobactéries à une faible luminosité est associée à une forte capacité à récolter une plus grande gamme lumineuse (Langdon, 1988) par rapport à d'autres groupes grâce à la présence de pigments accessoires tels que les phycocyanines (Kirk, 1994) qui se retrouvent aussi chez les Cryptophytes. En avançant vers la saison printanière les généralistes (ou opportunistes, diatomées et *P. globosa*), considérés dans notre étude comme de faibles compétiteurs sous de faibles luminosités, ont commencé à augmenter en abondance au détriment des spécialistes, c'est un gradient 'spécialiste-généraliste' (« gleaner-opportunist », Litchman et Klausmeier, 2001).

Nos résultats sont d'autant plus intéressants que la méthode est appliquée sur des groupes cytométriques qui englobent pour la plupart des espèces non-redondantes, notamment les picoeucaryotes, les Cryptophytes et les diatomées. Le regroupement sous forme de groupes phytoplanctoniques masque certainement des exceptions aux règles écologiques observées (gradient 'spécialiste-généraliste'), certains groupes contenant à la fois des opportunistes et des spécialistes. Pourtant dans notre étude des relations claires entre les traits fonctionnels et l'environnement ont pu être mise en évidence. Cela confirmerait que les traits des espèces dominantes jouent un rôle plus important que ceux des espèces minoritaires, dans la structuration de l'écosystème.

Actuellement, les directives Européennes "Directive Cadre sur l'Eau"(DCE) et "Directive Cadre pour une Stratégie du Milieu Marin" (DCSMM), implémentées ou en cours d'implémentation dans les pays de la communauté européenne, cherchent à connaître et à suivre les changements de qualité des eaux côtières et marines dans le but de définir un état de référence et d'atteindre un bon état écologique de toutes les masses d'eau littorales et marines Européennes. Ces directives demandent d'utiliser des indicateurs biologiques dont le phytoplancton. Ainsi, une des perspectives de l'utilisation de la cytométrie en flux et de l'étude sur les traits fonctionnels serait de pouvoir fournir des indications sur les conditions environnementales en fonction des traits fonctionnels des groupes (ou assemblages) phytoplanctoniques (Figure 28). Puis en retour être capable de prédire à l'image des études sur des systèmes haute fréquence type MAREL (Rousseeuw *et al.*, 2013), la composition ou dynamique phytoplanctonique en fonction des conditions environnementales. Les résultats obtenus sur les « traits d'effet » étudiés confirme l'importance de « l'hypothèse du ratio de masse » (Grime, 1998), c'est-à-dire que les traits fonctionnels dominants chez les espèces les

plus abondantes au sein d'une communauté, seraient le moteur des processus écosystémiques les plus importants. Ainsi les espèces pourraient être considérées comme espèces indicatrices du milieu (Figure 28). Les espèces minoritaires pourraient cependant avoir un rôle important à jouer lors des changements de filtre environnemental ou des interactions biotiques, pouvant leur permettre de devenir par la suite à leur tour majoritaires.

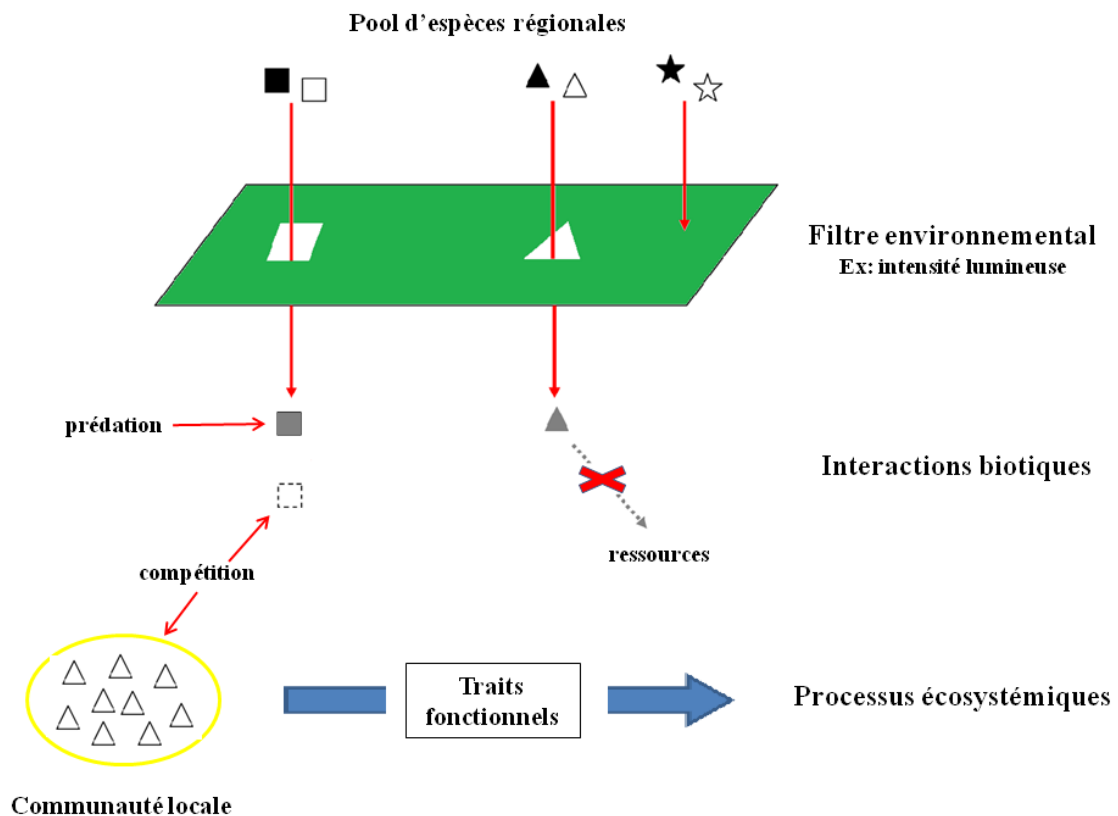


Figure 28. Représentation schématique de «l'hypothèse du ratio de masse» (d'après Villeger, 2008). Parmi les espèces du pool régional seules certaines passent à travers les filtres abiotiques en fonction de leurs niches environnementales respectives (symbolisées par leur forme). Dans la communauté locale, les interactions biotiques constituent un autre filtre. Ainsi, une espèce (triangle noir) qui ne trouve ses ressources appropriées ne peut pas survivre. De même, l'espèce symbolisée par le rectangle noir est tellement affectée par ses prédateurs qu'elle ne peut pas se développer. L'espèce symbolisée par le rectangle blanc est aussi affectée par la compétition (triangle blanc) qu'elle aussi ne peut proliférer dans ces conditions. Au final les espèces majoritaires (triangle blanc) déterminent via leurs traits fonctionnels les processus écosystémiques

La possibilité d'effectuer un échantillonnage à haute fréquence par le CytoSense lors de campagnes océanographiques à l'image des campagnes DYPHYMA ou lors de campagnes régulières (IBTS, CAMANOC, PELGAS), ainsi qu'au moyen de l'implémentation de cette technique sur des navires d'opportunité comme les ferrys (qui auraient l'avantage de permettre des suivis réguliers plusieurs fois par jour), permettrait d'étudier la structuration des écosystèmes marins à plus grande échelle. Il serait alors certainement possible, à une échelle régionale, de comprendre les changements abrupts de composition (Chapitre III, IV) au niveau spatial, ainsi que les mécanismes structurant l'écosystème. La connaissance taxonomique d'un milieu serait un plus permettant d'améliorer les associations traits fonctionnels – espèces, ainsi qu'une meilleure estimation des traits physiologiques via des mesures effectuées sur des cultures ciblant les espèces régionales voire sur des mesures physiologiques *in situ* (Houliez, 2012). Enfin, à l'image des études exploratrices actuelles dans ce domaine (Pomati *et al.*, 2013 ; Fontana *et al.*, 2014), l'utilisation des nombreux signaux optiques (FWS, SWS, FLR, FLO, FLY) en tant que trait fonctionnel, serait idéale pour observer la structure fonctionnelle d'un écosystème avec une précision non pas à l'échelle d'un groupe fonctionnel mais à l'échelle de la cellule. Les variables discrètes (i.e. Matériels et Méthodes) associées à chaque profil optique constituent, en effet, une source importante d'information qui ne sont que faiblement exploitées (hormis le Total FLR, longueur FWS). Or ces variables peuvent être associées à des descripteurs morphologiques via les mesures de taille (FWS) et de structure interne (SWS), et à des descripteurs physiologiques, via les mesures de fluorescence (FLR, FLO, FLY) des cellules phytoplanctoniques. Ainsi, l'utilisation des variables discrètes comme traits fonctionnels et leur analyse à haute fréquence, permettrait d'obtenir un très haut degré d'information sur les cellules phytoplanctoniques.

Dans quelle mesure la cytométrie en flux peut-elle rendre compte de la dynamique phytoplanctonique?

A l'heure actuelle, la cytométrie en flux regroupe les cellules possédant les mêmes propriétés optiques. Cette approche fournit un moyen simplifié d'étudier les assemblages phytoplanctoniques en l'absence d'identification jusqu'à l'espèce. Ceci n'a pas empêché de souligner que le CytoSense pouvait permettre d'établir de nombreux critères fonctionnels. Au

cours des différents suivis présentés dans ce manuscrit, le CytoSense a permis de discriminer 8 groupes phytoplanctoniques grâce à l'analyse manuelle des cytogrammes: 3 groupes picoplanctoniques (1-3 μm ; picoeucaryotes de faible (I) ou forte fluorescence rouge (II), *Synechococcus* spp.), 4 groupes nanoplanctoniques (5-20 μm ; Cryptophytes, coccolithophoridés, *P. globosa* haploïde et diploïde) et 1 groupe microplanctonique (>20 μm ; assimilé aux diatomées). Les résultats sur la discrimination des cellules de tailles inférieure à 20 μm sont en accord avec des études réalisées, en milieu oligotrophe comme 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. Concernant les groupes de cellules de *Phaeocystis globosa*, nos résultats sont en accord avec les observations de Rutten *et al.* (2005) et Guiselin (2010). Les intercomparaisons effectuées avec les autres techniques (HPLC, Fluoroprobe-AOA et microscopie; Chapitre III) ou lors du workshop au NIOZ avec d'autres cytomètres et microscopes (Matériel et Méthodes) ainsi que lors d'exercices et campagnes communes effectuées au cours du projet DYMAPHY (Thyssen *et al.*, 2014a), tendent à montrer que la cytométrie en flux obtient des résultats très proches à la fois des techniques de référence mais aussi des cytomètres classiques. Cependant, même si le CytoSense permet d'analyser un plus grand volume d'eau que les cytomètres classiques, afin d'augmenter la représentativité des cellules microphytoplanctoniques, une sous-estimation de ces cellules est toujours d'actualité. Notamment par le fait que les chaînes et les colonies ne soient comptées qu'en tant qu'une cellule. De plus lors des campagnes *in situ*, l'utilisation d'un unique seuil de détection (FLR 10mV), a pu amplifier cette sous-estimation par remplissage prématuré des disques d'enregistrement du CytoSense par les petites cellules plus nombreuses au détriment des plus grandes. L'application d'un deuxième seuil de détection plus élevé, permettant de beaucoup moins compter les cellules picoplanctoniques (et donc de ne pas saturer rapidement les disques), aurait permis d'analyser un plus grand nombre de cellules microphytoplanctoniques, mais cela au détriment de la résolution spatiale. Des améliorations techniques permettant d'augmenter la mémoire d'acquisition permettront peut-être de s'affranchir de cette situation, et d'analyser de plus grandes quantités de cellules et volumes d'eau.

Le groupe du microphytoplancton est extrêmement diversifié et une discrimination visuelle par leur simple profil optique reste très difficile, d'autant qu'il n'y aurait pas assez d'individus ou colonies de chaque espèce pour réaliser un comptage statistiquement valable pour chacune

des espèces identifiées. Un couplage avec un système d'acquisition d'images, pourrait venir compléter et affiner la détermination semi-automatisée de la structure des communautés phytoplanctoniques (notamment pour le groupe du microphytoplancton). Certains CytoSense sont équipés d'une caméra permettant de prendre en photo les cellules microphytoplanctoniques mais cette caméra ne peut être utilisée comme outil de comptage. Par contre à l'image de l'étude réalisée par Thyssen *et al.* (2014a), le système d'acquisition d'image incorporé au CytoSense peut être utile pour vérifier l'identité des cellules regroupées dans le cluster microphytoplancton. Par ailleurs, il existe différents types d'instruments automatisés spécialisés dans l'acquisition et l'analyse d'images tels que le FlowCAM (Buskey et Hyatt, 2006) ou l'ImagingFlowCytoBot (Olson et Sosik, 2007) qui permettent l'enregistrement d'images de toutes les cellules présentes en haute fréquence (Sosik et Olson 2007) allant même jusqu'à détecter une efflorescence de Dinophysis (Swanson *et al.*, 2010). Cependant la reconnaissance automatique des cellules reste encore un exercice difficile avec ce type d'instrument et des taux d'erreur allant jusqu'à 100% peuvent être atteints selon les espèces. Des travaux sont en cours de réalisation (Denis, 2014) dans le cadre du projet FlowCAM PhytoImage afin de réduire ce taux d'erreur. Pour l'heure, une validation par un opérateur est donc encore nécessaire limitant l'intérêt de l'automatisation. Ces différentes techniques d'analyse d'images présentent un fort intérêt pour la détection et le comptage des cellules coloniales ou en chaînes.

Des études ont été engagées dans ce sens afin, d'exploiter les profils optiques spécifiques aux cellules issus du CytoSense (Rutten *et al.*, 2005 ; Caillault *et al.*, 2009 ; Wacquet *et al.*, 2011 ; Malkassian *et al.*, 2011 ;) et automatiser la reconnaissance des différents groupes phytoplanctoniques. L'exploitation des résultats de Rutten a notamment permis de créer un logiciel (EasyClus[®]), logiciel amélioré au cours du projet DYMAPHY, qui se base sur une clusterisation manuelle non supervisée à l'origine, puis bénéficiant des identifications de clusters comme base d'apprentissage (machine-learning). De même, dans le cadre du projet DYMAPHY, les chercheurs du LISIC ont également pu développer des outils informatiques et logiciels (GUI R-toolbox) discriminant plus finement les particules phytoplanctoniques. Le procédé d'identification proposé par le LISIC se base sur différents type d'approches : non supervisée, supervisée, semi-supervisée. Pour les approches semi- et supervisée, l'expertise des collègues des différents laboratoires impliqués dans DYMAPHY, a permis au cours de différents exercices d'intercalibrages et workshops d'étiqueter des profils optiques, c'est-à-

dire attribuer à l'ensemble des différents profils optiques une nomenclature (*P.globosa*, Cryptophytes, sédiments, bulle d'air, etc) afin d'établir une bibliothèque de profils destinée à être enrichie et comparée aux futurs profils enregistrés. Pour la méthode non supervisée, les profils optiques sont comparés via une mesure de similarité et permettent ainsi une classification automatisée. Cet outil en cours de développement atteint des scores de ressemblances avec une clusterisation manuelle supérieure à 80%. Ce type de logiciel pourrait donner accès à la composition du phytoplancton en temps réel, élargissant ainsi le cadre de la cytométrie à la mise en place de stations d'observation pouvant alerter de la présence d'un groupe d'intérêt (espèces toxiques).

La cytométrie en flux utilisée à haute résolution nous a permis de caractériser chaque cellule par son profil optique enregistré (pulse-shape recording). Cette technique, couplée avec des techniques d'enregistrement de paramètres hydrologiques et biogéochimiques à haute fréquence, ainsi qu'à des systèmes d'acquisition d'images des particules à haute fréquence et avec des techniques de séquençage *in situ* comme « l'Autonomous Microbial Genosensor » (Fries *et al.*, 2007) ou « l'Environmental Sample Processor » (Scholin *et al.*, 2009), permettrait d'appréhender la dynamique du phytoplancton à des échelles spatiales et temporelles ainsi qu'à des résolutions taxonomiques de plus en plus fines. Les résultats obtenus montrent, bien qu'il s'agisse d'une technique ataxonomique, que la cytométrie en flux est un outil puissant permettant d'étudier la variabilité spatio-temporelle du phytoplancton et de comprendre quels forçages environnementaux influencent la structure des communautés

Références

- Alongi, D.M. (1998). Coastal ecosystem processes. *CRC Marine Science Series*, 3. CRC Press: Boca Raton. 419 pp.
- Alvain, S., Moulin, C., Dandonneau, Y., & Bréon, F. M. (2005). Remote sensing of phytoplankton groups in case 1 waters from global SeaWiFS imagery. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 52(11), 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(3).
- Aminot, A., & Kérouel, R. (2004). *Hydrologie des écosystèmes marins: paramètres et analyses*. Editions Quae.
- Anneville, O., Souissi, S., Ibanez, F., Ginot, V., Druart, J. C., & Angeli, N. (2002). Temporal mapping of phytoplankton assemblages in Lake Geneva: annual and interannual changes in their patterns of succession. *Limnology and Oceanography*, 47(5), 1355-1366.
- Ansotegui, A., Sarobe, A., Trigueros, J. M., Urrutxurtu, I., & Orive, E. (2003). Size distribution of algal pigments and phytoplankton assemblages in a coastal—estuarine environment: contribution of small eukaryotic algae. *Journal of Plankton Research*, 25(4), 341-355.
- Azam F, Smith DC, Steward GF, Hagström Å (1993) Bacteriaorganic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microb Ecol* 28:167–179.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series*, 10(3), 257-263.
- Behrenfeld, M. J., & Falkowski, P. G. (1997). Photosynthetic rates derived from satellite-based chlorophyll concentration. *Limnology and oceanography*, 42(1), 1-20.
- Bentley, D., Lafite, R., Morley, N. H., James, R., Statham, P. J., Guarý, J. C. (1993). Nutrient fluxes between the English Channel and the North Sea. Actual situation and evolution since ten years. *Oceanologica Acta*, 16(5-6), 599-606.
- Beutler, M., Wiltshire, K. H., Meyer, B., Moldaenke, C., Lüring, C., Meyerhöfer, M., Hansen, H.P., Dau, H. (2002a). A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. *Photosynthesis Research*, 72(1), 39-53.
- Beutler, M., Wiltshire, K. H., Luring, C., Moldaenke, C., Lohse, D. (2002b). Fluorometric depth-profiling of chlorophyll corrected for yellow substances. *ACTES DE COLLOQUES-IFREMER*, 231-238.
- Blanchot, J., ssAndré, J.-M., Navarette, C., Neveux, J. (1997). Picophytoplankton dynamics in the equatorial Pacific: diel cycling from flow-cytometer observations. *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. III - Sci. Vie*, 320, 925–931.
- Breton, E., Brunet, C., Sautour, B., Brylinski, J.M. (2000). Annual variations of phytoplankton biomass in the Eastern English Channel: comparison by pigment signatures and microscopic counts. *Journal of Plankton Research*, 22(8), 1423-1440.
- 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.

- 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.
- 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.
- Buskey, E. J., & Hyatt, C. J. (2006). Use of the FlowCAM for semi-automated recognition and enumeration of red tide cells (*Karenia brevis*) in natural plankton samples. *Harmful Algae*, 5(6), 685-692.
- Caillault, É., Hébert, P. A., & Wacquet, G. (2009). Dissimilarity-based classification of multidimensional signals by conjoint elastic matching: Application to phytoplanktonic species recognition. In *Engineering Applications of Neural Networks* (pp. 153-164). Springer Berlin Heidelberg.
- Caron, D. A., Goldman, J. C., Andersen, O. K., Dennett, M. R. (1985). Nutrient cycling in a microflagellate food chain. 2. Population dynamics and carbon cycling. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 24(3), 243-254.
- Cassie, R. M. (1963). Microdistribution of plankton. *Oceanography and marine biology: an annual review*, 1.
- Charpy-Roubaud, C., Charpy, L. J., & Maestrini, S. Y. (1982). Fertilité des eaux côtières nord-patagoniques: facteurs limitant la production du phytoplancton et potentialités d'exploitation mytilicole. *Oceanologica Acta*, 5(2), 179-188.
- Chisholm, S. W., Frankel, S. L., Goericke, R., Olson, R. J., Palenik, B., Waterbury, J. B., West-Johnsrud, L., Zettler, E. R. (1992). *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll a and b. *Archives of Microbiology*, 157(3), 297-300.
- Cloern, J. E. (2001). Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine ecology progress series*, 210, 223-253.
- Collier, J. L. (2000). Flow cytometry and the single cell in phycology. *Journal of Phycology*, 36(4), 628-644.
- Corzo, A., Jiménez-Gómez, F., Gordillo, F. J. L., Garcia-Ruiz, R., Niell, F. X. (1999). *Synechococcus* and *Prochlorococcus*-like populations detected by flow cytometry in a eutrophic reservoir in summer. *Journal of Plankton Research*, 21(8), 1575-1581.
- Courties, C., Vaquer, A., Trousselier, M., Lautier, J., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Neveux, J., Machado, C., Claustre, H. (1994). Smallest eukaryotic organism. *Nature*, 370, 255.
- De La Rocha, C. L. (2006). In H. Elderfield [ed.], *The oceans and marine geochemistry*. Elsevier. The biological pump, p. 83–111.
- Denis, K. (2014) Improvement and use of supervised classification applied to plankton digital images in Zoo/PhytoImage: (real-time) study of plankton communities in the North Sea. Ph.D thesis, Université de Mons, 350 pp.

- Diaz, S., Hodgson, J. G., Thompson, K., Cabido, M., Cornelissen, J. H. C., Jalili, A., Montserrat-Martí, G., Grime, J.P., Zarrinkamar, F., Asri, Y., Band, S.R., Basconcelo, S., Castro-Díez, P., Funes, G., Hamzehee, B., Khoshnevi, M., Pérez-Harguindeguy, N., Pérez-Rontomé, M.C., Shirvany, F.A., Vendramini, F., Yazdani, S., Abbas-Azimi, R., Bogaard, A., Boustani, S., Charles, M., Dehghan, M., de Torres-Espuny, L., Falczuk, V., Guerrero-Campo, J., Hynd, A., Jones, G., Kowsary, E., Kazemi-Saeed, F., Maestro-Martínez, M., Romo-Díez, A., Shaw, S., Siavash, B., Villar-Salvador, P., Zak, M.R. (2004). The plant traits that drive ecosystems: evidence from three continents. *Journal of vegetation science*, 15(3), 295-304.
- Dickey, T.D. (2003). Emerging ocean observations for interdisciplinary data assimilation systems. *Journal of Marine Systems*, 40, 5-48.
- Dubelaar, G. B., Geerders, P. J., Jonker, R. R. (2004). High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics. *Journal of Environmental Monitoring*, 6(12), 946-952.
- Dubelaar, G.B.J., Gerritzen, P.L. (2000). CytoBuoy: a step forwards using flow cytometry in operational oceanography. *Scientia Marina*, 64, 255-265.
- Dubelaar, G.B.J., Gerritzen, P.L., Beeker, A. E., Jonker, R. R., Tangen, K. (1999). Design and first results of CytoBuoy: A wireless flow cytometer for in situ analysis of marine and fresh waters. *Cytometry*, 37(4), 247-254.
- Dugenne, M., Thyssen, M., Nerini, D., Mante, C., Poggiale, J. C., Garcia, N., Garcia, F., Grégori, G. J. (2014). Consequence of a sudden wind event on the dynamics of a coastal phytoplankton community: an insight into specific population growth rates using a single cell high frequency approach. *Frontiers in microbiology*, 5, 485.
- Edwards, K.F., Litchman, E., Klausmeier, C.A. (2013). Functional traits explain phytoplankton community structure and seasonal dynamics in a marine ecosystem. *Ecology letters*, 16, 56–63.
- Edwards, K.F., Thomas, M.K., Klausmeier, C.A., Litchman, E. (2012). Allometric scaling and taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 57, 554–566.
- Edwards, K. F., Klausmeier, C. A., Litchman, E. (2011). Evidence for a three-way trade-off between nitrogen and phosphorus competitive abilities and cell size in phytoplankton. *Ecology*, 92(11), 2085-2095.
- Eker-Develi, E., Berthon, J. F., Canuti, E., Slabakova, N., Moncheva, S., Shtereva, G., & Dzhurova, B. (2012). Phytoplankton taxonomy based on CHEMTAX and microscopy in the northwestern Black Sea. *Journal of Marine Systems*, 94, 18-32.
- Eyre, B.D. (1994) *Nutrient behaviour in the tropical Moresby River-Estuary system North Queensland, Australia. Thesis (Ph.D.) Queensland University of Technology, Brisbane.*
- Falkowski, P.G., & Raven, J.A. (2007). *Aquatic photosynthesis*. Second edition. Princeton
- Falkowski, P., & Kiefer, D. A. (1985). Chlorophyll a fluorescence in phytoplankton: relationship to photosynthesis and biomass. *Journal of Plankton Research*, 7(5), 715-731.
- Fenchel, T. (1988). Marine plankton food chains. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19-38.
- Fenchel, T. (1982). Ecology of heterotrophic microflagellates. IV. Quantitative occurrence and importance as bacterial consumers *Marine ecology progress series*, 9(1), 35-42.

- Fontana, S., Jokela, J., & Pomati, F. (2014). Opportunities and challenges in deriving phytoplankton diversity measures from individual trait-based data obtained by scanning flow-cytometry. *Frontiers in microbiology*, 5.
- Foss, P., Guillard, R. R., Liaaen-Jensen, S. (1984). Prasinoxanthin - a chemosystematic marker for algae. *Phytochemistry*, 23(8), 1629-1633.
- Fries, D., Paul, J., Smith, M., Farmer, A., Casper, E., & Wilson, J. (2007). The Autonomous microbial genosensor, an in situ sensor for marine microbe detection. *Microscopy and Microanalysis*, 13(S02), 514-515.
- FURNAS, M., & CROSBIE, N. D. (1999). In situ growth dynamics of the photosynthetic prokaryotic picoplankters *Synechococcus* and *Prochlorococcus*. *Bulletin de l'Institut océanographique*, 387-417.
- Furnas, M. J. (1991). Net in situ growth rates of phytoplankton in an oligotrophic, tropical shelf ecosystem. *Limnology and Oceanography*, 36(1), 13-29.
- Garcia-Soto, C., & Pingree, R. D. (2009). Spring and summer blooms of phytoplankton (SeaWiFS/MODIS) along a ferry line in the Bay of Biscay and western English Channel. *Continental Shelf Research*, 29(8), 1111-1122.
- 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.
- Gitay, H., Noble, I. R., Connell, J. H. (1999). Deriving functional types for rain-forest trees. *Journal of Vegetation Science*, 10(5), 641-650.
- Goericke, R., & D. J. Repeta. (1993). Chlorophylls a and b and divinyl chlorophylls a and b in the open subtropical North Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 101, 307-307.
- Gómez, F., & Souissi, S. (2007). Unusual diatoms linked to climatic events in the northeastern English Channel. *Journal of Sea Research*, 58(4), 283-290.
- Grattepanche, J. D., Vincent, D., Breton, E., Christaki, U. (2011). Microzooplankton herbivory during the diatom–Phaeocystis spring succession in the eastern English Channel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 404(1), 87-97.
- 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.
- Grime, J. P. (1998). Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *Journal of Ecology*, 86(6), 902-910.
- Guegueniat, P., du Bois, P. B., Salomon, J. C., Masson, M., Cabioch, L. (1995). FLUXMANCHE radiotracers measurements: a contribution to the dynamics of the English Channel and North Sea. *Journal of Marine Systems*, 6(5), 483-494.
- Guilloux, L., Rigaut-Jalabert, F., Jouenne, F., Ristori, S., Viprey, M., Not, F., Vaultot, D., & Simon, N. (2013). An annotated checklist of Marine Phytoplankton taxa at the SOMLIT-Astan time series off Roscoff (Western English Channel, France): data collected from 2000 to 2010. *Cah Biol Mar*, 54, 247-256.
- Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there?. *Journal of phycology*, 48(5), 1057-1063.

- Guiselin, N. (2010). Etude de la dynamique des communautés phytoplanctoniques par microscopie et cytométrie en flux, en eaux côtières de la Manche orientale. Thèse de doctorat, Université du littoral côte d'opale: 190 pp.
- Harris, G. P. (1980). Temporal and spatial scales in phytoplankton ecology. Mechanisms, methods, models, and management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(5), 877-900.
- Havens, K. E. (2008). Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. In *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs* (pp. 733-747). Springer New York.
- Hernández-Fariñas, T., Soudant, D., Barillé, L., Belin, C., Lefebvre, A., Bacher, C., 2013. Temporal changes in the phytoplankton community along the French coast of the eastern English Channel and the southern Bight of the North Sea. *ICES J. Mar. Sci. J. Cons.* 71, 821-833.
- Holm-Hansen, O., & Booth, C. R. (1966). THE MEASUREMENT OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE IN THE OCEAN AND ITS ECOLOGICAL SIGNIFICANCE1. *Limnology and Oceanography*, 11(4), 510-519.
- Houliez, E., Lizon, F., Artigas, L. F., Lefebvre, S., Schmitt, F. G. (2013). Spatio-temporal variability of phytoplankton photosynthetic activity in a macrotidal ecosystem (the Strait of Dover, eastern English Channel). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 129, 37-48.
- Houliez, E., Lizon, F., Thyssen, M., Artigas, L.F., Schmitt, F.G., (2012). Spectral fluorometric characterization of Haptophyte dynamics using the FluoroProbe: an application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *Journal of Plankton Research*, 34, 136–151.
- Houliez, E. (2012) Contrôle de l'activité photosynthétique du phytoplancton en milieu côtier : utilisation de la fluorescence spectrale et de la fluorimétrie modulée. Thèse de doctorat. Université de Lille 1: 336pp.
- Jacobsen, A., & Veldhuis, M. J. (2005). Growth characteristics of flagellated cells of *Phaeocystis pouchetii* revealed by diel changes in cellular DNA content. *Harmful Algae*, 4(5), 811-821.
- Jacquet, S., Prieur, L., Avois-Jacquet., C, Lennon, J-F., Vaulot, D. (2002). Short-timescale variability of picophytoplankton abundance and cellular parameters in surface waters of the Alboran Sea (western Mediterranean). *Journal of Plankton Research*, 24, 635-651
- Jeffrey, S.W., Wright, S.W., Zapata, M. (2011). Microalgal classes and their signature pigments, *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*, Cambridge University Press, S Roy, C A. Llewellyn, ES Egeland and G Johnsen (ed), United Kingdom, pp. 3-77.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. (1997). *Phytoplankton pigments in oceanography*. Unesco, Paris: 661 pp.
- Jeffrey, S. W. (1968). PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS OF THE PHYTOPLANKTON OF SOME CORAL REEF WATERS1. *Limnology and Oceanography*, 13(2), 350-355.

- Jeffrey, S. W. (1961). Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochemical journal*, 80(2), 336.
- Jochem, F. J. (1999). Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate. *Marine biology*, 135(4), 721-728.
- Klaveness, D. (1985). Classical and Modern Criteria for Determining Species of Cryptophyceae"" 3J. *Bulletin of Plankton Society of Japan*, 32(2), 111-123.
- Kirk, J. T. O. (1994). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge university press.
- Kruk, C., Huszar, V.L.M., Peeters, E.T.H.M., Bonilla S., Costa L., Lurling M., Reynolds C.S, Scheffer, M. (2010). A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology* 55, 614–627.
- Lampert, L. (2014). CHEMOTAXONOMIE PIGMENTAIRE-Initiation aux calculs appliqués au phytoplancton. *Rapport Ifremer*.
- Lamy, D., Obernosterer, I., Laghdass, M., Artigas, F., Breton, E., Grattepanche, J., 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. *Aquat. Microb. Ecol.*, 58, 95–107.
- Langdon, C. 1988. On the causes of interspecific differences in the growth-irradiance relationship for phytoplankton. II. A general review. *J. Plankton Res.* 10:1291–1312
- Lavorel, S., & Garnier, E. (2002). Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional ecology*, 16(5), 545-556.
- Lefebvre, A., Guiselin, N., Barbet, F., & Artigas, F. L. (2011). Long-term hydrological and phytoplankton monitoring (1992–2007) of three potentially eutrophic systems in the eastern English Channel and the Southern Bight of the North Sea. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 68(10), 2029-2043.
- 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*.
- Liere, L. V., & Walsby, A. E. (1982). Interactions of cyanoibacteria with light. *Botanical monographs*.
- Litchman, E., & Klausmeier, C.A. 2008. Trait-based community ecology of phytoplankton. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39, 615–639
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., Schofield, OM., Falkowski, P.G. 2007. The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. *Ecology letters* 10, 1170–81.
- Litchman, E., & Klausmeier, C. A. (2001). Competition of phytoplankton under fluctuating light. *The American Naturalist*, 157(2), 170-187.
- Lizon, F., Seuront, L., Lagadeuc, Y. (1998). Photoadaptation and primary production study in tidally mixed coastal waters using a Lagrangian model. *Marine Ecology Progress Series*, 169, 43-54.
- Longhurst, A., Sathyendranath, S., Platt, T., Caverhill, C. (1995). An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. *Journal of Plankton Research*, 17(6), 1245-1271.

- Lorenzen, C. J. (1966). A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. In *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* (Vol. 13, No. 2, pp. 223-227). Elsevier.
- Mackey, M.D., Higgins, H.W., Mackey, D.J., Wright, S.W. (1997) CHEMTAX user's manual: a program for estimating class abundances from chemical markers—application to HPLC measurements of phytoplankton pigments. CSIRO Marine Laboratories Report 229, Hobart.
- Mackey, M. D., Mackey, D. J., Higgins, H. W., Wright, S. W. (1996). CHEMTAX—a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 144, 265-283.
- Malkassian, A., Nerini, D., van Dijk, M. A., Thyssen, M., Mante, C., Gregori, G. (2011). Functional analysis and classification of phytoplankton based on data from an automated flow cytometer. *Cytometry part A*, 79(4), 263-275.
- Mantoura, R. F. C., & Llewellyn, C. A. (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.
- Margalef, R. (1978). Life forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta*, 1, 493-509.
- Marie, D., Shi, X.L., Rigaut-Jalabert, F., Vaultot, D., (2010). Use of flow cytometric sorting to better assess the diversity of small photosynthetic eukaryotes in the English Channel. *FEMS Microbiology Ecology*, 72, 165–178.
- Marie, D., Simon, N., & Vaultot, D. (2005). Phytoplankton cell counting by flow cytometry. *Algal culturing techniques*, 3, 253.
- McGill, B. J., Enquist, B. J., Weiher, E., Westoby, M. (2006). Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in ecology & evolution*, 21(4), 178-185.
- Menden-Deuer, S., Lessard, E. J., Satterberg, J. (2001). Effect of preservation on dinoflagellate and diatom cell volume and consequences for carbon biomass predictions. *Marine Ecology Progress Series*, 222, 41-50.
- Milo, R. (2009). What governs the reaction center excitation wavelength of photosystems I and II?. *Photosynthesis research*, 101(1), 59-67.
- Monchy, S., Grattepanche, J. D., Breton, E., Meloni, D., Sancier, G., Chabé, M., Delhaes, L., Viscogliosi, E., Sime-Ngando, T., & Christaki, U. (2012). Microplanktonic community structure in a coastal system relative to a Phaeocystis bloom inferred from morphological and tag pyrosequencing methods. *PloS one*, 7(6)
- Moon-van der Staay, S. Y., De Wachter, R., & Vaultot, D. (2001). Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 409(6820), 607-610.
- Mühling, M., Fuller, N. J., Millard, A., Somerfield, P. J., Marie, D., Wilson, W. H., Scanlan, D. J., Post, A. F., Joint, I. and Mann, N. H. (2005), Genetic diversity of marine *Synechococcus* and co-occurring cyanophage communities: evidence for viral control of phytoplankton. *Environmental Microbiology*, 7: 499–508.

- Muylaert, K., Gonzales, R., Franck, M., Lionard, M., Van der Zee, C., Cattrijsse, A., ... & Vyverman, W. (2006). Spatial variation in phytoplankton dynamics in the Belgian coastal zone of the North Sea studied by microscopy, HPLC-CHEMTAX and underway fluorescence recordings. *Journal of Sea Research*, 55(4), 253-265.
- Not, F., Latasa, M., Marie, D., Cariou, T., Vaulot, D., & Simon, N. (2004). A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the Western English Channel. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4064-4072.
- Olson, R.J., Sosik, H.M. (2007). A submersible imaging-in-flow instrument to analyze nano- and microplankton. Imaging FlowCytobot. *Limnology and Oceanography: Methods*, 5, 195-203.
- Olson, R.J., Shalapyonok A., Sosik, H.M. (2003). An automated submersible flow cytometer for analyzing pico- and nanophytoplankton: FlowCytobot. *Deep Sea Research I*, 50, 301-315.
- Olson, R. J., Zettler, E. R., Anderson, O. K. (1989). Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry*, 10(5), 636-643.
- Olson, R. J., Chisholm, S. W., Zettler, E. R., Armbrust, E. V. (1988). Analysis of *Synechococcus* pigment types in the sea using single and dual beam flow cytometry. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 35(3), 425-440.
- Owen, R. W. (1989). Microscale and finescale variations of small plankton in coastal and pelagic environments. *Journal of Marine Research*, 47(1), 197-240.
- Peperzak, L., Gollasch, S., Net, R. (2014). NIOZ Flow Cytometer Workshop Report.
- Platt, T. (1986). Primary production of the ocean water column as a function of surface light intensity: algorithms for remote sensing. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 33(2), 149-163.
- Pomati, F., Kraft, N. J., Posch, T., Eugster, B., Jokela, J., & Ibelings, B. W. (2013). Individual cell based traits obtained by scanning flow-cytometry show selection by biotic and abiotic environmental factors during a phytoplankton spring bloom. *PloS one*, 8(8), e71677.
- Quéguiner B. 2013. Structure et Fonctionnement des Ecosystèmes Pélagiques Marins. Centre d'Océanologie de Marseille, Aix-Marseille Université ; CNRS ; LOBUMR 6535, Laboratoire d'Océanographie et de Biogéochimie, OSU/Centre d'Océanologie de Marseille, 93 pp.
- Quisthoudt, C. (1987). Production primaire phytoplanktonique dans le détroit du Pays-de-Calais (France): variations spatiales et annuelles au large du Cap Gris-Nez. *Comptes rendus de l'Académie des sciences, Série 3, Sciences de la vie*, 304(10), 245-250.
- Rantajärvi, E., Olsonen, R., Hällfors, S., Leppänen, J. M., & Raateoja, M. (1998). Effect of sampling frequency on detection of natural variability in phytoplankton: unattended high-frequency measurements on board ferries in the Baltic Sea. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 55(4), 697-704.
- Rassoulzadegan, F., & Sheldon, R. W. (1986). Predator-prey interactions of nanozooplankton and bacteria in an oligotrophic marine environment1. *Limnology and Oceanography*, 31(5), 1010-1029.

- Raven, J. A., Finkel, Z. V., Irwin, A. J. (2005). Picophytoplankton: bottom-up and top down controls on ecology and evolution. *Vie et Milieu*, 55(3-4), 209-215.
- Redfield A.C., Ketchum, B.H., Richards, F.A. (1963). The influence of organisms on composition of seawater. *The Sea*, 2, 26-77.
- Reynolds, C.S., 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.
- Reynolds, C.S. (1984). *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University press.
- Reynolds, C.S. (1980). Phytoplankton assemblages and their periodicity in stratifying lake systems. *Holarctic Ecology* 3, 141-159.
- Richardson, K., Beardall, J., Raven, J.A. (1983). Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytologist*, 93, 157-191.
- Rothschild, B. J., & Osborn, T. R. (1988). Small-scale turbulence and plankton contact rates. *Journal of Plankton Research*, 10(3), 465-474.
- 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.
- Rousseeuw, K., Caillaud, E. P., Lefebvre, A., & Hamad, D. (2013). Monitoring system of phytoplankton blooms by using unsupervised classifier and time modeling. In *2013 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium-IGARSS*.
- Roy, S., Llewellyn, C. A., Egeland, E. S., & Johnsen, G. (Eds.). (2011). *Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge University Press.
- Ruser, A., Popp, P., Kolbowski, J., Reckermann, M., Feuerpfeil, P., Egge, B., Reineke, C., Vanselow, K. H. (1999). Comparison of chlorophyll-fluorescence-based measuring systems for the detection of algal groups and the determination of chlorophyll-a concentrations. In *Workshop at the FTZ Büsum from October* (Vol. 5, No. 8).
- Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T., (2005). Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: A successful approach? *Cytometry Part A*, 64A, 16-26.
- Salomon, J.-C., Breton, M. (1993). An atlas of long-term currents in the Channel. *Oceanologica Acta*, 16, 439-448.
- Sarmiento, J. L., & Sundquist, E. T. (1992). Revised budget for the oceanic uptake of anthropogenic carbon dioxide. *Nature*, 356(6370), 589-593.
- 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.
- 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(1), 27-38.

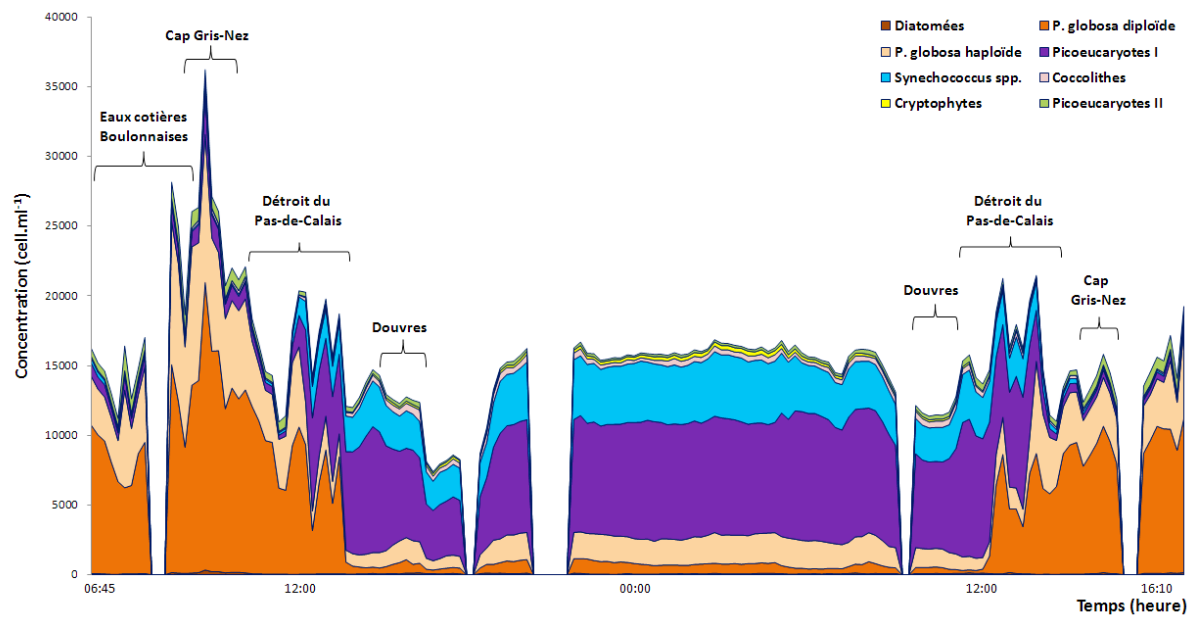
- Scholin, C., G. Doucette, S. Jensen, B. Roman, D. Pargett, R. Marin III, C. Preston, W. Jones, J. Feldman, C. Everlove, A. Harris, N. Alvarado, E. Massion, J. Birch, D. Greenfield, R. Vrijenhoek, C. Mikulski, and K. Jones. 2009. Remote detection of marine microbes, small invertebrates, harmful algae, and biotoxins using the Environmental Sample Processor (ESP). *Oceanography* 22(2):158–167.
- Schwaderer, A. S., K. Yoshiyama, P. T. Pinto, N. G. Swenson, C. A. Klausmeier, and E. Litchman. 2011. Eco-evolutionary differences in light utilization traits and distributions of freshwater phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 56: 589–598.
- Shapiro, H. M. (2003) *Practical Flow Cytometry*, 4th ed. Wiley-Liss, Hoboken, NJ.
- Sentchev, A., & Korotenko, K. (2007). Modelling distribution of flounder larvae in the eastern English Channel: sensitivity to physical forcing and biological behaviour. *Marine Ecology Progress Series*, 347, 233-245.
- Sentchev, A., & Korotenko, K. (2005). Dispersion processes and transport pattern in the ROFI system of the eastern English Channel derived from a particle-tracking model. *Continental shelf research*, 25(18), 2294-2308.
- Sentchev, A., & Yaremchuk, M. (2007). VHF radar observations of surface currents off the northern Opal coast in the eastern English Channel. *Continental Shelf Research*, 27(19), 2449-2464.
- Seymour, J. R., Mitchell, J. G., Pearson, L., Waters, R. L. (2000). Heterogeneity in bacterioplankton abundance from 4.5 millimetre resolution sampling. *Aquatic Microbial Ecology*, 22(2), 143-153.
- Sieburth, J. M., Smetacek, V., Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions 1. *Limnology and oceanography*, 23(6), 1256-1263.
- Smayda, T. J. (1998). Patterns of variability characterizing marine phytoplankton, with examples from Narragansett Bay. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 55(4), 562-573.
- Sommer, U., Aberle, N., Lengfellner, K., Lewandowska, A. (2012). The Baltic Sea spring phytoplankton bloom in a changing climate: an experimental approach. *Marine biology*, 159(11), 2479-2490.
- Sotton, B., Guillard, J., Bony, S., Devaux, A., Domaizon, I., Givaudan, N., Crespeau, F., Huet, H., Anneville, O. (2012). Impact of toxic cyanobacterial blooms on Eurasian perch (*Perca fluviatilis*): experimental study and in situ observations in a peri-alpine lake. *PloS one*, 7(12), e52243.
- Sournia, A. (1995). Red-tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: An inquiry into biodiversity. In *Harmful marine algal blooms. Proc. 6th Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton*. Lavoisier, 103-112.
- Sosik, H. M., & Olson, R. J. (2007). Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry. *Limnology and Oceanography: Methods*, 5(6), 204-216.
- Swanson, K. M., Flewelling, L. J., Byrd, M., Nunez, A., & Villareal, T. A. (2010). The 2008 Texas *Dinophysis ovum* bloom: Distribution and toxicity. *Harmful Algae*, 9(2), 190-199.

- Swertz, O. C., Colijn, F., Hofstraat, H. W., & Althuis, B. A. (1999). Temperature, salinity, and fluorescence in Southern North Sea: high-resolution data sampled from a ferry. *Environmental management*, 23(4), 527-538.
- Tett, P., & Barton, E. D. (1995). Why are there about 5000 species of phytoplankton in the sea?. *Journal of Plankton Research*, 17(8), 1693-1704.
- Thebaud, O., Veron, G., Fifas, S. (2005). Incidences des épisodes d'efflorescences de micro algues toxiques sur les écosystèmes et sur les pêcheries de coquillages en baie de Douarnenez. *Rapport Ifremer*.
- Trousselier M., Courties C., Zettelmaier S. (1995). Flow cytometric analysis of coastal lagoon bacterioplankton and picophytoplankton: fixation and storage effects. *Estuarine Coast. Shelf Sci.* 40, 621–633
- Thronsdon, J. (1978). Preservation and Storage. In: Sournia, A.(Ed.), *Phytoplankton Manual. Monographs on oceanographic methodology* 6. Unesco, Paris: pp. 69-74.
- Thyssen, M., Alvain, S., Lefebvre, A., Dessailly, D., Rijkeboer, M., Guiselin, N., Creach, V., & Artigas, L. F. (2014a). Phytoplankton community structure in the North Sea: coupling between remote sensing and automated in situ analysis at the single cell level. *Biogeosciences Discussions*, 11(11), 15621-15662.
- Thyssen, M., Grégori, G. J., Grisoni, J. M., Pedrotti, M. L., Mousseau, L., Artigas, L. F., Marro, S., Garcia, N., Passafiume, O., Denis, M. J. (2014b). Onset of the spring bloom in the northwestern Mediterranean Sea: influence of environmental pulse events on the in situ hourly-scale dynamics of the phytoplankton community structure. *Frontiers in microbiology*, 5, 387.
- 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.
- Thyssen, M., Mathieu, D., Garcia, N., Denis, M. (2008). Short-term variation of phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged flow cytometer. *Journal of Plankton Research*, 30(9), 1027-1040.
- Thyssen, M. (2008). Analyse à haute fréquence spatiale et temporelle du phytoplancton à l'aide de la cytométrie en flux automatisée et immergeable. Thèse de doctorat, Université de la Méditerranée: 203 pp.
- Tillmann, U., & Rick, H. J. (2003). North Sea phytoplankton: a review. *Senckenbergiana maritima*, 33(1-2), 1-69.
- Tilman, D., Kilham, S. S., Kilham, P. (1982). Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 349-372.
- Tréguer, P., & Le Corre, P. (1975). *Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer: utilisation de l'Autoanalyser II Technicon (R)*. Université de Bretagne occidentale.
- Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*. 9, 1-39.
- Utermöhl, H. (1931). Über das umgekehrte Mikroskop. *Arch. hydrobiol*, 22, 643-645.

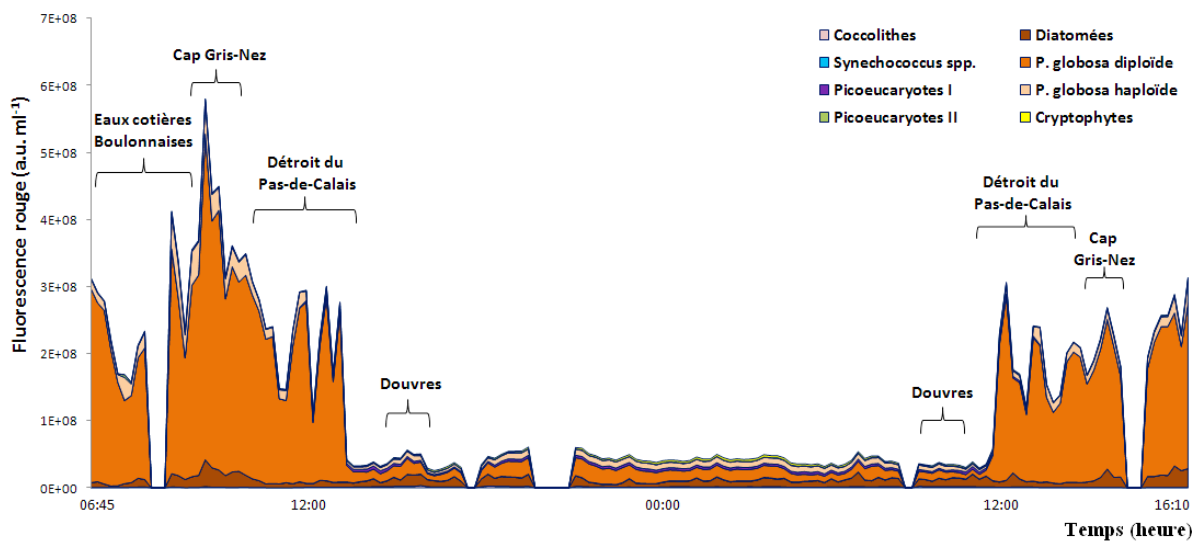
- Uysal, Z. and Köksalan, İ. (2006), The annual cycle of *Synechococcus* (cyanobacteria) in the northern Levantine Basin shelf waters (Eastern Mediterranean). *Marine Ecology*, 27: 187–197.
- Vaulot, D., Marie, D., Olson, R. J., & Chisholm, S. W. (1995). Growth of *Prochlorococcus*, a photosynthetic prokaryote, in the equatorial Pacific Ocean. *Science*, 268(5216), 1480-1482.
- 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) 1. *Journal of Phycology*, 30(6), 1022-1035.
- Vaulot, D., & Xiuren, N. (1988). Abundance and cellular characteristics of marine *Synechococcus* spp. in the dilution zone of the Changjiang (Yangtze River, China). *Continental Shelf Research*, 8(10), 1171-1186.
- Von Dassow, P., van den Engh, G., Iglesias-Rodriguez, D., Gittins, J. R. (2012). Calcification state of Coccolithophores can be assessed by light scatter depolarization measurements with flow cytometry. *Journal of plankton research*, 34(12), 1011-1027.
- Veldhuis, M. J., & Kraay, G. W. (2000). Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Scientia Marina*, 64(2), 121-134.
- Velegakis, A. F., Michel, D., Collins, M. B., Lafite, R., Oikonomou, E. K., Dupont, J. P., Huault, M.F., Lecouturier, M., Salomon, J.C., Bishop, C. (1999). Sources, sinks and resuspension of suspended particulate matter in the eastern English Channel. *Continental Shelf Research*, 19(15), 1933-1957.
- Villeger, S. (2008). Dynamique de la diversité fonctionnelle des communautés de poissons (Lagune de Terminos, Mexique). These de Doctorat - Montpellier SupAgro.
- Violle, C., Navas, M. L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., & Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional!. *Oikos*, 116(5), 882-892.
- Wacquet, G., Hébert, P.-A., Caillaud, E., Hamad, D.: Semi-Supervised K-Way Spectral Clustering using Pairwise Constraints. In: NCTA, International Conference on Neural Computation Theory and Applications, pp. 72–81 (2011)
- Winter, D. F., Banse, K., Anderson, G. C. (1975). The dynamics of phytoplankton blooms in puget sound a fjord in the northwestern united states. *Marine Biology*, 29(2), 139-176.
- Wollschläger, J., Wiltshire, K. H., Petersen, W., & Metfies, K. (2015). Analysis of phytoplankton distribution and community structure in the German Bight with respect to the different size classes. *Journal of Sea Research*, 99, 83-96.
- Yentsch, C.S., Menzel, D.W. (1963). A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep Sea Research*, 10, 221-231.
- Zapata, M., Rodriguez, F., Garrido, J. L. (2000). Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series*, 195, 29-45.

- Zehr, J. P., Bench, S. R., Carter, B. J., Hewson, I., Niazi, F., Shi, T., Tripp, H.J., Affourtit, J. P. (2008). Globally distributed uncultivated oceanic N₂-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II. *Science*, 322(5904), 1110-1112.
- Zingone, A., & Enevoldsen, H. O. (2000). The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean & Coastal Management*, 43(8), 725-748.

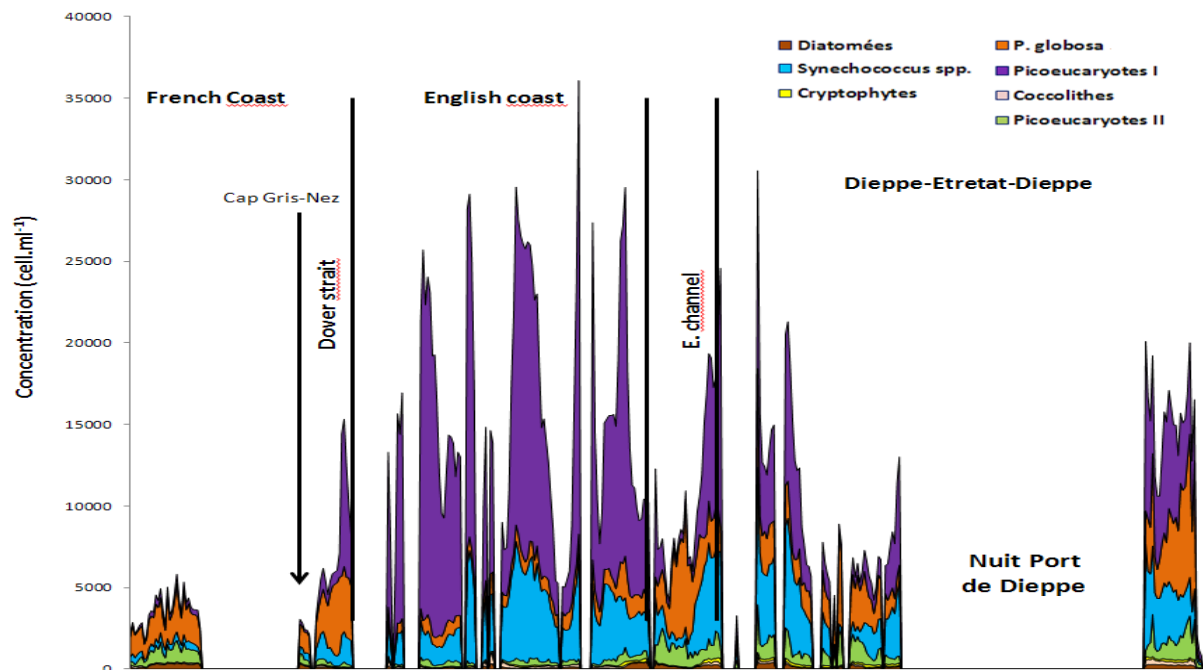
Annexes



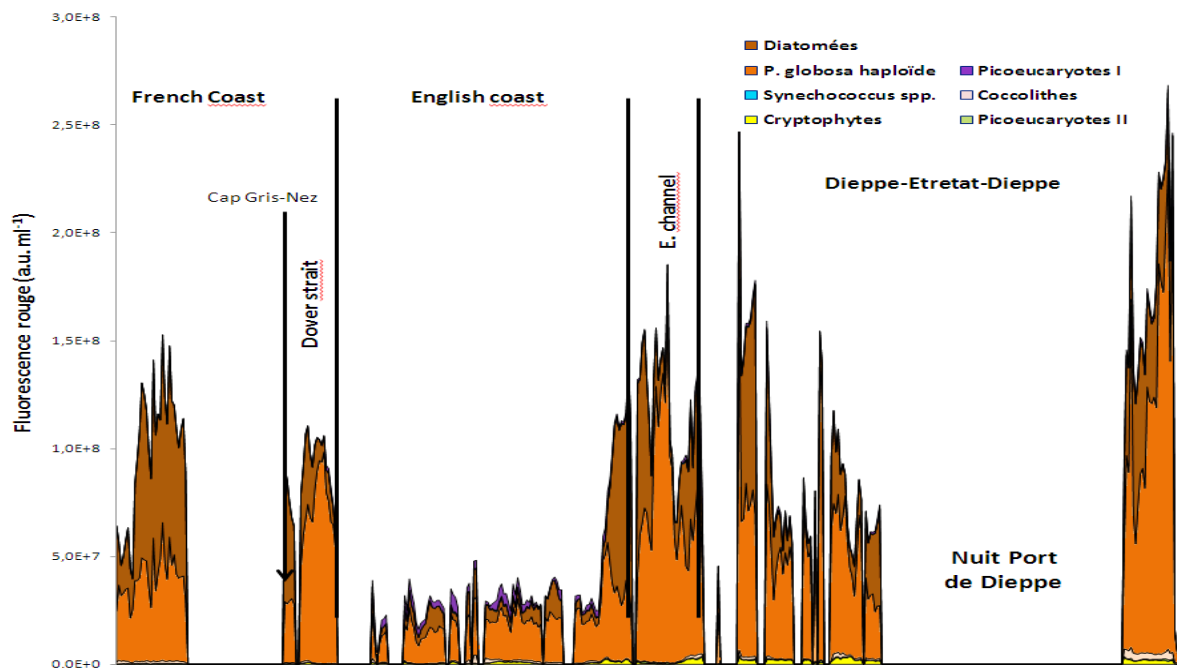
**Abondance mesurée en continu par cytométrie en flux au cours du Leg 1
des campagnes DYPHYMA (20-21 Avril 2012)**



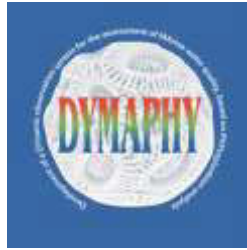
**Fluorescence rouge mesurée en continu par cytométrie en flux au cours du Leg 1
des campagnes DYPHYMA (20-21 Avril 2012)**



Abondance mesurée en continu par cytométrie en flux au cours du Leg 3
des campagnes DYPHYMA (31- 04 Juin 2012)



Fluorescence rouge mesurée en continu par cytométrie en flux au cours du Leg 1
des campagnes DYPHYMA (31- 04 Juin 2012)

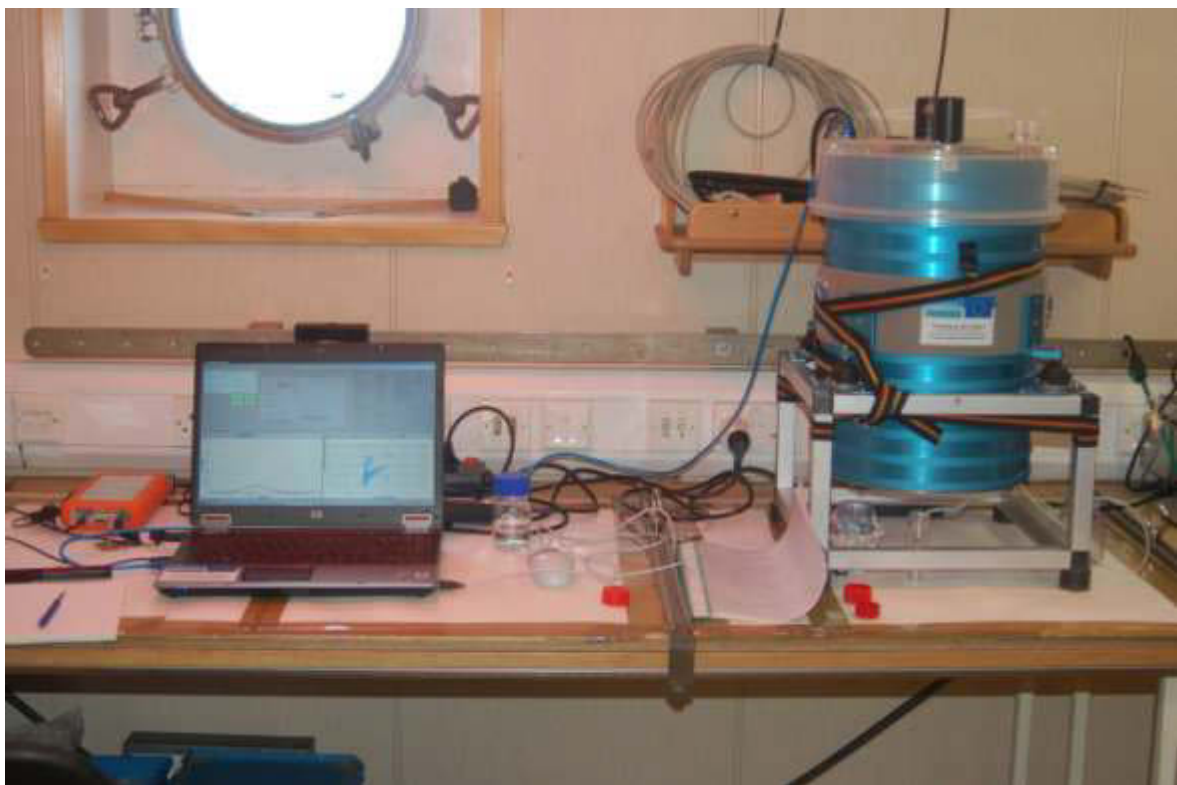


INTERREG IVA 2 Mers Seas Zeeën Crossborder Cooperation Programme 2007-2013

DYNAMAPHY

Operational Common Protocol for Pulse shape recording Flow Cytometry

T.Rutten, M.Rijkeboer, A.Veen, M.Thyssen, S.Bonato, V.Creach, L.F.Artigas



Part-financed by the European Regional Development Fund (**ERDF**)

Water – Monitoring phytoplankton – Pulse shape recording Flow Cytometry

1. Subject

This protocol describes a method to count and determine the pigment fluorescence and light scatter characteristics of individual algae and other suspended particles in water using a pulse shape recording flow cytometer.

2. The field of application

The method is applicable for (suspended) particles in marine or fresh waters in the size range given by the manufacturer, between 1 µm and 800 µm in diameter and a few mm in length for specialized flow cytometers (CytoSense-Cytobuoy[®]-type).

3. Terms and definitions

Core	: narrow sample stream which carries particles through the detection zone
FWS	: Forward light Scatter
SWS	: Sideward light Scatter
FL Green	: Green Fluorescence
FL Orange	: Orange Fluorescence
FL Yellow	: Yellow Fluorescence
FL Red	: Red Fluorescence
PMT	: Photo Multiplier Tube
Sheath flow	: Flow of fluid used to focus particles in the laser beam with a constant flow rate.
Sample flow	: Flow of sample (in a core) which passes the detection zone (by the sheath flow) at a specific flow rate.
Triggering	: The on/off decision making whether an event or signal should be further processed.

4. Principles of pulse shape recording flow cytometry

The sample with suspended particles is brought in the instrument by a sample pump and transported by a sheath fluid to one or more focused laser beams. Particles pass the laser beam one by one according to a hydrodynamic or other used focusing principle. Each particle is illuminated by the laser resulting in light scattering and fluorescence dependent on if a particle

contains specific pigments (such as chlorophyll) or fluorescent dyes. These optical characteristics are detected by forward and sideward positioned light sensitive detectors (Diode and/or PMT), which discriminates in wave length regions (green, yellow, orange, red). Every particle passing through the laser is counted and the sample volume analyzed is controlled, allowing a robust estimation of an absolute concentration. The acquisition of multiple data points per particles results in a pulse shape optical fingerprint of the whole particle, in which features and internal structure are clearly visible. All optical fingerprints or derived variables, such as the maximum peak height or signal integrated over time, for each detected particle, are stored in a dedicated data-file. In some cases real time imaging of particles is applicable as an extra tool to facilitate particle identification. Data is analyzed afterwards by the clustering of similar fingerprints using either manual or automated clustering classifications methods. The total red fluorescence is a proxy of chlorophyll *a* content per cell.

5. Consumables

Sheath Fluid	: sample and sheath need to have similar osmotic and optical properties as compared to your sample. A common used method is to use 0.2 µm filtered sample water or isotonic water. In case of a system used, which recycles its sheath fluid by filtering into a two filter devise (1µm and 0.45 µm filters), one should keep in mind that the sheath fluid should be refreshed regularly due to possible growth of microbial particles in the filters or tubing. It is possible also to add biocide to your sheath flow to prevent growth as much as possible.
Calibration beads	: are necessary to calibrate and check the instrument regularly with respect to concentration, size and intensity. Calibration beads should meet the following requirements: - visible in most of the detectors - good short and long term stability - relevant size and fluorescence intensity . - not sticky - not overlapping with species fingerprints to be able to apply as internal standard
Calibration beads stock solution	: Usually a stock solution is made which can be held stable for a period of time by diluting a known number of droplets of the high bead concentrate(s) in 0.2 µm sheath fluid solution or filtered 5% isotonic solution (same as sheath fluid). Biocide can be added to this stock. This stock should

be kept in dark in a refrigerator at 4°C and can be preserved during an experimental proven duration.

Flush and Cleaning fluids : Description of cleaning fluids that are used or recommended by the manufacturer to clean the internal fluidics such as the cuvette and inner tubing.

6. Instruments and other tools

Flow cytometer : Description of the flow cytometer

Refrigerator (4°C ±3°C) : Type refrigerator and temperature should be checked regularly

Used water installation : Description water installation used at laboratory.

Pipettes : Description pipettes types/manufacturer used at Laboratory

Software tools : Software tools used for analyzing the flow cytometric data.

7. Sampling

Fresh unfixed samples are stored in (PE, glass) bottles and kept in dark at 4°C. It is recommended to transport samples in the dark at 4°C and to keep the sample as fresh (and representative) as possible by fast transport to the laboratory, because biological changes occur in living samples. Chemical fixation of samples is not recommended due to irreproducible fluorescence shifts. If longer sample transportation time is needed, there are three options:

- chemical fixation; the operator should decide which protocol to use, e.g. use 0.1-0.2% glutaraldehyde final concentration (Marie, Simon and Vaultot, 2005) or the 1% SOMLIT protocol. Be aware to use glutaraldehyde of high purity (for Scanning Electron Microscope)
- instant online analysis on board
- keep the biological variation as low as possible by cooling in the dark at 4°C.
- Samples that arrive at the laboratory should in general be kept in the dark at 4°C until analysis.

8. Operational method

8.1 Precautionary measure

There are no extra precautionary measures needed compared to the local usual laboratory or on board precautionary measures.

8.2 Pretreatment of the sample

For standard analyses it is not necessary to pretreat a sample.

8.3 Pretreatment of the instrument

8.3.1 Switch on the power of the instrument

- 8.3.2 Rinse the instrument (with internal sheath fluid) as long as recommended by the manufacturer to be sure the instrument is clean inside. Usually the manufacturer has standard (software) flushing protocols to prepare the instrument for analysis.
- 8.3.3 If possible, do a visual inspection for air bubbles in tubing or the cuvette
- 8.3.4 The instrument (lasers) should warm up as long as recommended by the manufacturer to be sure the instrument is stable (usually within a few minutes).

8.4 Check of the instrument

- 8.4.1 Make a fresh solution of calibrations beads in 0.2 μm sheath fluid filtered or 5% isotonic solution (same as sheath fluid) or use your diluted stock mix solution if you have demonstrated that it is stable during an assigned period (put end user date on this bottle).
- 8.4.2 Use calibration beads to check the right alignment of your instrument and to validate the performance of the instrument. Use a mix of beads with known characteristics that are registered to be able to compare the performance, robustness, variation and stability of your instrument.
- 8.4.3 Calibration beads are measured in triple, three times one after each other. Register the used software and instrumental settings, because they will affect the performance and output of the instrument (e.g. the measured concentration) at the same settings as used for the sample analyses.

Critical settings:

- | | |
|--------------------------------|---|
| Triggering parameter | : Record the parameter (and detector) that is used as a triggering parameter |
| Threshold level | : Triggering level usually in mV that is the minimum height of signals that will be measured. Signals lower than this value will be ignored and not stored in the data file*. |
| Triggering modus | : Some flow cytometers have specialized types of triggering. If so, register the use of triggering modus. |
| Flush modus in between samples | : Record what protocol is used to clean the instrument between samples (in order to prevent memory effects). |
| Sample pump rate | : The used sample rate affects the number of |

particles that traverse the laser per second and will have effect on the core width. The applied sample rate should be adapted to the maximum rate of particles that the system can handle.

Minimum events or time measured: The number of particles needed to have a representative analysis (10,000) in combination with the minimum analysis volume that the system can handle, should be registered.

Nr of measures for each sample : Dependent on the variation, how many analysis do you need when analyzing a sample to have a representative result

PMT – gain settings : Record the PMT and gain voltages

*: Triggering parameters, levels and modulus are dependent of the instrumental configuration and settings and software.

In general the triggering settings follow two rules:

- I. Use light scatter respectively red or (other algae) fluorescence triggering separately to get information about the non-fluorescing and fluorescing particles in a sample.
- II. Use the most sensitive light scatter or fluorescence triggering level, whereby the electronic noise is just negligible and just above 3 times the standard deviation of the maximum noise level of the light scatter or FL Red detector (chlorophyll bandwidth detector) to enable the detection of the smallest picoplanktonic particles while preventing false positives.
Increase the trigger level in case of interest in especially larger particles bigger than picoplankton and present at very low concentrations. A higher sample rate and volume is usually applied for larger sample particles.
- III. Some instruments can handle combined triggering, which could be useful in order to prevent the switching off of the 'chlorophyll'-trigger if there is an empty cell in a chain.
- IV. Realize that the measured concentration is based on the number of particles that are triggered in a certain volume. Colonies or chains of cells are counted as a single particle (=observation), because they passed the laser as a single (big) particle.

V. The trigger level is instrumental dependent, because it is affected by the type of used PMT, the used optical filters and mirrors, the used PMT gain and voltage and electronic noise.

- 8.4.4 For Quick scan on stability: check outcome of beads in scatter plot protocols Register the performance e.g. in a calibration chart by projecting the mean and standard deviation of some critical parameters (scatter, red and orange fluorescence, beads concentration) of the beads cluster.
- 8.4.5 Check or flush your instrument if the indicators are not performing well within ascertained limits. Realignment of the instrument should be performed only by a professional user if necessary.
- 8.4.6 The frequency of the calibration beads check depends on the performance of your instrument. It is recommended to check the instrument on a regular basis during an analysis day i.e. at least at the beginning of the measurements, in the middle and at the end of the measurements. More calibration beads checks are necessary if instrumental fluctuations are observed. The addition of calibration beads as an internal standard in every sample is also possible, but be aware that this will affect the total fluorescence of your sample. The same applies for the fluorescence coming from noise and/or Zooplankton particles that grazed the autotrophic plankton.
- 8.4.7 Check the noise level by setting the trigger level as low as possible and sample 0.2µm filtered water for ≥ 1 minute.
- 8.4.8 The instrument is ready for the analysis of samples if the first level control e.g. calibration check with beads has been validated positive.

8.5 Analysis of sample

- 8.5.1 Take the sample out of the refrigerator and homogenize the sample by (very) slightly shaking the bottle by hand in order to bring settled (to the bottom) particles in suspension.
- 8.5.2 Be aware that phytoplankton adapts itself to the ambient light conditions. Light adaptation will influence the measured fluorescence. So, keep the sample in dark for at least half an hour before analysis as a kind of standard normalization procedure to minimize the effect of light adaptation. Don't leave sample unnecessary at the laboratory desk in light, but put it back in dark at 4°C.
- 8.5.3 Take a subsample of the bottle in a clean (dark) container, which is washed with sample one time before.
- 8.5.4 If the operator wants to use an internal standard in each sample,

add calibration beads in the sample. Calibration beads in the sample should not be too abundant, but should be well distinguished. We advise an average of 100 beads per sample analyzed.

Else check settings and performance by measuring a bead standard every x samples dependent on the assessed stability of the instrument.

8.5.5 Dependent on the aim of the analysis (multiple) measurements with different settings can be performed, register per sample the selected settings:

Critical settings:

- Triggering parameter
- Triggering parameter level
- Triggering modus
- Flush modus
- Applied sample pump rate*
- Maximum events or time measured
- Nr of measures

* Use a default sample pump rate if possible to prevent variation due to the different sample rates. The rate should be decreased however, if the particles concentration (or particles per second rate) is high ($> 1500 \text{ s}^{-1}$) to prevent coincidence. Coincidence is the phenomenon that two particles are measured as one bigger particle because they are close behind each other.

Use a higher sample rate, if the concentration is very low (and thus analysis time is long) or if the requested sample volume is high (e.g. 5 ml). Usual applied sample volumes are 1 ml to keep the analysis time acceptable. Higher sample rates will enlarge the core diameter, i.e. the flow of particles that are transported in file across the laser. A larger core width will cause more variation because the percentage of particles that pass across the laser focus edges (just a bit out of focus) will increase.

8.6 Recommended actions during analysis

- Keep your sample homogenized during the analysis (there are gentle homogenizing stirrers available).
- Check the current particle counting rate. If it is too high (e.g. $>1500 \text{ s}^{-1}$) there is a high chance of coincidence.
- Check the relative contribution of larger particles. If their contribution is very small, try a higher sample volume (if necessary combined with higher sample rate) to have statistically acceptable number of bigger particles (should be more than 100 counted per sample per cluster)

- Check the shape of clusters in scatter plots or histograms or check the presence of unexpected clusters/histograms. Unexpected results might indicate that the instrument is not working properly e.g. due to air bubbles or clogging.

8.7 After sample analysis

Register meta-information such as details and observations of the sample (color, not clear, delayed transport etc.) or analysis day (hot day, air-conditioning lab broken, instrument showed rare events) in your samples-logbook.

8.8 Closing the whole day analysis

Leave the instrument clean by using an instrumental cleaning protocol.

If the instrument will be left for a longer period, it is recommended to leave biocide in the internal fluidic tubing and filters.

8.9 Data Storage

Storage and backup of raw data.

Use consequent filenames for storage, which includes useful information, like 'sampleseriesname_institutemeasured_sampleID_trigger_samplepumprate_date_time.extension'

Also include file with software version used to gather files. Backup all versions of software that are used to enable to reprocess or check the raw data later.

9. Identification and quantitative results

Description, software and formulas used to process output parameters from raw data.

Concentration = events / volume

Fluorescence = cumulative fluorescence per event / volume

Length = Length FWS

Etc.

10. Output parameters

The output format should be a default format that can be imported in different types of databases such as ascii.csv or txt.

The following default output format and variables are recommended:

File-id, date, location, time of analysis, instrument id, volume measured, nr of particles measured, totals, totals by size distribution (automated clustering methods), found clusters, nr of events per cluster, totals per cluster, possible species.

An extra normalized output with the same features is possible. Normalization can be carried out by using standard beads. There is still an ongoing discussion about how exactly should one normalize.

11. Quality Assurance

- Calibration charts of beads should be used for every FCM analysis day. Parameters such as concentration (part ml^{-1} , Total FWS-SWS-FL's ml^{-1}) should be registered as well as the warning and action limits.
- Sheath fluid rate should be checked regularly (before each new sets of experiments if not used since more than one or two weeks; or after any change in beads properties).
- Filters filling should be checked regularly, especially when air could have been analysed by inadvertently
- Sample fluid rate should be checked regularly (1 time per year) and always after replacing tubing.
- Maintenance and service of the flow cytometric instrument is recommended e.g. change of tubing (fouling internal tubing walls), replacing of 0.2 and 0.45 μm internal filters, check of alignment and laser powers, pump speeds. A maintenance report should be available. It is recommended to register the performance of the instrument by using the standard calibration beads and compare the post-service-performance with the pre-service-performance.

12. Safety

Lasers used have class 3B. They are well covered and protected, but be aware that eyes need to be protected by laser proof glasses if the instrument is open and protection covers are removed.

13. References

- Marie, D., Simon, N., & Vaultot, D. (2005). Phytoplankton cell counting by flow cytometry. *Algal culturing techniques*, 253-268.
- SOMLIT :Service d'Observation du Milieu Littoral/ Coastal Environmental Monitoring Service
- <https://www.Cytobuoy.com>
- <https://www.Dymaphy.eu>

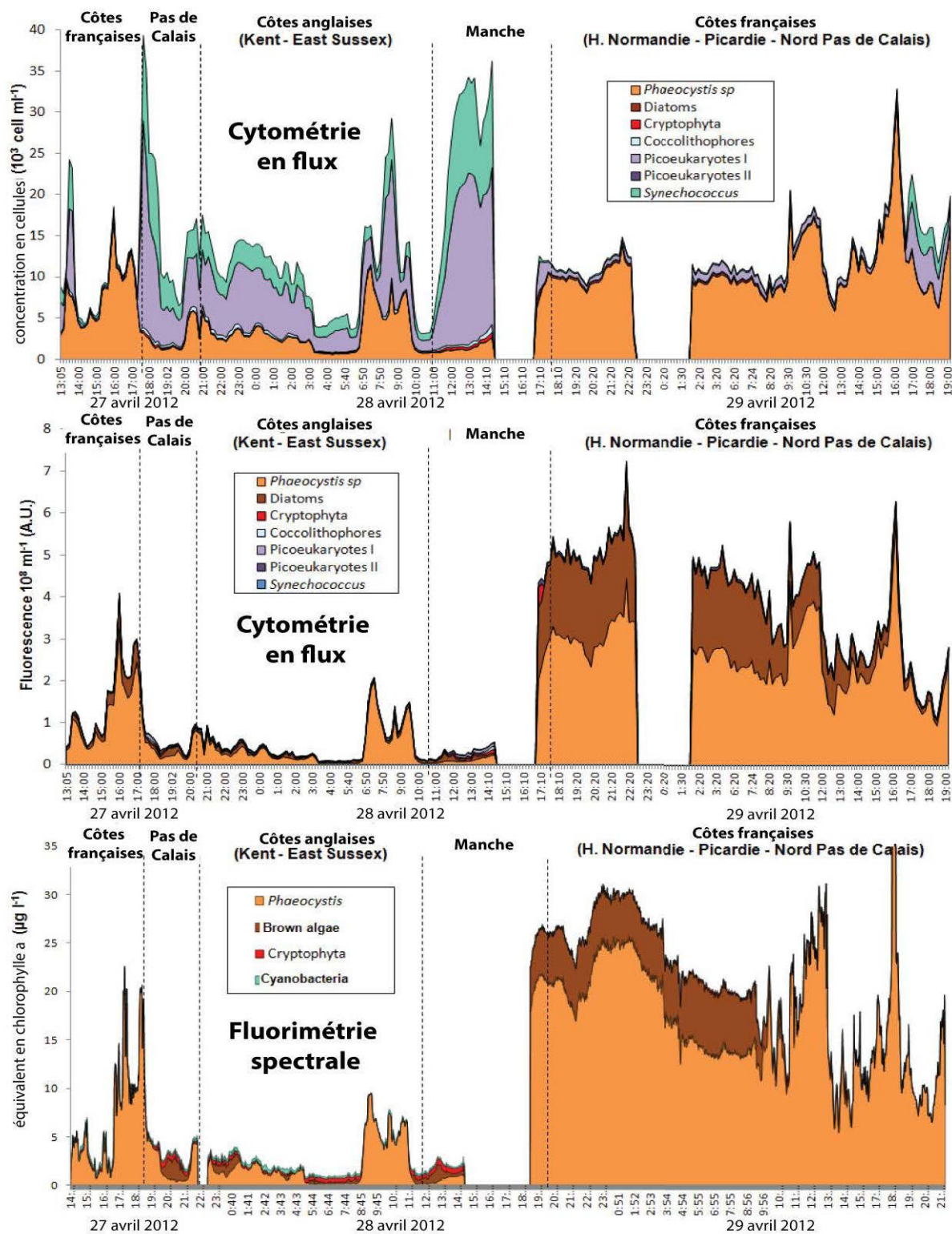


Figure 24. Distribution des groupes phytoplanctoniques enregistrés en continu, exprimés en concentration cellulaire et fluorescence relative (cytométrie en flux, haut et centre) et en équivalents de chlorophylle *a* (Fluorimétrie spectrale, bas) – campagne DYPHYMA – Leg 2, Manche Orientale, 27-29 avril 2012

The permutation test carried out on the between-station analysis showed a significant difference in the spatial distribution of phytoplankton assemblages ($p < 0.0001$). This spatial variability contributed only to 21% of the total data variability in phytoplankton abundance data during the period studied. The first and second axis of the between-station analysis explained 75 and 9% of the total data variability (Fig.5A). The first axis showed *Synechococcus* spp. abundance increasing gradually towards offshore, while Diatoms-like, Coccolithophores, picoeucaryotes II and, to a lesser extent, the haploid stage of *P. globosa* abundance, decreased (Fig.5A, 5B). Cryptophytes and picoeucaryotes I groups presented also on some occasions an offshore-inshore gradient depending on the season and thus, it was not significant for all the sampling period. Distinct phytoplankton assemblages were highlighted relatively to the station's position by the HAC with Ward's method, discriminating stations S1, S2, and S3; stations S4, S5, and S6; and stations S7, S8, and S9 (Fig.5B).

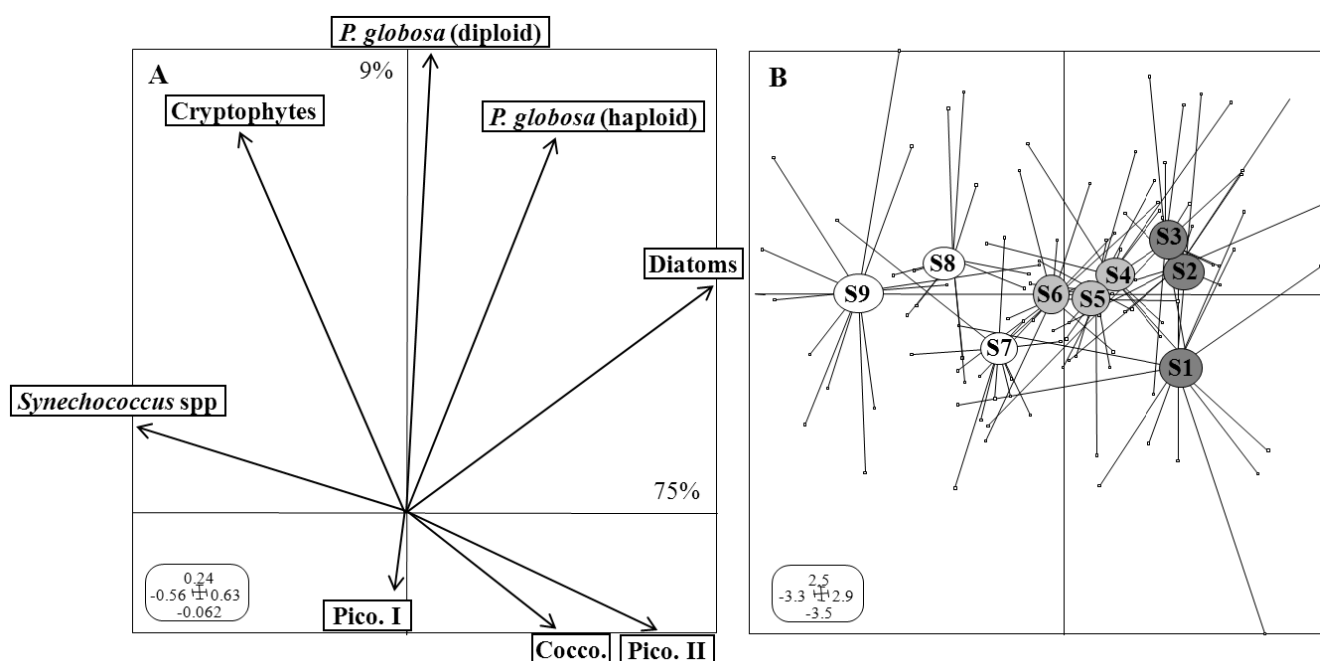


Figure 5. Between-station PCA analysis of phytoplankton assemblages. A. Projection of the variables on the first factorial plane explaining 84% of the total inertia. B. Projection of the sampling stations. Note the different scales. Dark and light grey, and colorless symbols correspond to the three groups of stations revealed by the HAC with Ward' method of the station coordinates onto the factorial map

The HAC with Ward's method of the phytoplankton cluster coordinates projected onto the factorial map allowed distinguishing five phytoplankton groups, all contributing significantly to the seasonal structure: (1) Cryptophytes and Coccolithophores, on the lower side of the

3.2. Changes in functional identity and diversity along the axis of functional differentiation

Ecological strategies reflected by the primary axis of functional differentiation are represented by the scores of phytoplankton groups on the RLQ axis. We used these scores to relate the various ecological strategies to various functional diversity indices and functional identity (or CMW), in an attempt to reveal different mechanisms of phytoplankton community assembly.

Single-trait community-weighted means (CWM) of the 6 relevant traits previously highlighted from the RLQ analysis showed significant variations with the RLQ1 (Fig. 2). Accordingly, CMW for traits characterizing competitive capability (S/V ratio, $\alpha\mu$, and N_{aff}) for limiting conditions showed significant decreases along the axis of functional differentiation, whereas CWM for μ_{max} , E_k , and C/N cell content showed the inverse.

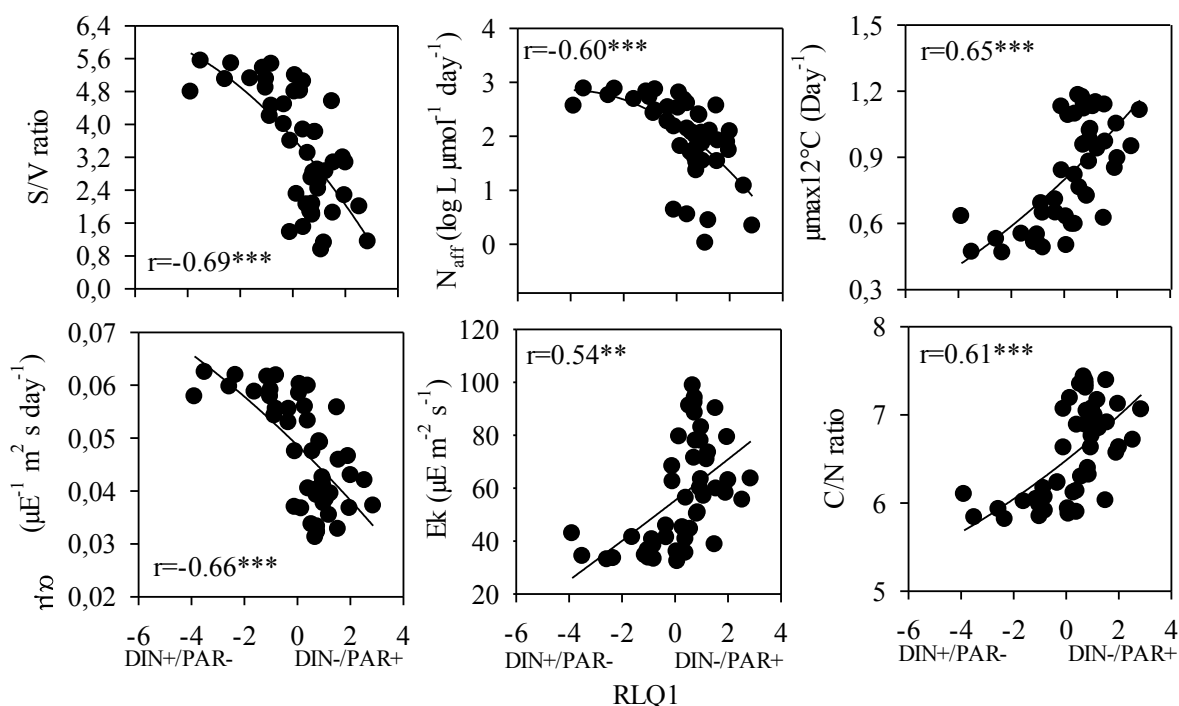
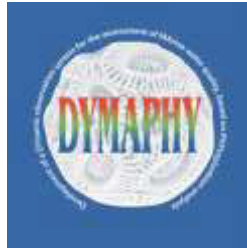


Figure 2. Abundance-weighted means (CWM) in phytoplankton communities along the resource gradient (RLQ1) for the six functional traits revealed by RLQ analysis (S/V ratio, C/N ratio cell content, maximal growth rate [$\mu_{max12^\circ C}$, day⁻¹], the initial slope of the growth-light curve [$\alpha\mu$, $\mu E^{-1} m^2 s day^{-1}$], the onset of light saturation under non-limiting nutrients conditions [E_k , $\mu mol E m^{-2} s^{-1}$], and affinity for nitrates [N_{aff} , log $\mu mol l^{-1} day^{-1}$]. Black lines represent significant regression (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$). N: nutrient concentrations, PAR: light intensity for phytoplankton growth, +: high, -: low

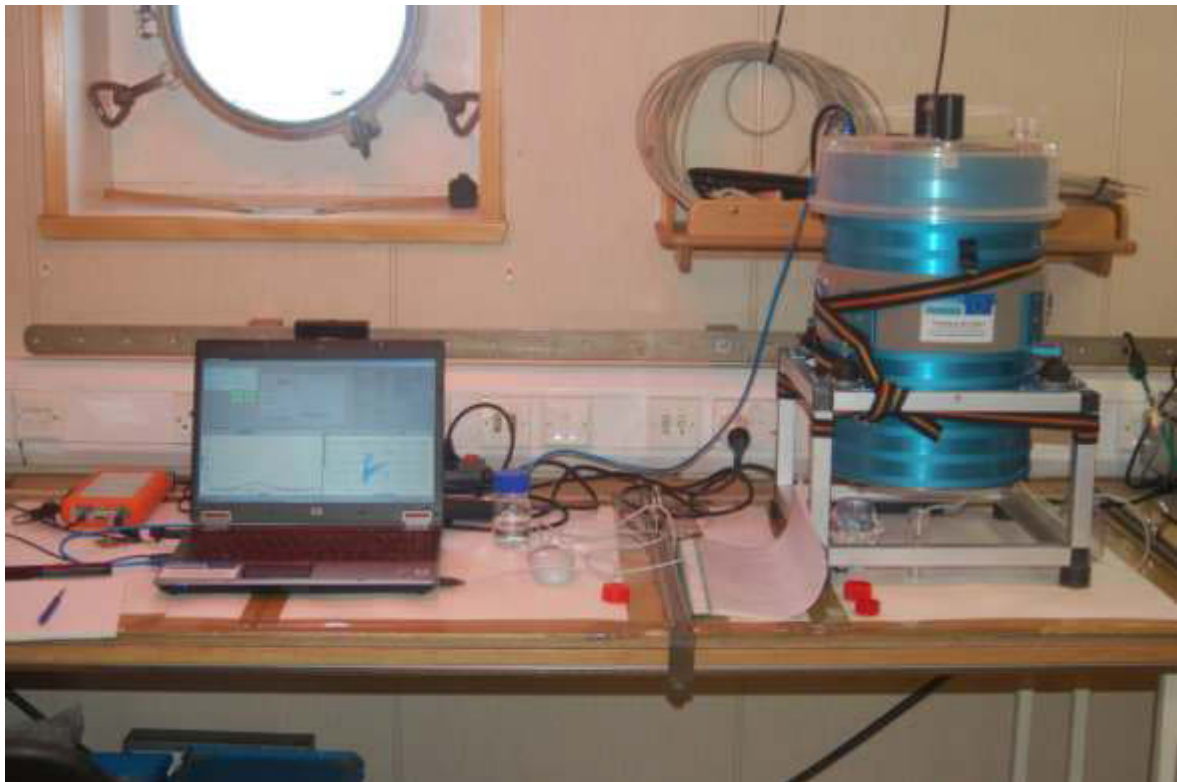


INTERREG IVA 2 Mers Seas Zeeën Crossborder Cooperation Programme 2007-2013

DYNAMAPHY

Operational Common Protocol for Pulse shape recording Flow Cytometry

T.Rutten, M.Rijkeboer, A.Veen, M.Thyssen, S.Bonato, V.Creach, L.F.Artigas



Part-financed by the European Regional Development Fund (**ERDF**)