



HAL
open science

Utilisation de la cytométrie en flux pour une meilleure connaissance de la diffusion individuelle des particules : Application au phytoplancton

William Moutier

► **To cite this version:**

William Moutier. Utilisation de la cytométrie en flux pour une meilleure connaissance de la diffusion individuelle des particules : Application au phytoplancton. Océanographie. Université du Littoral Côte d'Opale, 2016. Français. NNT : 2016DUNK0439 . tel-01551842

HAL Id: tel-01551842

<https://theses.hal.science/tel-01551842v1>

Submitted on 30 Jun 2017

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.



Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur

Université du Littoral Côte d'Opale



École doctorale Science de la matière, du rayonnement et de l'environnement

Discipline : Océanographie physique

Utilisation de la cytométrie en flux pour une meilleure connaissance de la diffusion individuelle des particules. Application au phytoplancton.

PAR : **William Moutier**

MEMBRES DU JURY :

Rapporteurs :

M. Emmanuel BOSS, Professeur, University of Maine, USA

M. Emmanuel DEVRED, Senior Scientist, IOB, Canada

Examineurs :

Mme Annick BRICAUD, Directrice de Recherches (CNRS), LOV, France

M. Laurent LABONNOTE, Maître de conférences, LOA, France

M. Frank FELL, Docteur, Directeur général de Informus GmbH, Allemagne

Directeurs de thèse :

M. Hubert LOISEL, Professeur, LOG, France

Mme Lucile DUFORÊT-GAURIER, Maître de conférences, LOG, France

Soutenue publiquement le : 05 décembre 2016

Remerciements

Après avoir passé trois années au sein du Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, il m'est offert l'opportunité de remercier l'ensemble des personnes ayant participé à cette thèse.

Je remercie tout d'abord le CNES d'avoir financé une partie de ce travail par le biais du programme TOSCA/TROPHY. Je remercie vivement le ministère de l'Education Nationale d'avoir financé cette thèse.

Je tiens à remercier le directeur du laboratoire, M. François Schmitt, ainsi que l'ensemble des personnes y travaillant de m'avoir accueilli si chaleureusement.

Je remercie bien sûr mes encadrants, M. Hubert Loisel et Mme Lucile Duforêt-Gaurier d'avoir toujours été présents et de m'avoir fournis un encadrement de grande qualité.

Je tiens à exprimer mes remerciements à l'ensemble des personnes ayant accepté d'évaluer ce travail de thèse, à savoir, M. Emmanuel Boss, M. Emmanuel Devred, M. Laurent Labonnote, M. Frank Fell et Mme Annick Bricaud. Je remercie tout particulièrement Mme Annick Bricaud qui fut aussi l'un des membres de mon comité de thèse. Merci pour ton implication dans ma thèse, tes conseils et ta disponibilité. Je remercie aussi Mme Mélilotus Thyssen qui a fait partie de mon comité de thèse et sans qui ce travail n'aurait pas été le même. En effet, sans cette formation à la cytométrie en flux, c'est un euphémisme de dire que cela aurait été plus compliqué. Merci pour tes conseils, ta présence tout au long de ma thèse mais aussi ta bonne humeur et ton enthousiasme! Ce fut un grand plaisir de travailler avec toi et j'espère que l'on aura l'occasion de collaborer ensemble dans le futur. Merci à M. Gérard Grégori, qui a toujours été très réactif pour répondre à mes questions concernant le FACSCalibur. Tout comme Lotty, ton enthousiasme est incroyable et

communicatif, je t'en remercie car travailler avec des personnes comme toi est une chance.

Mes collègues ont eu une place importante dans ce travail et je les en remercie grandement. Je souligne que sans leur aide, il m'aurait été impossible d'acquérir autant de données expérimentales. Votre bonne humeur me donnait le sourire pour venir travailler chaque matin. Par avance, je m'excuse auprès des personnes que je vais sans doute omettre de citer...

Merci Xavier, pour ta disponibilité de chaque instant, ton aide que ce soit avant, pendant et après les expériences. Merci pour tous ces bons moments (tennis, discussions, blagues, etc). Bon, je ne te remercie pas de m'avoir fait porter trop longtemps cet ECO-BB9! Merci Arnaud, pour tes conseils techniques qui m'ont été très utiles! Merci aussi pour tous les autres moments (pauses café, discussions, etc). Merci David, sans toi, je pense que je serais encore bloqué sur des problèmes de programmation! Eh oui, quand je suis arrivé en thèse, je ne connaissais rien à R donc David m'a rendu d'énormes services! Je me rappelle aussi de tes petites interrogations avant d'aller au pôle sur les acronymes... Merci, aussi pour m'avoir fait découvrir les courses d'orientation (j'espère en refaire!) Merci Régis, bien sûr pour ton aide en informatique mais aussi pour les parties bomb beach et nos discussions. Merci à Michel pour ton aide technique durant l'expérience. Je remercie aussi Michelle pour ton aide et ta patience quand j'arrivais au dernier moment pour les papiers. Je te remercie Cédric de m'avoir fait découvrir l'optique marine à travers ce cours de master. En y réfléchissant, ce cours a changé ma vie dans la mesure où c'est après celui-ci que j'ai pensé à changer de domaine. Merci de m'avoir soutenu en Nouvelle Orléans pour ma présentation et ces supers souvenirs là-bas. Merci aussi d'avoir toujours été disponible pour me conseiller. Merci Hubert, malgré la distance, tu as toujours été présent pour répondre à mes questions ou faire un skype. Merci aussi pour ta bonne humeur et ton enthousiasme qui sont extrêmement motivants. Promis, je repasserai au labo pour faire une petite choucroute. En parlant de choucroute, je pense directement à Laurent! Merci pour tous ces bons repas partagés mais aussi ton aide durant la thèse.

Merci Séverine, toujours souriante et un mot pour soutenir, ce fut un plaisir de travailler avec toi. Tes conseils pour trouver un post-doc m'ont grandement aidé et je t'en remercie. Merci aussi à Françoise, je dois dire que nos discussions sportives vont me manquer ! Que ce soit à la pause café ou pour aller au pôle, on trouvait toujours un moyen pour parler de sport. Merci pour tous ces moments. Merci Lucie, toujours avec le sourire et prête à aider, ce fut un plaisir de travailler avec toi. Merci pour avoir toujours répondu présente même lorsque j'avais des demandes dans des délais "difficiles à tenir". Merci Vincent qui a toujours petite blague sous le coude ! Merci Felipe de m'avoir aidé dans le monde des bactéries qui était parfois un peu obscure pour moi avant de t'en parler.

Durant cette thèse j'ai eu l'occasion de rencontrer quelques invités, post-docs et thésards, je tiens à les remercier. Dans un ordre complètement aléatoire, merci à Alice, Fabien, Simon, Clément, Delphine, Clémence, Zied, Arnaud, Sara, Mohamed, Sundarabalan, Bin et Mamadou. Merci aussi à Max pour nos longues discussions et je n'oublierais jamais nos vacances en Norvège (Man vs. Wild!). Merci F-P pour tous ces restaurants chinois et ces conseils bien utiles en début de thèse. Enfin, un grand merci à Anne-Hélène, avec qui j'ai partagé durant 3 ans le bureau et qui est devenue une amie. Tu as réussi à me supporter et chapeau pour ça ! Merci pour ton soutien, ton aide et tous ces souvenirs. Bon, je suis sûr qu'on en aura d'autres dans le futur, je ne me fais pas trop de soucis pour ça, donc à bientôt !

Lucile, un merci ne suffirait pas, vous m'avez toujours encadré de la meilleure manière possible et vous avez été présente du début à la fin de cette thèse. Merci pour ces trois années durant lesquelles vous m'avez conseillé, transmis votre passion, prodigué tant de conseils et guidé pour la suite. Si ces trois années resteront comme un incroyable souvenir pour moi, c'est en grande partie grâce à vous. Nos longues discussions devant le tableau où les feuilles de brouillon me manqueront ! J'espère que vous savez à quel point je suis reconnaissant pour tout ce que vous m'avez apporté. Je vais m'arrêter là et vous dire à bientôt.

Je tiens à remercier mes amis qui m'ont permis de m'évader de la thèse. Je remercie

tout particulièrement, Thomas Fauchez, un ami de longue date qui a été comme un guide tout au long de mes études. Toujours présent pour me conseiller et parler de science, je te remercie pour tout. Je remercie bien sûr mes parents et ma grand mère qui m'ont toujours soutenu dans mes choix. Merci à ma mère qui a eu le courage de relire ma thèse et de m'avoir encouragé au quotidien à donner le meilleur de moi-même dans tout ce que j'entreprends.

Enfin, je remercie la personne à qui je dédie cette thèse, bien sûr, Caroline. Merci de m'avoir soutenu durant toutes mes études et, tout particulièrement, durant ces trois années qui, il faut le souligner, n'ont pas toujours été évidentes. Merci aussi d'avoir relu ma thèse et d'avoir tout quitté pour me suivre en Afrique du Sud.

Table des matières

0	Introduction générale	1
I	Cadre théorique	7
1	Formalisme des codes de diffusion simple	9
1.1	Onde électromagnétique monochromatique	9
1.2	Onde électromagnétique polarisée	11
1.3	Diffusion du rayonnement par une particule	14
1.3.1	Diffusion du rayonnement par une particule sphérique	16
1.3.2	Diffusion du rayonnement par une particule non sphérique avec une orientation fixe	17
1.4	Caractérisation de la diffusion d'un ensemble de particules	20
1.4.1	Cas d'un milieu diffusant macroscopiquement isotropique et possédant une symétrie miroir	23
1.4.2	Normalisation de la matrice de diffusion et de la matrice de phase .	25
2	Formalisme de l'optique marine	27
2.1	Définitions des IOPs	27
2.2	Constituants optiquement significatifs	30
II	Matériels et méthodes	33
3	Conditions et mesures expérimentales	35
3.1	Expérience en microcosme	35

TABLE DES MATIÈRES

3.1.1	Choix des espèces	35
3.1.2	Conditions expérimentales	36
3.2	Filtrations	37
3.3	Microscope à balayage électronique (MEB)	39
3.3.1	Méthode de séchage des échantillons	39
3.3.2	Métallisation des échantillons	40
3.4	Mesures biogéochimiques	40
3.4.1	La chlorophylle- <i>a</i> (Chl- <i>a</i>)	40
3.4.2	Le carbone organique particulaire (POC)	41
3.5	Mesures des IOPs	42
3.5.1	Coefficient d'absorption des particules algales et non-algales	42
3.5.2	Coefficient d'absorption de la matière organique dissoute colorée (a_{CDOM})	42
3.5.3	Coefficient de rétrodiffusion	43
3.6	La cytométrie	45
3.6.1	FACSCalibur	45
3.6.2	Le cytomètre en flux à scanning de type " Cytosense "	47
3.6.3	Orientation des particules non sphériques	51
4	Simulation des propriétés optiques : Codes de diffusion simple	55
4.1	Codes de diffusion simple	55
4.1.1	Le code de <i>Mie</i>	58
4.1.2	Le code <i>T-Matrix</i>	58
4.1.3	Le code <i>Generalized Multiparticle Mie-solution</i> (GMM)	59
4.1.4	Le code <i>ScattnLay</i>	59
4.2	Base de données	60
4.2.1	Base de données DTB1	61
4.2.2	Base de données DTB2	61

III	Résultat	69
4.3	Considérations théoriques	71
4.4	Calibration du Cytosense	73
4.5	Dérivation de la section efficace backward	74
5	Scattering of individual particles from cytometry : tests on phytoplankton cultures	79
5.1	Introduction	84
5.2	Material and method	86
5.2.1	Phytoplankton cultures	86
5.2.2	Flow cytometry	87
5.2.3	Theoretical considerations	89
5.2.4	Radiative transfer computations	91
5.2.5	Numerical databases	95
5.3	Results	98
5.3.1	Morphology of the species	98
5.3.2	Impact of the polarization	98
5.3.3	The Cytosense measurements	102
5.3.4	Comparison of the measured and theoretical values of forward and sideward cross sections	104
5.3.5	The backscattering cross section	109
5.3.6	The backscattering efficiency factor	112
5.4	Discussion and conclusion	116
6	Evolution of the scattering properties of phytoplankton cells from cytometry measurements	119
6.1	abstract	122
6.2	Introduction	123
6.3	Material and method	125
6.3.1	Phytoplankton cultures	125

6.3.2	Flow cytometry	125
6.3.3	Ancillary measurements	127
6.3.4	Scanning Electron Microscope (SEM)	127
6.3.5	Methodology	128
6.3.6	Algorithm	129
6.4	Results	130
6.4.1	Flow cytometry analyses	130
6.4.2	Abundance	131
6.4.3	Morphology of the phytoplankton species	133
6.4.4	The optical properties of species	135
6.4.5	Optical properties as a function of the growth phase	143
6.5	Summary and remarks	144
7	Utilisation de la cytométrie pour une meilleure compréhension de la relation POC vs. b_{bp}	149
7.1	Introduction	149
7.2	Abondance des différents compartiments	153
7.3	Relations POC vs. b_{BB9}	156
7.4	Relations BB9 vs. Abondance	158
7.5	Reconstruction du coefficient de rétrodiffusion à partir de mesures cytométriques	160
7.6	Contribution des différents compartiments au $b_{b_{model}}$	165
7.7	Analyse des relations POC vs. b_{bp}	169
7.8	Conclusions et perspectives	171
IV	Conclusions et perspectives	175
	Bibliographie	185

V Annexes

211

Table des figures

1.1	Représentation d'une onde électromagnétique monochromatique plane. . .	10
1.2	Système de coordonnées utilisé pour décrire la direction de propagation d'une onde électromagnétique.	11
1.3	Diffusion d'une particule (placée au centre du repère). Les directions du rayonnement incident et diffusé sont données, respectivement, par les vecteurs \mathbf{n}^i et \mathbf{n}^d . \mathbf{n}^i est représenté par le couple d'angle (θ^i, ϕ^i) et \mathbf{n}^d par le couple (θ^d, ϕ^d) . Le schéma (a) présente le plan méridien d'incidence (hachuré en bleu) et le plan méridien de diffusion (hachuré en rouge). Le schéma (b) présente le plan de diffusion (hachuré en vert).	13
1.4	Illustration de (a) cylindres oblates ($D_{cyl}/L_{cyl} < 1$) et prolates ($D_{cyl}/L_{cyl} > 1$) et de (b) sphéroïdes oblates ($a/b < 1$) et prolates ($a/b > 1$).	18
1.5	Angles d'Euler de rotations α , β et γ transformant L_r (système de coordonnées en bleu) en L_p (système de coordonnées en rouge) (schéma adapté à partir de Mishchenko et al. (2002)).	19
1.6	Illustration des différentes étapes visant à transformer le repère L_r (système de coordonnées en bleu) en L_p (système de coordonnées en rouge) en utilisant les angles d'Euler pour un cylindre oblate.	20
1.7	Illustration des différentes étapes visant à transformer le repère L_r (système de coordonnées en bleu) en L_p (système de coordonnées en rouge) en utilisant les angles d'Euler pour un cylindre prolata.	21
1.8	Exemple de direction de propagation possible de l'onde incidente et diffusée	23

2.1	Géométrie utilisée pour définir les IOPs (schéma adapté à partir de Mobley (1994))	28
2.2	Graphique logarithmique présentant la taille des différents constituants présents dans l'eau de mer. Graphique extrait de Stramski et al. (2004).	30
2.3	Chaîne des composants dont dépendent les IOPs (figure issue et adaptée de la figure 1.3 du rapport de l'IOCCG n°5).	30
3.1	Photographie des conditions expérimentales avant l'ajout des cultures dans le milieu.	36
3.2	Schéma d'une mesure de diffusion d'un élément de volume par l'instrument WET-Labs ECO BB9.	44
3.3	En haut, principe d'analyse des particules par le Cytosense et en bas, analyse d'une particule par le Cytosense en utilisant le profil optique composé ici du signal diffusé (en bleu) et de fluorescence (en rouge) (Image extraite du manuel Cytobuoy).	48
3.4	Principe du "beam shaping" et de la distribution de l'intensité lumineuse lors du passage des particules analysées par le Cytosense (schéma adapté à partir de Duforêt-Gaurier et al. (2015)).	49
3.5	a) Vue de dessus et b) vue de face schématique du système optique (images extraites du manuel Cytobuoy)	50
4.1	Géométrie de sphère multicouche utilisée pour le calcul des propriétés optiques dans le code Scattnlay.	60
4.2	Géométrie des agrégats simulés. C signifie clusters, le nombre indique le nombre de sphères et la lettre indique les différentes configurations.	62

4.3 Schéma représentant les deux types de modèles concentriques simulés par le biais du code Scattnlly. Le schéma à gauche représente le modèle à deux couches composé d'un cytoplasme (couche interne) et d'un chloroplaste (couche externe). Le schéma à droite représente le modèle à 3 couches (cytoplasme-chloroplaste-silice), utilisé pour les cellules avec une paroi de silice. 65

4.4 Section efficace de rétrodiffusion (σ_{bb}) en fonction de la section efficace de côté (σ_{SSC}) (échelle logarithmique). La ligne noire correspond à la droite de régression calculée à partir de l'ensemble des données de DTB2. 77

5.1 Coordinate systems defined for a) a prolate and b) an oblate cylinder, incidence geometry and scattering configuration. L{ X, Y, Z } is the laboratory reference frame with Z-axis along the propagating direction of the incident beam (bold arrow). P{ X_p, Y_p, Z_p } is the particle reference frame. The particle flows up following the sheath fluid. 93

5.2 Scanning electron microscopy images of a) side and b) top view of *Thalassiosira pseudonana*; c) single cell of *Chlamydomonas concordia*; and d) aggregate form of *Chlamydomonas concordia* (for the fourth day of the experiment). 97

5.3 Color contour plots Z_{13}/Z_{11} (%) , vs the zenith and the azimuth angles for monodisperse a) prolate (EPS = 0.7) and b) oblate (EPS = 1.3) cylinders in a fixed orientation with an surface equivalent sphere radius of 3 μm in fixed orientation. The refractive index is $1.05 + i0.01$ 100

5.4 Color contour plots Z_{13}/Z_{11} (%) , vs the zenith and the azimuth angles for monodisperse aggregate for cluster a) C_9 and b) C_{8a} in a fixed orientation. The diameter and refractive index of each sphere are 4 μm and $1.05 + i0.01$, respectively. 101

5.5 Elements Z11 (solid lines) and Z13 (dotted lines) of the phase matrix (after integration according to the azimuth angle) as a function of the zenith angle for the cluster C_{8a} and C_9 102

5.6 Probability density function of (a) forward (b) sideward cross sections (μm^2) and (c) diameter of *Thalassiosira pseudonana* the fourth day experiment (21667 values). The dotted lines correspond to the median values. 103

5.7 Probability density function of (a) forward (b) sideward cross sections (μm^2) and (c) diameter of *Chlamydomonas concordia* the fourth day experiment (4638 values). The dotted lines correspond to the median values. . . 105

5.8 Probability density function of (a) forward and (b) sideward cross sections (μm^2) simulated according to different models. The models plotted are : homogeneous sphere (gray), 80% $_{cyto}$ -18.625% $_{chl}$ -1.375% $_{Si}$ (red) and 80% $_{cyto}$ -15% $_{chl}$ -5% $_{Si}$ (green). The dotted lines are PDF derived from the Cytosense measurements of THAL, equivalent at the Fig. 5.6. The red dotted vertical lines correspond to the median of Cytosense measurements. 106

5.9 Probability density function of (a) forward and (b) sideward cross sections (μm^2) simulated according to different models. The plotted models are : homogeneous sphere (gray), 70% $_{cyto}$ -30% $_{chl}$ (red) and 80% $_{cyto}$ -20% $_{chl}$ (green). The dotted lines are PDF derived from the Cytosense measurements of CHLAM, equivalent at the Fig. 5.7. The red dotted vertical lines correspond to the median of Cytosense measurements. 107

5.10 (a) The forward and (b) sideward cross sections for aggregates with a symmetric plane (empty circle) without a symmetric plane (cross) and surface equivalent homogeneous sphere (SEHS; empty triangle) as a function of the size parameter (s). 108

5.11 Length of THAL from the optical microscope (solid lines) and from the Cytosense (long dashed lines) for a) the 4th and b) the 13th day of the experiment. The vertical dashed lines represent the medians values. . . . 114

5.12	Cytogram of the total forward (a.u) as a function of the forward length (μm) as estimated from the Cytocclus software. The two dashed black ellipses encompass approximatively the aggregate and single cells. Color bar represent the cells density.	114
5.13	Equivalent diameter of THAL from the optical microscope (solid lines) and longer axis from the Cytosense (long dashed lines) for a) the 4 th and b) the 13 th day of the experiment. The vertical dashed lines represent the medians values.	115
6.1	Geometry of the simulated aggregates. C stands for clusters, the number indicates the number of spheres and the letter in small cap stands for the various configurations.	130
6.2	Abundance of phytoplanktonic cells over time of experiment for B1 (black line) and B2 (red line).	132
6.3	Abundance of phytoplanktonic cells over time of experiment for B4 (black line) and B5 (red line).	132
6.4	Boxplot of the frustule thickness for the 5 th , 11 th , 13 th and 17 th day of the experiment. The numbers under the boxplot represents the average proportion (%) of the frustule with respect to the cell diameter.	133
6.5	Temporal course of the (a) forward and (b) sideward efficiencies (log-linear scale) of THAL (blue box) and CHLAM (red box). The box width is proportional to the square-roots of the sample size.	134
6.6	Same as Fig. 6.5 but for the diameter.	134
6.7	Principal component analysis (PCA) performed on the dataset. Projection of the observations (colored points) for all the available dates and the variables (arrows) on the two first principal components (80.7 % of the total variance).	136

TABLE DES FIGURES

6.8 Forward (a) and sideward (b) efficiencies against cell diameter for the two models : 70%_{cyt}-30%_{chl} (blue lines) and 80%_{cyt}-20%_{chl} (red lines), for a volume equivalent complex refractive index (m) equal to : $1.04 + i0.01$. . . 139

6.9 (a) The forward and (b) sideward efficiencies for aggregates (empty circle) and their surface equivalent homogeneous sphere (SEHS; empty triangle) as a function of the size parameter (s). 141

6.10 The sideward efficiency against the diameter for two models : 80%_{cyt}-18.625%_{chl}-1.375%_{si} (blue lines) and 80%_{cyt}-18.18%_{chl}-1.82%_{si} (red lines) and for a complex refractive index of the chloroplast ($m(\text{chl})$) of : $1.1237 + i0.0520$ 142

7.1 Concentration en carbone organique particulaire (POC) en fonction du coefficient de rétrodiffusion (b_{bp}) à partir de données recueillies lors de différentes missions. 151

7.2 Abondance des bactéries hétérotrophes (en rouge), des cellules phytoplanktoniques (en noir) et des cellules en dégénérescence (en vert) tout au long de l'expérience pour les bacs a) B1 et b) B2 de THAL. 154

7.3 Abondance des bactéries hétérotrophes (en rouge), des cellules phytoplanktoniques (en noir) et des cellules en dégénérescence (en vert) tout au long de l'expérience pour les bacs a) B4 et b) B5 de CHLAM. 156

7.4 Relations entre la concentration en POC et le coefficient de rétrodiffusion mesuré ($b_{b_{BB9}}$) pour THAL (points en noir) et CHLAM (points en orange). Les triangles pleins sont pour les valeurs obtenues durant la phase exponentielle et les cercles vides sont pour les valeurs obtenues en dehors de la phase exponentielle. 157

7.5 Flowchart montrant les étapes de reconstruction du coefficient de rétrodiffusion à partir des mesures cytométriques. 162

7.6	Coefficient de rétrodiffusion mesuré avec l'ECO-BB9 ($b_{b_{BB9}}$) en fonction du coefficient de rétrodiffusion modélisé ($b_{b_{model}}$) pour les bacs de THAL (B1 et B2) et CHLAM (B4 et B5). Les points en rouge correspondent aux valeurs mesurées et modélisées durant la phase exponentielle. La ligne noire est la droite 1 :1. Les barres d'erreurs représente la déviation standard autour de la moyenne des mesures ECO-BB9.	163
7.7	Contribution (%) des bactéries hétérorophes (zone noire), des cellules phytoplanctoniques (zone grise) et dégénérées (zone hachurée) au coefficient de rétrodiffusion modélisé ($b_{b_{model}}$) pour les bacs de THAL (B1 et B2) et CHLAM (B4 et B5).	166
7.8	Cytogrammes illustrant la discrimination des cellules de THAL (en vert), des cellules en dégénérescence (Dege ; en orange) et des cellules de CHLAM (en bleu). a) Cytogramme Total FSC (u.a) vs. Total FLO (u.a) et b) cyto-gramme Total SSC (u.a) vs. Total FSC (u.a).	237
7.9	Cytogrammes illustrant la discrimination des cellules de CHLAM (en bleu) et des cellules en dégénérescence (Dege ; en jaune). a) Cytogramme Total FLR (u.a) vs. Total FSC (u.a) FSC et b) cyto-gramme Total SSC vs. Total FSC.	238
7.10	Principe du scanning du Cytosense	238

Liste des tableaux

3.1	Spécificité des paramètres techniques selon le type d'analyse.	38
3.2	Paramètres techniques utilisés pour les analyses Cytosense	51
4.1	Récapitulatif des spécificités des codes de diffusion simple utilisés.	56
4.2	Principales entrées et sorties du code de Mie, T-matrix, Scattnlay et GMM (Generalized Multiparticle Mie-solution).	57
4.3	Indices de réfraction réels référencés pour le cytoplasme.	66
4.4	Indices de réfraction réels référencés pour le chloroplaste. (Table adaptée à partir de Bernard et al. (2009))	67
4.5	Indices de réfraction réels référencés pour la paroi de silice.	67
4.6	Ensemble des entrées utilisées afin de générer la base de données DTB2 . .	68
4.7	Taille, coefficient de variation et taille des différentes billes de polystyrène utilisées pour la calibration du Cytosense.	75
4.8	Relations théoriques entre les sections efficaces de côté et de rétrodiffusion, $\sigma_{b_s}(488\text{nm}) = 10^B \times [\sigma_{SSC}(488\text{nm})]^A$, calculées à partir de simulations pour des sphères homogènes, à deux ou trois couches.	76
5.1	Position (x_p, y_p, z_p) of each sphere composing the simulated aggregate in the particle frame. C stands for Cluster, the number indicates the num- ber of spheres composing the aggregate and the letter stands for a given configuration	94
5.2	The mean absolute relative difference (%) between the σ_{SSC} or σ_{b_s} values obtained considering the Z_{13} term and without considering Z_{13} for different aggregate configurations.	103

5.3 The mean values of the backscattering cross sections (μm^2) for THAL and CHLAM during the exponential phase according to different parametrizations. Note that P3 is applied only for THAL as CHLAM are naked cells. . 110

5.4 The mean values of the efficiency factor for THAL and CHLAM during the exponential phase according to different parametrizations. Note that P3 is applied only for THAL as CHLAM are naked cells. 113

6.1 Complex refractive index of the chloroplast and the volume equivalent complex refractive index for the 70%_{cyt}-30%_{chl} and the 80%_{cyt}-20%_{chl} models. . 138

6.2 Complex refractive index of the chloroplast and the volume equivalent complex refractive index for the 80%_{cyt}-18.625%_{chl}-1.375%_{si} and the 80%_{cyt}-18.18%_{chl}-1.82%_{si} models. 142

6.3 The \tilde{Q}_{FSC} , \tilde{Q}_{SSC} , \tilde{Q}_{b_b} , $\tilde{Q}_{\text{a}_\text{phy}}$, \tilde{D} and $\text{Chl-}a.\text{cell}_{\text{liv}}^{-1}$ values, averaged over the different population growth stages of THAL and CHLAM with their associated coefficients of variation (%). 145

7.1 Coefficients de corrélation (R^2) entre coefficient de rétrodiffusion mesuré ($b_{\text{b}_{\text{BB9}}}$) et l'abondance des compartiments calculés sur les différentes phases de l'expérience. La RSE représente l'erreur type relative (%) et N le nombre de jours. 161

7.2 Valeurs du coefficient de corrélation (COR), de l'erreur quadratique moyenne (RMSE) et de la différence relative moyenne absolue (MARD) entre le $b_{\text{b}_{\text{model}}}$ et le $b_{\text{b}_{\text{BB9}}}$ qui est calculé à partir de l'Eq. (3.4) en utilisant un $\chi_p(124^\circ)$ de 0,9 et 1,076. 165

7.3 Coefficients de corrélation (R^2) entre le coefficient de rétrodiffusion mesuré ($b_{\text{b}_{\text{BB9}}}$) et ceux modélisés pour l'ensemble des compartiments ($b_{\text{b}_{\text{model}}}$), pour les bactéries hétérotrophes ($b_{\text{b}}(\text{bact})$), pour les cellules phytoplanctoniques ($b_{\text{b}}(\text{phyto})$) et pour les cellules en dégénérescence ($b_{\text{b}}(\text{dege})$). La RSE représente l'erreur type relative (%) et N le nombre de jours. 168

7.4 Coefficients de corrélation (R^2) entre la concentration en POC et le coefficient de rétrodiffusion mesuré ($b_{b_{BB9}}$), modélisés pour l'ensemble des compartiments ($b_{b_{model}}$), pour les bactéries hétérotrophes ($b_b(bact)$), pour les cellules phytoplanctoniques ($b_b(phyto)$) et pour les cellules en dégénérescence ($b_b(dege)$). La RSE représente l'erreur type relative (%) et N le nombre de jours.	169
--	-----

Introduction générale

L'optique marine consiste à étudier les interactions entre le rayonnement et l'océan afin d'en déduire sa composition. La diffusion et l'absorption caractéristique de l'eau de mer et de ses constituants, telles que les particules en suspensions, et le matériel dissout sont décrits par les Propriétés Optiques Inhérentes (IOPs) (Preisendorfer, 1976). Les deux IOPs fondamentales sont le coefficient d'absorption ($a(\lambda)$) et l'indicatrice de diffusion ($\beta(\theta, \lambda)$). À partir de ces deux IOPs nous pouvons obtenir le coefficient de diffusion ($b(\lambda)$), de rétrodiffusion ($b_b(\lambda)$) et d'atténuation ($c(\lambda) = a(\lambda) + b(\lambda)$). Ces coefficients sont dits totaux dans la mesure où ils résultent de la contribution de chaque constituant, optiquement significatif, présent dans le milieu. Lors des deux dernières décennies, de nombreux modèles bio-optiques ont été développés en utilisant les IOPs comme proxy de paramètres biogéochimiques (carbone organique et inorganique particulaire, chlorophylle-*a*, carbone organique dissous, matière en suspension) ou bien la taille des particules (Stramski et al., 1999, Loisel et al., 2001, Cetinić et al., 2012, Gardner et al., 2006, Balch et al., 2001, Bricaud et al., 1998, Dall'Olmo et al., 2012, Morel et al., 2007, Szeto et al., 2011, Vantrepotte et al., 2015, Neukermans et al., 2012, Ciotti et al., 2002, Loisel et al., 2006). Il est évident qu'une compréhension précise des IOPs est indispensable afin d'interpréter correctement la variabilité que l'on observe autour des lois moyennes établies entre les IOPs et des grandeurs biogéochimiques. Cependant, à l'heure actuelle, de grandes incertitudes subsistent sur l'impact individuel des différents types de particules (phytoplanctons, détritus associés, bactéries hétérotrophes, virus, sédiments), présentes dans l'eau, sur les IOPs. Compte tenu du rôle écologique du phytoplancton à la fois en océan ouvert et dans les eaux cotières et l'impact considérable des particules lithogéniques dans les eaux cotières, il

est nécessaire de caractériser la contribution relative des particules sur les IOPs. De nombreuses études se sont attachées à caractériser le rôle du compartiment phytoplanctonique sur les IOPs par le biais de simulations basées sur la théorie de Mie. La théorie de Mie considère les particules comme des sphères homogènes. Les connaissances du coefficient de rétrodiffusion se sont, dans un premier temps, principalement basées sur des simulations de Mie (Bricaud et al., 1983, Morel and Bricaud, 1986, Bricaud and Morel, 1986, Morel and Ahn, 1991, Stramski and Kiefer, 1991, Ahn et al., 1992, Stramski and Mobley, 1997, Stramski et al., 2001). Les résultats ont montré que la contribution du compartiment phytoplanctonique sur le coefficient de rétrodiffusion était faible et que la majeure partie de la rétrodiffusion pouvait être due à des particules non vivantes de tailles submicroniques. Cependant, alors que les coefficients d'absorption, de diffusion et d'atténuation étaient correctement modélisés par le biais de la théorie de Mie (Morel and Bricaud, 1986, Bricaud and Morel, 1986, Bricaud and Stramski, 1990, Ahn et al., 1992), des études ont mis en évidence l'importance de prendre en compte la morphologie et la structure interne des cellules phytoplanctoniques lors d'analyses portant sur la rétrodiffusion du signal. Des simulations ont été effectuées en considérant les cellules phytoplanctoniques comme des sphéroïdes homogènes et des sphères ou sphéroïdes concentriques composées de deux ou trois couches (Meyer and Brunsting, 1975, Meyer, 1979, Quinby-Hunt and Hunt, 1989, Bricaud et al., 1992, Kitchen and Zaneveld, 1992, Zaneveld and Kitchen, 1995, Quirantes and Bernard, 2004, 2006, Clavano et al., 2007, Bernard et al., 2009, Dall'Olmo et al., 2009, Matthews and Bernard, 2013). Les résultats ont montré un plus fort coefficient et/ou une efficacité de rétrodiffusion que ceux prédits par la théorie de Mie. Clavano et al. (2007) ont utilisé le code T-Matrix afin de comparer les propriétés optiques d'une population de particules marines poly- ou mono-dispersées de sphéroïdes orientées aléatoirement, avec celles de sphères homogènes de volume équivalent. Les résultats ont montré que la forme de la particule impacte les IOPs pour les particules de grandes tailles devant la longueur d'onde (paramètre de taille supérieure à 50) et les particules de forme très excentrique (excentricité supérieure à 10 ou inférieure à 0,1). Bernard et al. (2009) ont montré que l'efficacité de rétrodiffusion d'une sphère à deux couches, pouvait être jusqu'à 25 fois su-

périeure à celle d'une sphère homogène d'indice et de volume équivalent. Dall'Olmo et al. (2009) ont effectué des mesures de rétrodiffusion en mer selon différentes gammes de tailles (suite à des filtrations). Contrairement aux prédictions effectuées par le biais de la théorie de Mie, les particules dont la taille était supérieure à $3 \mu\text{m}$ contribuaient, en moyenne, à 50 % du coefficient de rétrodiffusion, alors que les particules de tailles inférieures à $0,2 \mu\text{m}$ avaient un effet négligeable. Par ailleurs, les auteurs ont montré qu'il n'était pas possible de retrouver à la fois le coefficient de rétrodiffusion et le coefficient d'atténuation avec la théorie de Mie. De plus, des mesures, effectuées en laboratoire, ont confirmé l'impact de l'hétérogénéité sur la partie rétrodiffusée du signal (Witkowski et al., 1993, Volten et al., 1998, Voss et al., 1998, Witkowski et al., 1998, Vaillancourt et al., 2004, Svensen et al., 2007, Whitmire et al., 2010). Whitmire et al. (2010) ont comparé des mesures de rétrodiffusion effectuées sur des cultures de phytoplancton, par le biais d'un néphélomètre (Hobilabs Hydrosat), avec les estimations de Stramski et al. (2001) basées sur la théorie de Mie. Les valeurs mesurées par Whitmire et al. (2010) sont un à deux ordres de grandeur supérieurs à celles simulées par Stramski et al. (2001). Notons que les mesures effectuées sont des mesures dites totales car elles sont impactées par l'ensemble des constituants optiquement significatifs dans l'eau. Ce type de mesures est donc moins sensible aux variations optiques d'un compartiment spécifique (e.g., compartiment phytoplanctonique). C'est pourquoi, Whitmire et al. (2010) ont restreint leurs analyses à la phase exponentielle afin de limiter l'impact des particules non algales (bactéries hétérotrophes, détritus) sur le signal mesuré.

De nombreuses études ont souligné l'importance d'étudier plus précisément la façon dont l'état physiologique des cellules influence la diffusion. En effet, selon la phase de croissance de la population (phase exponentielle, stationnaire ou de sénescence) et les conditions de croissance (l'éclairement, la température, la concentration en nutriment), la morphologie et la structure interne des cellules changent (Stephens, 1995, Osborne and Raven, 1986, Rosen and Lowe, 1984, Blasco et al., 1982, Haupt.W and Sheuerlein.R, 1990). Ces variations intra-cellulaires pourraient donc être à l'origine de variations du

signal rétrodiffusé. Cependant il paraît difficile d'effectuer ce type d'analyse par le biais de capteurs effectuant des mesures totales (e.g., Hobilabs Hydrosocat, WetLabs ECO-BB ou ECO-VSF).

La cytométrie est un des outils capables d'analyser de manière directe la diffusion individuelle des particules. Cet instrument permet de dénombrer, d'identifier, et de classer chaque particule en analysant les signaux de diffusion et aussi de fluorescence émis par les pigments intracellulaires. Ce type de mesure permettrait d'analyser les propriétés optiques d'un seul compartiment et d'obtenir des informations sur le type de particules analysées. Cunningham and Buonacorsi (1992) ont utilisé la cytométrie afin d'analyser la diffusion avant de quatre espèces phytoplanctoniques. Les résultats ont montré que si l'on se limite à la diffusion avant, les cellules peuvent être assimilées à des objets diffractants. Ainsi, ce type de mesures pourrait être utilisée pour estimer la taille et la forme des cellules. Lors d'une autre étude, Ackleson et al. (1988) ont utilisé la cytométrie afin d'analyser les variations de signaux diffusés par des cultures de *D. tertiolecta* induites par des dilutions. Les mesures cytométriques ont été couplées avec des simulations de Mie afin d'obtenir la section efficace différentielle de diffusion. Les résultats ont montré que les modifications optiques semblaient être dues à des variations de l'indice réel de réfraction en raison d'un réarrangement de la structure interne des cellules. Plus récemment, Green et al. (2003b) ont développé une méthode pour estimer l'indice de réfraction complexe et la taille des particules en combinant eux aussi des mesures de cytométrie en flux avec des simulations basées sur la théorie de Mie. Cette méthode a été testée dans les eaux du plateau continental de la Nouvelle-Angleterre afin de quantifier la contribution du phytoplancton des autres particules aux IOPs (Green et al., 2003a). Les résultats ont montré que les coefficients d'absorption et de diffusion estimés à partir de mesures cytométriques et de simulations de Mie étaient proches de ceux mesurés. Cependant, dans certains cas, par exemple durant une floraison phytoplanctonique, la méthode mène à des estimations ambiguës. Les auteurs ont clairement indiqué qu'une nouvelle approche devait être développée afin d'aller au-delà du postulat d'une sphère homogène.

Le cytomètre en flux de type Cytosense a été spécialement conçu pour l'analyse du compartiment phytoplanctonique. Il permet de mesurer la diffusion avant et de côté aussi bien que la fluorescence de chaque particule passant à travers un faisceau laser. Contrairement aux cytomètres "classiques", qui enregistrent seulement la valeur maximale du signal diffusé, le Cytosense enregistre tout le profil de la particule (plusieurs points par particule). Les profils sont utilisés pour obtenir des informations supplémentaires sur la taille et la structure interne de la cellule et permettent une meilleure classification des espèces. Malgré le large panel d'applications qu'offre le Cytosense, il n'a que rarement été utilisé dans le cadre de l'optique marine.

Dans ce contexte, les principaux objectifs de ma thèse étaient d'utiliser le Cytosense afin de parfaire nos connaissances sur le coefficient de rétrodiffusion en ayant une meilleure compréhension de l'influence des paramètres structurels et morphologiques des cellules phytoplanctoniques sur la rétrodiffusion. Un autre objectif de cette thèse était d'utiliser le Cytosense afin d'analyser les propriétés optiques des cellules phytoplanctoniques au-delà de la phase exponentielle. Ces études sont des étapes préliminaires aux applications de la télédétection de la couleur de l'eau dont le signal est proportionnel à la rétrodiffusion (Morel and Gentili, 1991). Savoir comment le coefficient de rétrodiffusion évolue avec la phase de croissance est indispensable pour l'interprétation des données collectées lors de la dynamique d'une floraison de phytoplanctons.

Afin de répondre aux objectifs, une expérience microcosme a été menée au Laboratoire d'Océanologie et de Géoscience (LOG) sur deux espèces phytoplanctoniques (*Thalassiosira pseudonana* et *Chlamydomonas concordia*). L'expérience s'est étalée sur une période de 20 jours afin d'étudier les propriétés optiques des cellules sur différentes phases de croissance. Des mesures optiques (absorption, rétrodiffusion), biogéochimiques (Chlorophylle-*a*, carbone organique particulaire, matière organique dissoute colorée), cytométriques et des observations au microscope à balayage électronique (MEB) ont été réalisées. Les observations au MEB seront utilisées afin d'avoir des informations sur la structure de la cellule (épaisseur de la paroi et forme). L'une des originalités de cette thèse est de coupler les

mesures *in situ* avec des simulations de diffusion simple. Différents codes de diffusion simple ont été utilisés afin de simuler les propriétés optiques de sphères homogènes (code de Mie), de cylindres, sphéroïdes et agrégats avec une orientation fixe (codes T-Matrix et Generalized Multiparticle Mie-solution) et des sphères concentriques (code Scattnlly). Les simulations ont été utilisées afin d'expliquer les tendances du signal diffusé, mesuré par le cytomètre en flux de type Cytosense.

Cette thèse est composée de quatre parties. Afin de faciliter la compréhension de ce manuscrit, la première partie (chapitres 1 et 2) est consacrée à la description du formalisme utilisé dans les codes de diffusion simple et du formalisme de l'optique marine. La deuxième partie (chapitres 3 et 4) présente les conditions expérimentales, les protocoles utilisés pour les diverses mesures et observations ainsi que les codes de diffusion simple utilisés. La troisième partie (chapitres 5 à 7) est constitué d'un préambule permettant d'introduire la méthode développée par Duforêt-Gaurier et al. (2015) qui est utilisée pour estimer la section efficace avant, de côté et de rétrodiffusion à partir de mesures Cytosense. Cette méthode a été testée avec succès sur différentes billes traçables NIST (National Institute of Standards and Technology) en polystyrène et en silice non absorbantes. La description de cette méthode été indispensable dans la mesure où la première étape de cette thèse était de vérifier sa validité sur des cultures de phytoplancton (*Thalassiosira pseudonana* et *Chlamydomonas concordia*) (chapitre 5). Dans un premier temps, l'impact de la polarisation des particules non sphériques sur le signal mesuré par le Cytosense a été analysé par le biais de simulations théoriques. Ensuite, comme aucune mesure *in situ* de section efficace avant et de côté n'est disponible, les estimations sont comparées avec des valeurs simulées. Les sections efficaces de rétrodiffusion sont, quant à elles comparées avec des valeurs référencées. La deuxième étape de ce travail, exposé dans le chapitre 6, est consacrée à l'analyse les efficacités de diffusion avant et de côté des deux espèces phytoplanctoniques au cours de différentes phases de croissance. De plus, les tendances observées ont été expliquées par le biais des simulations théoriques et des mesures optiques, biogéochimiques et des observations MEB. Cette thèse se termine par une étude de la relation entre la concentration en POC et le coefficient de rétrodiffusion des deux

espèces. Cette relation est extrêmement variable et affecte l'estimation du [POC] par mesures optiques. Différents compartiments ont pu être analysés par le biais du Cytosense et du cytomètre en flux de type FACSCalibur. Dans le cadre de cette thèse, le FACSCalibur a été utilisé afin d'énumérer les bactéries hétérotrophes. Les relations établies pour *Thalassiosira pseudonana* et *Chlamydomonas concordia* ont été analysées en prenant en compte l'impact des cellules phytoplanctoniques, des cellules en dégénérescence et des bactéries hétérotrophes. Enfin la quatrième partie présente succinctement les conclusions générales et les perspectives de ce travail de thèse.

PREMIÈRE PARTIE

Cadre théorique

Formalisme des codes de diffusion simple

Le but de ce chapitre est de présenter succinctement l'ensemble du formalisme qui sera utilisé dans les codes de diffusion simple. Ce chapitre n'a pas pour objectif d'effectuer une revue complète de la théorie telle qu'elle est présentée dans de nombreux ouvrages (Mishchenko et al., 2002, Bohren and Huffman, 1983, Van de Hulst, 1981) mais d'introduire les principales notions utilisées dans cette thèse et de comprendre les entrées et les sorties utilisées dans les codes de diffusion simple introduits dans le chapitre 4.

1.1 Onde électromagnétique monochromatique

Une onde électromagnétique monochromatique de longueur d'onde λ (Fig. 1.1) est composée de deux champs : l'un électrique \mathbf{E} et l'autre magnétique \mathbf{B} , toujours perpendiculaires l'un à l'autre. L'analyse de l'un des deux permet de décrire l'autre. Le plan formé entre les directions de \mathbf{E} et \mathbf{B} est appelé le plan d'onde. Une onde est dite plane lorsque ses fronts d'ondes sont des plans parallèles infinis. De manière simple, les fronts d'ondes sont des surfaces qui relient l'ensemble des points situés à la même distance de la source ; ces points sont dits en "phase". Lorsque l'on considère l'interaction entre une onde incidente plane et un objet diffusant, l'onde diffusée est sphérique. Une onde est dite sphérique lorsque ses fronts d'ondes sont des surfaces sphériques. Afin de considérer, localement, les ondes sphériques comme des ondes planes, nous nous placerons dans l'approximation de champ lointain ("far-field-zone"). Les conditions de validité de cette

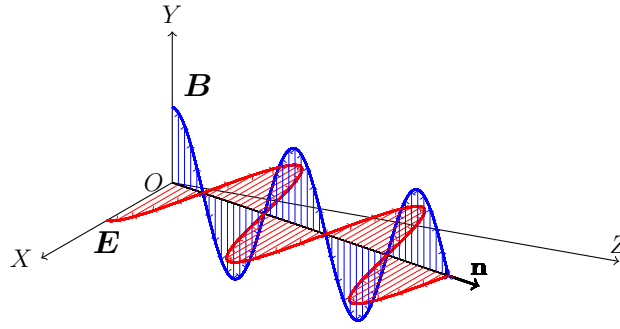


FIGURE 1.1 – Représentation d'une onde électromagnétique monochromatique plane.

approximation sont (Mishchenko, 2002, Mishchenko et al., 2002) :

$$R \gg r \text{ et } kR \gg 1, \quad (1.1)$$

avec R , la distance par rapport au centre de l'objet diffusant ; r , le rayon de l'objet diffusant ; et, k le nombre d'onde. k est défini de la manière suivante :

$$k = \frac{2\pi}{\lambda_r} \text{ où } \lambda_r = \frac{\lambda}{m(\lambda)}, \quad (1.2)$$

avec λ_r la longueur d'onde par rapport au milieu environnant et $m(\lambda)$ l'indice de réfraction complexe du milieu environnant ($m(\lambda) = m_r(\lambda) + i m_i(\lambda)$). La partie réelle (m_r) détermine la vitesse de l'onde ($v(\lambda) = c/m_r(\lambda)$; c , la vitesse de la lumière dans le vide). La partie imaginaire (m_i) agit sur l'absorption de la lumière qui se propage à travers le milieu. Dans un milieu homogène, la direction de propagation d'une onde plane électromagnétique est définie, soit par un vecteur unitaire \mathbf{n} , colinéaire à la direction de propagation, soit de manière équivalente par un couple (θ, ϕ) où $\theta \in [0, \pi]$ est l'angle zénithal et $\phi \in [0, 2\pi]$ est l'angle azimuthal (Mishchenko, 2002, Mishchenko et al., 2002). Le plan formé par la direction de propagation de l'onde et par l'axe (OZp) (Fig. 1.2) se nomme le plan méridien. Il est défini par un vecteur \mathbf{n}_\perp , perpendiculaire au plan, et par un vecteur \mathbf{n}_\parallel , parallèle au plan de telle sorte que $\mathbf{n}_\perp \times \mathbf{n}_\parallel = \mathbf{n}$. Le champ \mathbf{E} se décompose suivant \mathbf{n}_\perp

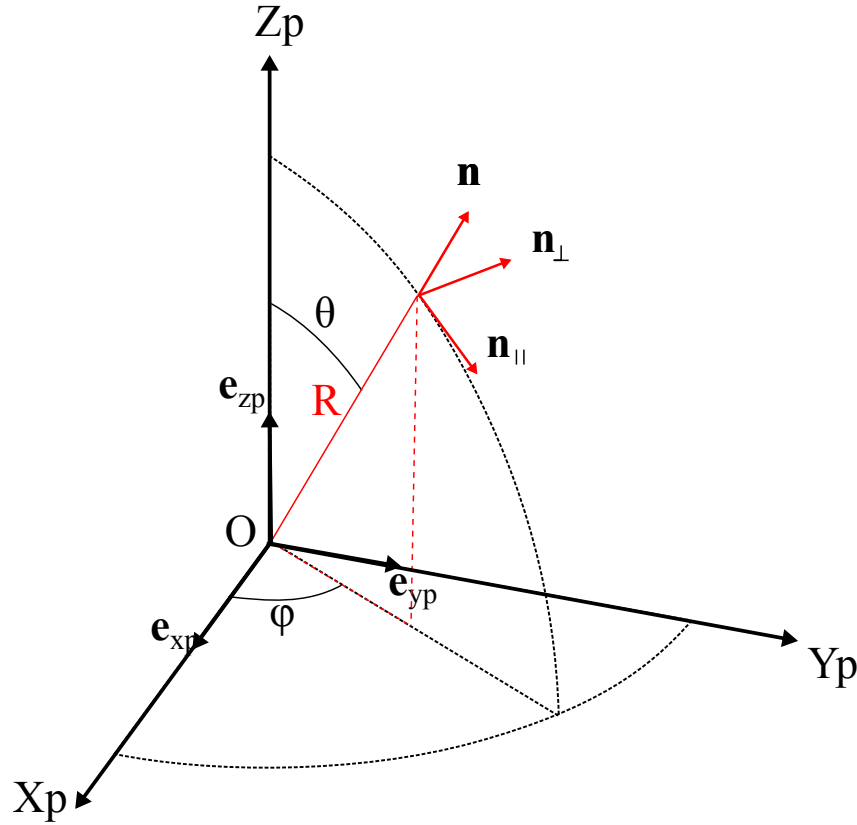


FIGURE 1.2 – Système de coordonnées utilisé pour décrire la direction de propagation d'une onde électromagnétique.

et \mathbf{n}_{\parallel} :

$$\begin{aligned} \mathbf{E}(\mathbf{R}, \lambda) &= (E_{0\parallel}\mathbf{n}_{\parallel} + E_{0\perp}\mathbf{n}_{\perp})\exp(ik\mathbf{n}\cdot\mathbf{R} - i\omega t) = E_{\parallel}(\mathbf{R}, \lambda)\mathbf{n}_{\parallel} + E_{\perp}(\mathbf{R}, \lambda)\mathbf{n}_{\perp} \\ &= \mathbf{E}_0\exp(ik\mathbf{n}\cdot\mathbf{R} - i\omega t), \end{aligned} \quad (1.3)$$

avec ω , la fréquence angulaire; t , le temps; \mathbf{R} , le vecteur de position de norme R (la distance par rapport à l'origine du repère; Fig. 1.2); $E_{0\perp}$ et $E_{0\parallel}$, l'amplitude de l'onde selon la composante perpendiculaire et selon la composante parallèle. Dans la suite du manuscrit, la dépendance de E_{\perp} et E_{\parallel} selon λ sera omise afin de ne pas alourdir les équations.

1.2 Onde électromagnétique polarisée

On appelle direction de polarisation d'une onde, la direction prise, en fonction du temps, par \mathbf{E} dans le plan d'onde (plan perpendiculaire à la direction de propagation

n). Une onde peut être polarisée de manière rectiligne, circulaire ou elliptique. Notons que le rayonnement solaire est non polarisé car l'orientation du champ électrique \mathbf{E} est aléatoire.

L'intensité et l'état de polarisation d'une onde électromagnétique monochromatique à longueur d'onde λ donnée peuvent être décrits par un vecteur colonne \mathbf{I} , nommé vecteur de Stokes (Van de Hulst, 1981, Mishchenko et al., 2002, Bohren and Huffman, 1983) :

$$\mathbf{I} = \begin{bmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{bmatrix}, \quad (1.4)$$

avec I , Q , U et V les paramètres de Stokes (W.m^{-2}). I est l'intensité totale transportée par l'onde. Les paramètres de Stokes Q et U décrivent l'état de polarisation linéaire et V , l'état de polarisation circulaire. Les paramètres de Stokes sont homogènes à des intensités lumineuses, algébriques et additifs. Ils peuvent s'écrire de la manière suivante (Mishchenko et al., 2002) :

$$\begin{bmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{bmatrix} = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\varepsilon}{\mu}} \begin{bmatrix} |E_{\parallel}|^2 + |E_{\perp}|^2 \\ |E_{\parallel}|^2 - |E_{\perp}|^2 \\ -E_{\parallel}E_{\perp}^* - E_{\perp}E_{\parallel}^* \\ i(E_{\perp}E_{\parallel}^* - E_{\parallel}E_{\perp}^*) \end{bmatrix}, \quad (1.5)$$

avec ε et μ respectivement la permittivité et la perméabilité du milieu, $| \cdot |$ désigne le module et l'astérisque le complexe conjugué. Rappelons que la dépendance de E_{\parallel} et E_{\perp} avec la longueur d'onde a été omise pour ne pas alourdir l'équation.

Pour une onde partiellement polarisée, le premier terme I satisfait la relation générale :

$$I^2 > Q^2 + U^2 + V^2 \quad (1.6)$$

et le rapport :

$$P = \frac{[Q^2 + U^2 + V^2]^{1/2}}{I} : = \frac{I^P}{I}, \quad (1.7)$$

est appelé le degré de polarisation avec I^P , l'intensité de lumière polarisée.

1.3 Diffusion du rayonnement par une particule

Afin de décrire la diffusion d'un rayonnement monochromatique polarisé par une particule, nous devons définir en premier lieu la matrice de diffusion, $\mathbf{F}(\Theta)$. $\mathbf{F}(\Theta)$ relie les paramètres de Stokes du rayonnement incident, \mathbf{I}_i , aux paramètres de Stokes du rayonnement diffusé, \mathbf{I}_d . La matrice de diffusion est définie dans le plan de diffusion, formé par la direction de l'onde incidente, \mathbf{n}^i , et diffusée, \mathbf{n}^d (plan hachuré en vert ; Fig. 1.3b). L'angle de diffusion Θ est l'angle entre \mathbf{n}^i et \mathbf{n}^d . $\mathbf{F}(\Theta)$ est une matrice (4×4) où les 16 éléments, $F_{ij}(\Theta)$ (dimension m^2), dépendent des propriétés optiques de la particule. Pour rappel, \mathbf{I}_i est défini dans le plan méridien d'incidence (plan hachuré en bleu ; Fig. 1.3a) et \mathbf{I}_d est défini dans le plan méridien de diffusion (plan hachuré en rouge ; Fig. 1.3a). Connaissant $\mathbf{F}(\Theta)$, il est possible de calculer la matrice de phase, $\mathbf{Z}(\Theta)$, qui relie \mathbf{I}_i et \mathbf{I}_d par rapport à leur plan méridien respectif. Comme $\mathbf{F}(\Theta)$ est définie dans le plan de diffusion, une matrice de rotation, $\mathbf{L}(\sigma_1)$, est appliquée aux paramètres de Stokes du rayonnement incident pour passer du plan méridien d'incidence au plan de diffusion. Après avoir appliqué $\mathbf{F}(\Theta)$, une deuxième matrice de rotation, $\mathbf{L}(\sigma_2 - \pi)$, est utilisée afin de calculer les paramètres de Stokes du rayonnement diffusé par rapport au plan méridien de diffusion. Ainsi, le calcul de $\mathbf{Z}(\Theta)$ est défini de la manière suivante :

$$\mathbf{Z}(\theta^d, \phi^d, \theta^i, \phi^i) = \mathbf{L}(\sigma_2 - \pi) \mathbf{F}(\Theta) \mathbf{L}(\sigma_1), \quad (1.8)$$

avec :

$$\mathbf{L}(\eta) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos(2\eta) & -\sin(2\eta) & 0 \\ 0 & \sin(2\eta) & \cos(2\eta) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (1.9)$$

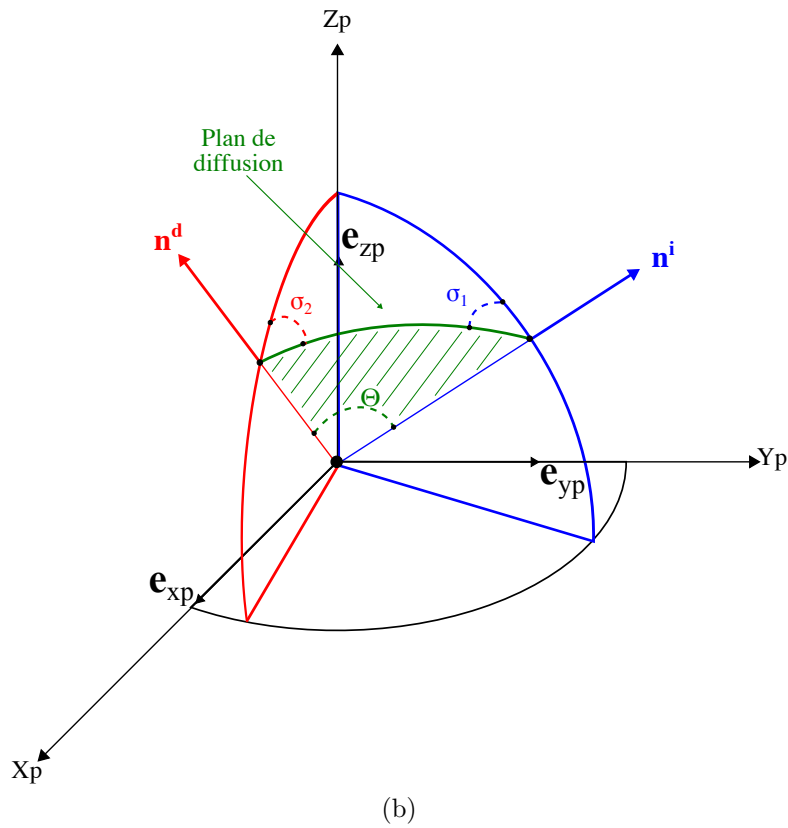
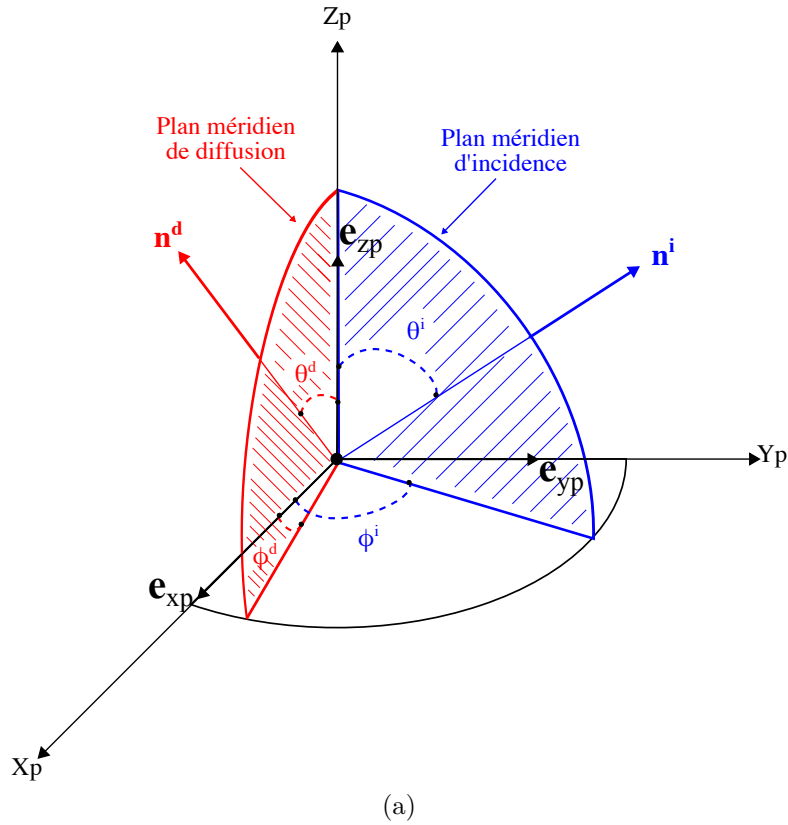


FIGURE 1.3 – Diffusion d’une particule (placée au centre du repère). Les directions du rayonnement incident et diffusé sont données, respectivement, par les vecteurs \mathbf{n}^i et \mathbf{n}^d . \mathbf{n}^i est représenté par le couple d’angle (θ^i, ϕ^i) et \mathbf{n}^d par le couple (θ^d, ϕ^d) . Le schéma (a) présente le plan méridien d’incidence (hachuré en bleu) et le plan méridien de diffusion (hachuré en rouge). Le schéma (b) présente le plan de diffusion (hachuré en vert).

où η est égal à σ_1 ou $\sigma_2 - \pi$. σ_1 est l'angle entre le plan méridien d'incidence et le plan de diffusion, tandis que σ_2 est l'angle formé entre le plan de diffusion et le plan méridien de diffusion (Fig. 1.3b).

Les angles Θ , σ_1 et σ_2 peuvent être calculés à partir des angles θ^i , θ^d , ϕ^i et ϕ^d comme suit :

$$\cos(\Theta) = \cos(\theta^d)\cos(\theta^i) + \sin(\theta^d)\sin(\theta^i)\cos(\phi^d - \phi^i), \quad (1.10)$$

$$\cos(\sigma_1) = \frac{\cos(\theta^d) - \cos(\theta^i)\cos(\Theta)}{\sin(\theta^i)\sin(\Theta)}, \quad (1.11)$$

$$\cos(\sigma_2) = \frac{\cos(\theta^i) - \cos(\theta^d)\cos(\Theta)}{\sin(\theta^d)\sin(\Theta)}. \quad (1.12)$$

Une deuxième grandeur est nécessaire pour caractériser la diffusion d'une particule. Il s'agit de la section efficace de diffusion, σ_d (m^2). De manière générale, cette grandeur physique est reliée à la probabilité d'interaction entre le faisceau incident et la particule. Elle représente une surface effective d'interaction, normale à la direction incidente, entre le rayonnement et la particule (Mobley, 1994, Van de Hulst, 1981). La multiplication de la section efficace de diffusion par l'intensité incidente (W.m^{-2}) représente la puissance diffusée dans tout l'espace. La section efficace de diffusion est définie de cette manière :

$$\sigma_d(\lambda) = \frac{R^2}{I_i(\lambda, \mathbf{n}^i)} \int_{4\pi} I_d(\lambda, \mathbf{n}^d) d\mathbf{n}^d, \quad (1.13)$$

avec I_i et I_d , l'intensité incidente et diffusée. L'intensité diffusée est définie par :

$$I_d = \frac{1}{R^2} (Z_{11}I_i + Z_{12}Q_i + Z_{13}U_i + Z_{14}V_i). \quad (1.14)$$

Notons que, dans l'Eq. (1.14), les dépendances selon λ , \mathbf{n}^i et \mathbf{n}^d sont omises par soucis de clarté. En associant les équations (1.13) et (1.14), nous observons que $\sigma_d(\lambda)$ dépend à la fois de l'intensité du rayonnement incident mais aussi de son état de polarisation (présence des termes Q_i , U_i et V_i dans l'expression de $\sigma_d(\lambda)$).

La section efficace de diffusion peut être aussi définie comme étant le produit de la section géométrique (section projetée perpendiculairement au faisceau incident), G (m^2), et du facteur d'efficacité de diffusion, Q_d (sans unité), de la particule :

$$\sigma_d(\lambda) = Q_d(\lambda) \times G. \quad (1.15)$$

Le facteur d'efficacité de diffusion est le ratio entre la puissance diffusée par la particule et la puissance interceptée par la section géométrique (Bricaud and Morel, 1986, Mobley, 1994, Stramski et al., 2004, Morel and Bricaud, 1986, Clavano et al., 2007). En d'autres termes, l'efficacité de diffusion représente la capacité qu'a la particule à diffuser. Si nous considérons que la particule est homogène et sphérique (postulat de la théorie de Mie), le facteur d'efficacité dépendra de l'indice de réfraction, m , et du paramètre de taille, $s=\pi d/\lambda$ (avec d le diamètre de la particule), de la particule (Bohren and Huffman, 1983, Van de Hulst, 1981). Cependant, dans le cas plus général d'une particule non sphérique et non homogène, le facteur d'efficacité dépendra à la fois de l'indice de réfraction de la particule, du paramètre de taille, mais aussi de l'hétérogénéité (distribution non homogène de l'indice de réfraction), et de la forme de la particule (Clavano et al., 2007, Morel and Bricaud, 1986, Stramski et al., 2004, Van de Hulst, 1981, Stramski and Reynolds, 1993).

1.3.1 Diffusion du rayonnement par une particule sphérique

Si l'on considère une particule sphérique, les propriétés optiques de la particule deviennent indépendantes de la direction d'incidence (\mathbf{n}^i) et de l'orientation du plan de diffusion, et dépendent uniquement de l'angle de diffusion Θ . Il est plus aisé de considérer un faisceau incident orienté selon l'axe vertical \mathbf{e}_z , de telle manière à avoir $\theta^i = \phi^i = 0^\circ$. Ainsi, l'angle de diffusion (Θ) est égal à l'angle zénithal θ^d (Eq. 1.10). De plus, en superposant les plans méridiens d'incidence et de diffusion de telle manière à avoir $\phi^i = \phi^d = 0^\circ$, la matrice de diffusion devient uniquement fonction de θ^d , nommé θ dans la suite. La symétrie sphérique implique que le nombre d'éléments composant la matrice de diffusion, F_{ij} , passe de 16 à 8. Notons également que, pour les particule sphérique, $F_{11}(\theta) = F_{22}(\theta)$

et $F_{33}(\theta) = F_{44}(\theta)$. Ainsi, la matrice de diffusion ne dépend que de 4 éléments :

$$\mathbf{F}(\theta) = \begin{bmatrix} F_{11}(\theta) & F_{12}(\theta) & 0 & 0 \\ F_{12}(\theta) & F_{11}(\theta) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & F_{33}(\theta) & F_{34}(\theta) \\ 0 & 0 & -F_{34}(\theta) & F_{33}(\theta) \end{bmatrix}. \quad (1.16)$$

1.3.2 Diffusion du rayonnement par une particule non sphérique avec une orientation fixe

Dans le cadre de cette thèse, nous avons considéré des particules non sphériques ayant un plan de symétrie, e.g. cylindres et sphéroïdes (Fig. 1.4). On caractérise le cylindre par son excentricité, ϵ , égale au ratio entre le diamètre et la longueur du cylindre ($\epsilon = D_{cyl}/L_{cyl}$), et par le rayon d'une sphère équivalente ayant la même surface ou le même volume : r_s ou r_v respectivement (Mishchenko and Travis, 1998). De manière analogue au cylindre, la sphéroïde peut être définie par la valeur de l' ϵ (rapport entre l'axe horizontal a et l'axe vertical b) et par la valeur r_s ou r_v (Mishchenko and Travis, 1998, Clavano et al., 2007) (Fig. 1.4b). Notons que pour tout type de particules non sphériques, si l' ϵ est supérieur à 1, la particule est dite prolata alors que si l' ϵ est inférieur à 1, la particule est dite oblate.

La diffusion des particules non sphériques avec une orientation fixe est un cas particulier en transfert radiatif dans la mesure où il faut caractériser l'orientation de la particule par rapport à la direction du rayonnement incident (Mishchenko, 2000, Mishchenko et al., 2002).

L'orientation de la particule se fait par rapport au repère du laboratoire, dit de référence, nommé L_r . C'est un système de coordonnées cartésiennes défini par un point d'origine O et trois axes (OX, OY, OZ) fixés dans l'espace (système de coordonnées en bleu ; Figs. 1.5 - 1.7). Le repère de la particule, L_p , est un système de coordonnées cartésiennes ayant pour origine O (même point d'origine que L_r) les axes sont $(OX_p), (OY_p)$ et (OZ_p)

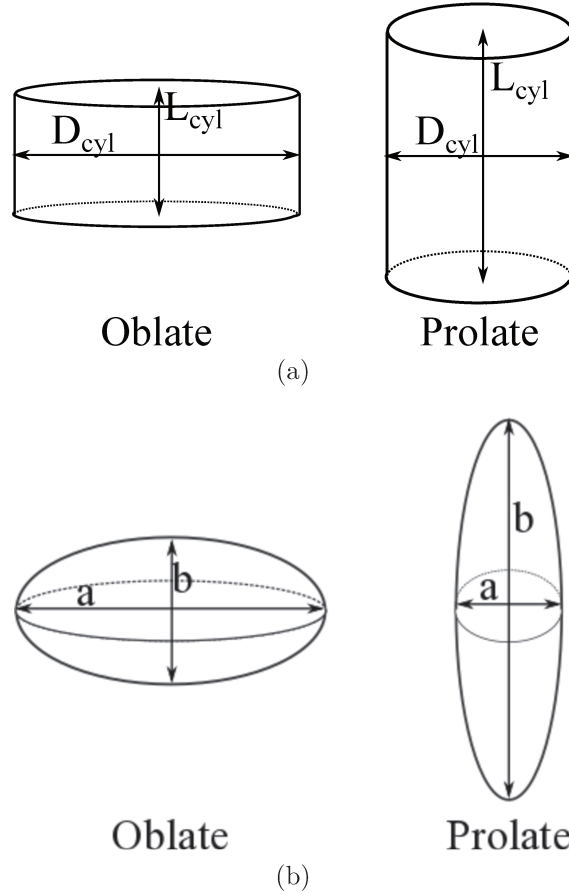


FIGURE 1.4 – Illustration de (a) cylindres oblates ($D_{cyl}/L_{cyl} < 1$) et prolates ($D_{cyl}/L_{cyl} > 1$) et de (b) sphéroïdes oblates ($a/b < 1$) et prolates ($a/b > 1$).

(système de coordonnées en rouge; Figs. 1.5 - 1.7). Une fois les systèmes de coordonnées fixés (e.g. Etape 1 dans les Figs. 1.6 et 1.7), la définition de l'orientation de la particule, c'est à dire, L_p par rapport à L_r , s'effectue par le biais de trois angles d'Euler α , β et γ (Fig. 1.5 et étapes 2 des Figs. 1.6 et 1.7). Ce sont des angles de rotation qui permettent de transformer le repère L_r en L_p . La concordance de L_r et L_p s'obtient en trois étapes successives :

1. Rotation autour de e_z d'un angle $\alpha \in [0, 2\pi]$ réorientant l'axe (OY) de manière à ce qu'il coïncide avec la ligne des noeuds qui est la ligne formée par l'intersection des plans (OXY) (plan hachuré en orange; Fig. 1.7) et (OX_pY_p) (plan hachuré en vert; Fig. 1.7);
2. Rotation autour du nouvel axe (OY) d'un angle $\beta \in [0, \pi]$ afin que les vecteurs e_z et e_{z_p} coïncident;

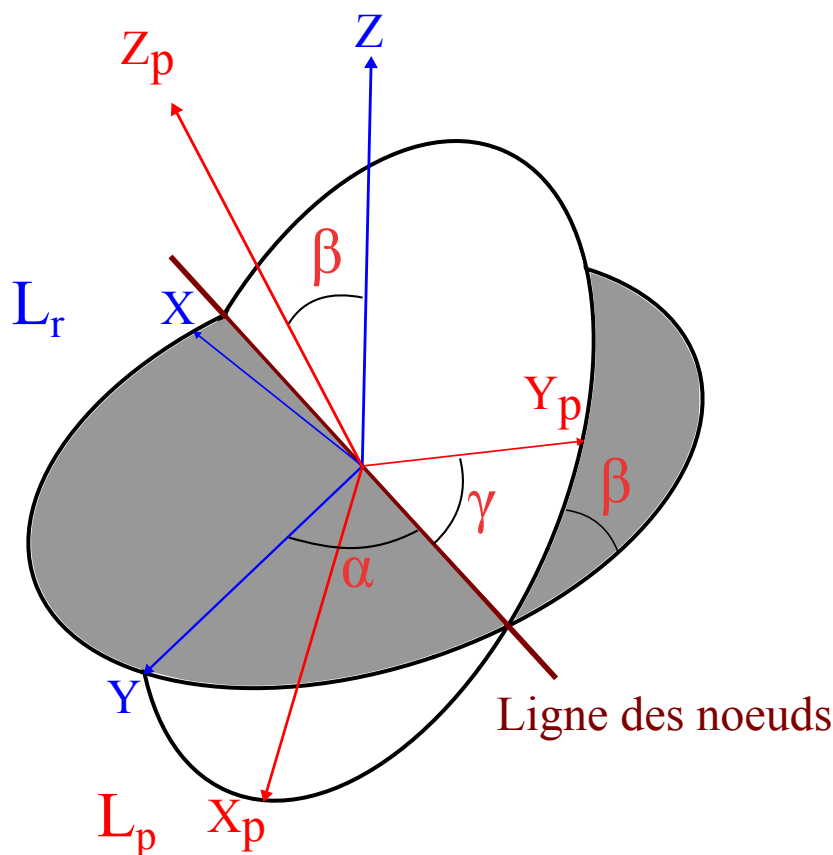
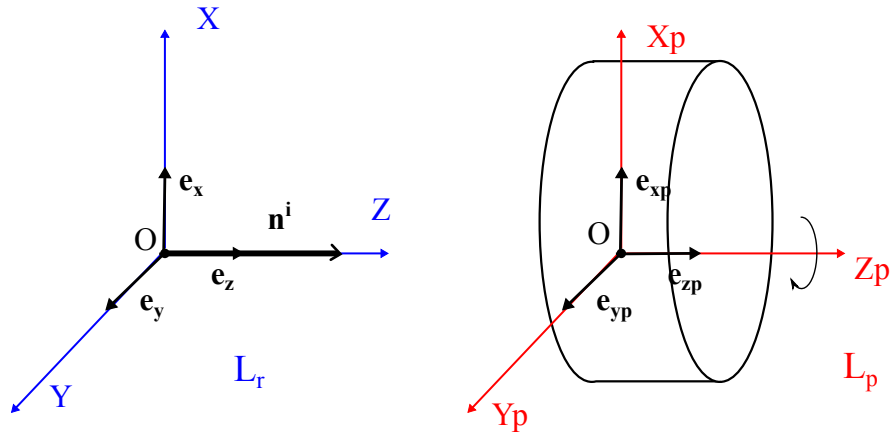


FIGURE 1.5 – Angles d’Euler de rotations α , β et γ transformant L_r (système de coordonnées en bleu) en L_p (système de coordonnées en rouge) (schéma adapté à partir de Mishchenko et al. (2002)).

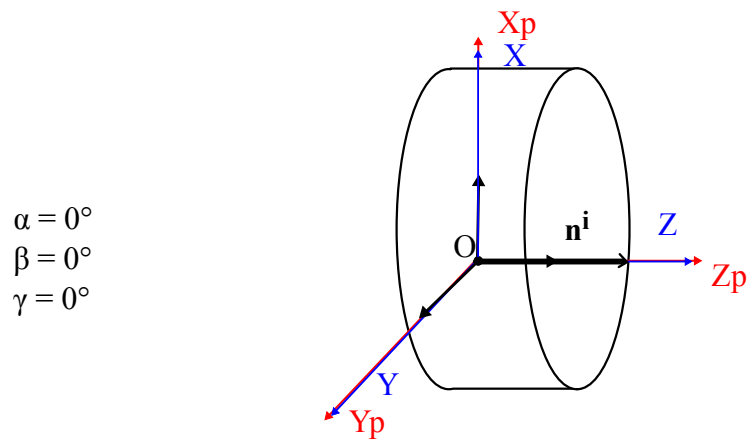
3. Rotation autour de l’axe (OZ_p) d’un angle $\gamma \in [0, 2\pi]$.

Pour les particules ayant un axe de symétrie (e.g. sphéroïdes, cylindres), on oriente souvent e_{z_p} selon l’axe de symétrie de la particule. Ce postulat implique que, dans les codes de diffusion simple, les développements mathématiques sont moins complexes, ce qui facilite la résolution des équations. De plus, si la particule possède un axe de symétrie orienté selon l’axe (OZ) , l’orientation de la particule par rapport à L_r est indépendante de l’angle d’Euler γ (Mishchenko, 2000, Mishchenko et al., 2002).

Les figures 1.6 et 1.7 présentent deux cas de figure qui seront étudiés dans cette thèse : un cylindre oblate et un cylindre prolata se présentant avec leur plus grand axe orienté perpendiculairement au faisceau incident dont la direction est indiquée par \mathbf{n}^i . Ainsi, l’axe (OZ) est parallèle à l’axe (OZ_p) dans le cas du cylindre oblate (Fig. 1.6), et perpendiculaire à l’axe (OZ_p) dans le cas du cylindre prolata (Fig. 1.7). Concernant le cylindre oblate, aucune rotation n’est nécessaire puisque le repère de référence et le repère de la particule



Etape 1 : définition des axes



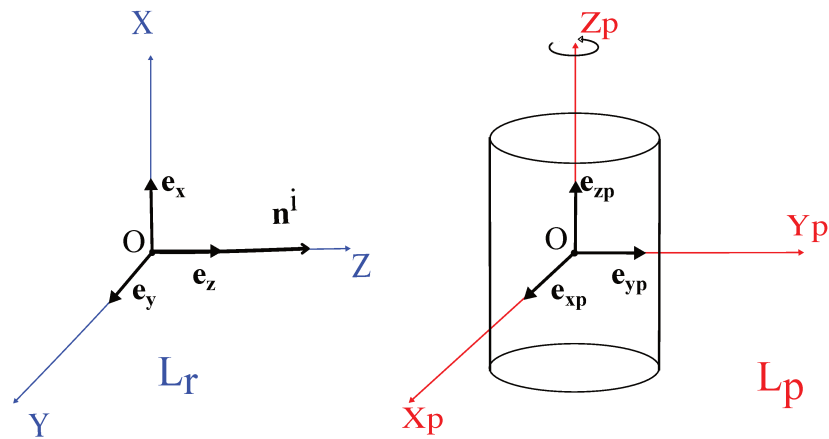
Etape 2 : Concordance des deux systèmes de coordonnées

FIGURE 1.6 – Illustration des différentes étapes visant à transformer le repère L_r (système de coordonnées en bleu) en L_p (système de coordonnées en rouge) en utilisant les angles d'Euler pour un cylindre oblate.

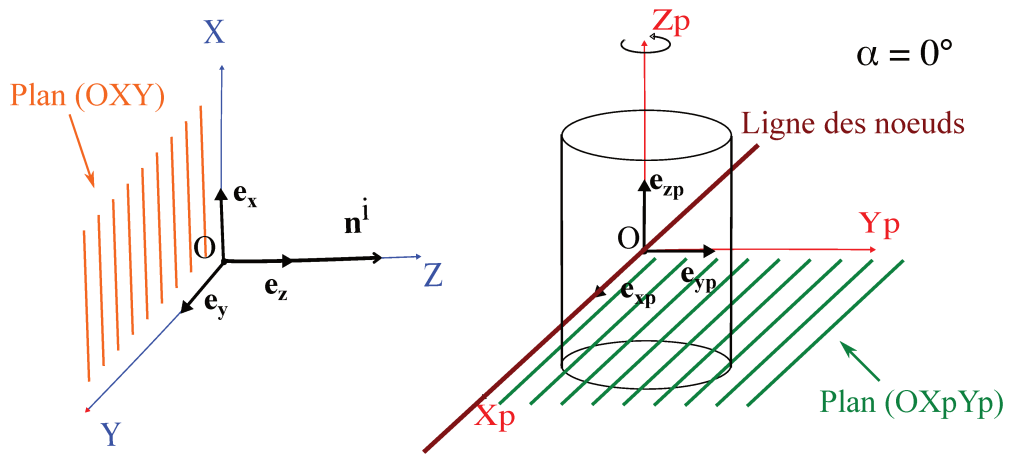
se superposent. Concernant le cylindre prolate, $\alpha = 0^\circ$ car l'axe des noeuds est dirigé selon e_y (étape 2; Fig. 1.7) et une rotation de 90° autour de l'axe des noeuds ($\beta = 90^\circ$) est nécessaire afin de réorienter e_{zp} selon e_z (étape 3; Fig. 1.7). Comme expliqué, $\gamma = 0^\circ$ car les cylindres possèdent une symétrie de révolution.

1.4 Caractérisation de la diffusion d'un ensemble de particules

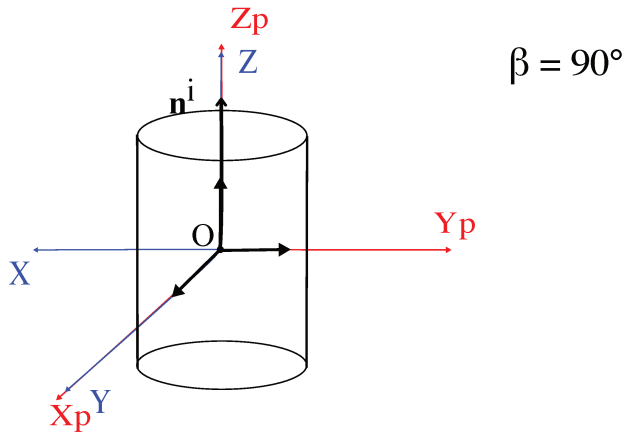
Dans le milieu naturel, les particules sont présentes en très grand nombre. Par exemple, Li (1995) référença, pour des cellules phytoplantoniques de petites tailles (entre $\approx 0,5$ et \approx



Etape 1: définition des axes



Etape 2: réorientation de l'axe (OY) selon la ligne des noeuds



Etape 3: concordance des axes (OZ) et (OZp)

Etape 4: symétrie de révolution $\Rightarrow \gamma = 0^\circ$

FIGURE 1.7 – Illustration des différentes étapes visant à transformer le repère L_r (système de coordonnées en bleu) en L_p (système de coordonnées en rouge) en utilisant les angles d'Euler pour un cylindre prolate.

1 μm), une concentration entre 10^4 et 10^5 cellules par cm^{-3} . On définit alors un élément de volume, dV , comme un ensemble de particules dont la taille, la forme, l'indice de réfraction et l'orientation varient. Dans un tel cas, la fonction de phase représentative de dV , $\mathbf{Z}_{\text{ens}}(\mathbf{n}^i, \mathbf{n}^d)$, est :

$$\mathbf{Z}_{\text{ens}}(\mathbf{n}^i, \mathbf{n}^d) = \sum_{n=1}^N \mathbf{Z}_n(\mathbf{n}^i, \mathbf{n}^d) = N \times \langle \mathbf{Z}(\mathbf{n}^i, \mathbf{n}^d) \rangle, \quad (1.17)$$

avec N , le nombre de particules dans dV , $\mathbf{Z}_n(\mathbf{n}^i, \mathbf{n}^d)$ la matrice de phase de chaque particule et $\langle \mathbf{Z}(\mathbf{n}^i, \mathbf{n}^d) \rangle$, la matrice de phase moyenne par particule (en m^2). Par exemple, considérons un élément de volume constitué de particules ellipsoïdes homogènes de même indice de réfraction et de demi-axes $a \in [a_{\min}, a_{\max}]$, $b \in [b_{\min}, b_{\max}]$ et $c \in [c_{\min}, c_{\max}]$. La matrice de phase moyenne par particule s'écrit :

$$\begin{aligned} \langle \mathbf{Z}(\mathbf{n}^i, \mathbf{n}^d) \rangle &= \int_{a_{\min}}^{a_{\max}} da \int_{b_{\min}}^{b_{\max}} db \int_{c_{\min}}^{c_{\max}} dc \int_0^{2\pi} d\alpha \int_0^\pi d\beta \sin(\beta) \int_0^{2\pi} d\gamma \quad (1.18) \\ & p(\alpha, \beta, \gamma, a, b, c) \times \mathbf{Z}(\mathbf{n}^i, \mathbf{n}^d; \alpha, \beta, \gamma, a, b, c), \end{aligned}$$

où $p(\alpha, \beta, \gamma, a, b, c)$, une fonction de densité de probabilité décrivant la taille et l'orientation de chaque particule, c'est-à-dire, l'orientation de L_p pour chaque particule par rapport à L_r . La densité de probabilité p est normée :

$$\int_{a_{\min}}^{a_{\max}} da \int_{b_{\min}}^{b_{\max}} db \int_{c_{\min}}^{c_{\max}} dc \int_0^{2\pi} d\alpha \int_0^\pi d\beta \sin(\beta) \int_0^{2\pi} d\gamma p(\alpha, \beta, \gamma, a, b, c) = 1. \quad (1.19)$$

Il est courant de supposer que la probabilité de taille, $p_s(a, b, c)$, et celle d'orientation, $p_o(\alpha, \beta, \gamma)$, des particules sont indépendantes. Ainsi, p est définie comme le produit de $p_s(a, b, c)$ et $p_o(\alpha, \beta, \gamma)$:

$$p(\alpha, \beta, \gamma, a, b, c) = p_s(a, b, c) p_o(\alpha, \beta, \gamma). \quad (1.20)$$

Concernant p_s , comme la forme et la taille d'un cylindre sont respectivement caractérisées par leur eps et leur r_s (section 1.3.2), p_s devient :

$$p_s(a, b, c) = p(eps)n(r_s), \quad (1.21)$$

avec $n(r_s)$, la distribution en taille des particules et $p(eps)$, la distribution de l'excentricité des sphéroïdes. Concernant p_o , comme nous avons pu le voir dans la section précédente, si les particules possèdent une symétrie de révolution, l'orientation est indépendante de γ et p_o se simplifie :

$$p_o(\alpha, \beta, \gamma) = \frac{1}{2\pi} p_o(\alpha, \beta). \quad (1.22)$$

À noter que dans le cas où il n'y a pas de force extérieure, les particules sont aléatoirement orientées. Ceci implique que toutes les orientations possibles des particules sont équiprobables. Ainsi :

$$p_o(\alpha, \beta, \gamma) = \frac{1}{8\pi^2}. \quad (1.23)$$

1.4.1 Cas d'un milieu diffusant macroscopiquement isotropique et possédant une symétrie miroir

Si l'on considère un élément de volume dans lequel les particules non sphériques sont orientées aléatoirement, ce milieu est dit macroscopiquement isotropique. La matrice de diffusion devient alors indépendante de la direction d'incidence \mathbf{n}^i et de l'orientation du plan de diffusion. Ainsi, la matrice de diffusion dépend uniquement de l'angle Θ . De plus, si l'on considère un milieu composé de particules ayant un plan de symétrie (e.g, cylindre et sphéroïde), le milieu est macroscopiquement isotropique et possède une symétrie miroir. Dans un tel cas, le nombre d'éléments de la matrice de diffusion caractérisant les propriétés

de diffusion de l'élément de volume $\mathbf{F}_{ens}(\Theta)$ passe de 16 à 6 (Mishchenko et al., 2002) :

$$\mathbf{F}_{ens}(\Theta) = \begin{bmatrix} F_{11}(\Theta) & F_{12}(\Theta) & 0 & 0 \\ F_{12}(\Theta) & F_{22}(\Theta) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & F_{33}(\Theta) & F_{34}(\Theta) \\ 0 & 0 & -F_{34}(\Theta) & F_{44}(\Theta) \end{bmatrix} = N \times \langle \mathbf{F}(\Theta) \rangle . \quad (1.24)$$

Notons que considérer des particules ayant un plan de symétrie fournit une bonne description numérique des propriétés optiques de diffusion d'un ensemble de particules rencontrées en pratique (Mishchenko et al., 2002). La matrice de diffusion étant indépendante de la direction d'incidence dans un tel milieu, nous pouvons choisir la direction d'illumination. Il sera supposé que \mathbf{n}^i est orienté selon \mathbf{e}_{zp} et que le plan (OX_pZ_p) (avec $x_p \geq 0$) est le plan méridien d'incidence (Fig. 1.8). Les angles θ^i , ϕ^i sont donc nuls. À partir de l'Eq. (1.10), nous observons que l'angle Θ est égal à l'angle θ^d , nommé θ dans la suite. Par ailleurs, comme le montre la figure 1.8, le plan de diffusion coïncide avec le plan méridien de diffusion. Ainsi, pour calculer les vecteurs de Stokes du faisceau diffusé, nous devons effectuer une rotation d'un angle ϕ^d pour passer du plan méridien d'incidence au

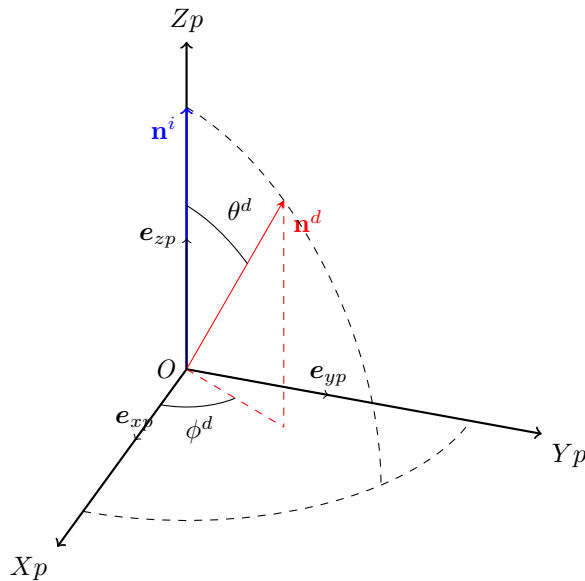


FIGURE 1.8 – Exemple de direction de propagation possible de l'onde incidente et diffusée

plan méridien de diffusion. Une seule matrice de rotation $\mathbf{L}(\phi^d)$ est donc nécessaire pour calculer la matrice de phase moyenne par particule :

$$\begin{aligned} \langle \mathbf{Z}(\theta, \phi^d) \rangle &= \langle \mathbf{F}(\theta) \rangle \mathbf{L}(\phi^d) \\ &= \begin{bmatrix} \langle F_{11}(\theta) \rangle & \langle F_{12}(\theta) \rangle \cos(2\phi^d) & -\langle F_{12}(\theta) \rangle \sin(2\phi^d) & 0 \\ \langle F_{12}(\theta) \rangle & \langle F_{22}(\theta) \rangle \cos(2\phi^d) & -\langle F_{22}(\theta) \rangle \sin(2\phi^d) & 0 \\ 0 & \langle F_{33}(\theta) \rangle \sin(2\phi^d) & \langle F_{33}(\theta) \rangle \cos(2\phi^d) & \langle F_{34}(\theta) \rangle \\ 0 & -\langle F_{34}(\theta) \rangle \sin(2\phi^d) & -\langle F_{34}(\theta) \rangle \cos(2\phi^d) & \langle F_{44}(\theta) \rangle \end{bmatrix} \end{aligned} \quad (1.25)$$

En combinant les équations (1.13), (1.14) et (1.25), la section efficace de diffusion d'un ensemble de particules, σ_{dens} , s'exprime de la manière suivante :

$$\sigma_{\text{dens}} = \int_{\theta=0}^{\theta=\pi} \int_{\phi^d=0}^{\phi^d=2\pi} [\langle F_{11}(\theta) \rangle I_i + \langle F_{12}(\theta) \rangle \cos(2\phi^d) Q_i - \langle F_{12}(\theta) \rangle \sin(2\phi^d) U_i] \sin(\theta) d\theta d\phi \quad (1.26)$$

Les intégrales de $\cos(2\phi^d)$ et $\sin(2\phi^d)$ entre 0 et 2π étant nulles, la section efficace de diffusion est égale à :

$$\sigma_{\text{dens}} = 2\pi \int_0^\pi \sin(\theta) \langle F_{11}(\theta) \rangle d\theta. \quad (1.27)$$

1.4.2 Normalisation de la matrice de diffusion et de la matrice de phase

Il est plus pratique de travailler avec une fonction de phase normalisée. Ainsi, $\mathbf{F}_{\text{ens}}(\theta)$ et les grandeurs issues de $\mathbf{F}_{\text{ens}}(\theta)$ simulées par différents codes seront directement comparables. La normalisation de la matrice de diffusion s'effectue de la manière suivante :

$$\tilde{\mathbf{F}}_{\text{ens}}(\theta) = \frac{4\pi}{\sigma_{\text{dens}}} \mathbf{F}_{\text{ens}}(\theta) = \frac{4\pi}{\langle \sigma_d \rangle} \langle \mathbf{F}(\theta) \rangle = \begin{bmatrix} a_1(\theta) & b_1(\theta) & 0 & 0 \\ b_1(\theta) & a_2(\theta) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & a_3(\theta) & b_2(\theta) \\ 0 & 0 & -b_2(\theta) & a_4(\theta) \end{bmatrix}, \quad (1.28)$$

avec $\langle \sigma_d \rangle$, la section efficace de diffusion moyenne par particule. De manière similaire à la matrice de diffusion, la matrice de phase normalisée de dV , notée $\tilde{\mathbf{Z}}_{ens}(\theta^d, \phi^d, \theta^i, \phi^i)$, est :

$$\tilde{\mathbf{Z}}_{ens}(\theta^d, \phi^d, \theta^i, \phi^i) = \frac{4\pi}{\sigma_{dens}} \mathbf{Z}_{ens}(\theta^d, \phi^d, \theta^i, \phi^i) = \frac{4\pi}{\langle \sigma_d \rangle} \langle \mathbf{Z}(\theta^d, \phi^d, \theta^i, \phi^i) \rangle. \quad (1.29)$$

Le premier terme (1,1) de la matrice de diffusion normalisée, $a_1(\Theta)$ (en sr^{-1}), est appelé fonction de phase. La fonction de phase est normalisée :

$$\int_0^\pi a_1(\theta) \sin(\theta) d\theta = 2. \quad (1.30)$$

Notons que cette relation est aussi valable en remplaçant $a_1(\theta)$ par \tilde{Z}_{11} . En effet, les deux termes sont égaux car le premier terme de la matrice de rotation \mathbf{L} est égal à 1. Ainsi, quelle que soit l'orientation des plans méridiens ou du plan de diffusion : $Z_{11} = F_{11}$.

Formalisme de l'optique marine

Le formalisme de l'optique marine étant différent de celui utilisé dans les codes de diffusion simple (e.g. notations et dimensions différentes), ce chapitre a pour objectif de relier ces deux formalismes. Notons que le formalisme de l'optique marine est présenté tel qu'il a été défini dans Mobley (1994).

2.1 Définitions des IOPs

L'eau de mer pure et les constituants qu'elle contient (e.g. particules en suspension, substances dissoutes, colloïdes et bulles d'air) impactent la propagation de la lumière à travers les processus d'absorption et de diffusion. Une partie est absorbée et une autre est diffusée de manière élastique ou inélastique (respectivement sans et avec changement de longueur d'onde). Notons que la diffusion inélastique, ne faisant pas l'objet de cette thèse, elle ne sera pas abordée dans ce chapitre. La diffusion et l'absorption, caractéristiques de l'eau de mer et de ses constituants optiquement significatifs, sont décrites par les propriétés optiques inhérentes (IOPs). Les IOPs tiennent compte de l'interaction entre les constituants du milieu et le rayonnement incident (Preisendorfer, 1961). Les deux IOPs fondamentales qui permettent de quantifier les processus de diffusion élastique et d'absorption sont l'indicatrice de diffusion ($\beta(\lambda, \Theta)$ ($\text{m}^{-1}.\text{sr}^{-1}$)) et le coefficient d'absorption ($a(\lambda)$; m^{-1}). Si l'on considère un faisceau incident non polarisé, $\beta(\Theta, \lambda)$ décrit la dépendance angulaire du faisceau diffusé en fonction de la longueur d'onde (Sullivan et al., 2013, Mobley, 1994). Si l'on considère qu'une seule particule, l'indicatrice de diffusion est égale au premier terme de la matrice de diffusion ($F_{11}(\Theta, \lambda)$). Si nous considérons un élément de volume contenant N_m (part.m^{-3}) particules orientées aléatoirement, le milieu

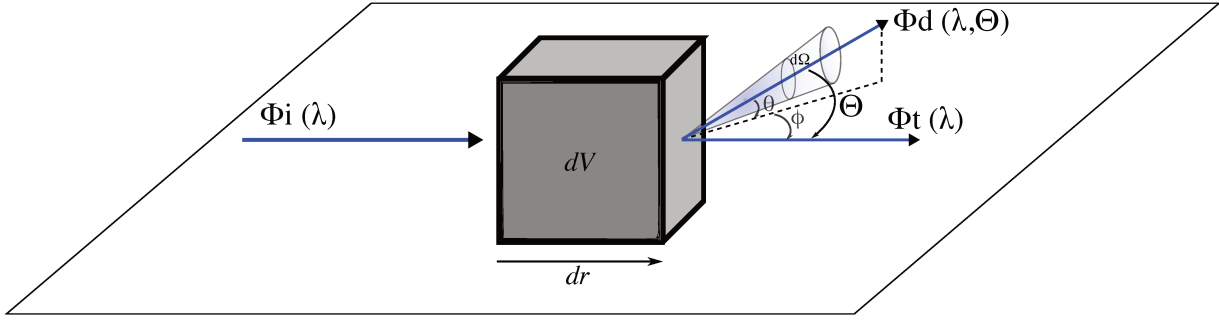


FIGURE 2.1 – Géométrie utilisée pour définir les IOPs (schéma adapté à partir de Mobley (1994))

est macroscopiquement isotropique (section 1.4.1). La diffusion est donc indépendante de l'azimuth ϕ et β ne dépend que de θ (voir la section 1.4.1). Le lien entre l'indicatrice de diffusion et la matrice de diffusion s'effectue de la manière suivante :

$$\langle F_{11}(\theta, \lambda) \rangle = \frac{\beta(\theta, \lambda)}{N_m}. \quad (2.1)$$

Par intégration de l'indicatrice de diffusion, il est possible d'obtenir le coefficient de diffusion ($b(\lambda)$; m^{-1}) et de rétrodiffusion ($b_b(\lambda)$; m^{-1}) :

$$b(\lambda) = 2\pi \times \int_0^\pi \sin(\theta) \beta(\theta, \lambda) d(\theta) \quad (2.2)$$

et

$$b_b(\lambda) = 2\pi \times \int_{\pi/2}^\pi \sin(\theta) \beta(\theta, \lambda) d(\theta). \quad (2.3)$$

Les IOPs, $a(\lambda)$, $b(\lambda)$ et $b_b(\lambda)$, peuvent être reliées à des mesures de flux (Mobley, 1994). Considérons un élément de volume dV , d'épaisseur dr , éclairé par un faisceau lumineux monochromatique de longueur d'onde λ (nm) et de puissance spectrale $\Phi_i(\lambda)$ ($\text{W} \cdot \text{nm}^{-1}$) (Fig. 2.1). Une partie ϕ_a du faisceau incident est absorbée par dV , une partie ϕ_t est transmise (pas d'interaction avec dV) et une partie $\phi_d(\Theta, \lambda)$ est diffusée à travers un angle solide $d\Omega$ centré sur l'angle Θ . Si nous considérons que la diffusion est élastique,

l'énergie est conservée :

$$\Phi_i(\lambda) = \Phi_a(\lambda) + \Phi_d(\lambda) + \Phi_t(\lambda), \quad (2.4)$$

avec $\Phi_d(\lambda)$, le flux total diffusé intégré sur toutes les directions.

L'indicatrice de diffusion $\beta(\Theta, \lambda)$, le coefficient de diffusion $b(\lambda)$ et le coefficient d'absorption $a(\lambda)$ se définissent alors par des rapports de flux :

$$\beta(\Theta, \lambda) = \frac{\Phi_d(\Theta, \lambda)}{\Phi_i(\lambda) dr d\Omega}, \quad (2.5)$$

$$b(\lambda) = \frac{\Phi_d(\lambda)}{\Phi_i(\lambda) dr}, \quad (2.6)$$

et

$$a(\lambda) = \frac{\Phi_a(\lambda)}{\Phi_i(\lambda) dr}. \quad (2.7)$$

On introduit aussi le coefficient d'atténuation ($c(\lambda)$; m^{-1}), qui est la somme des coefficients d'absorption et de diffusion ($c(\lambda) = a(\lambda) + b(\lambda)$).

Les IOPs sont impactées par le mélange des différents éléments optiquement significatifs ayant chacun des propriétés optiques et des concentrations spécifiques. Ainsi, $c(\lambda)$, $a(\lambda)$, $b(\lambda)$ et $b_b(\lambda)$ sont appelés coefficients totaux (bulk en anglais) car ils résultent de la somme des contributions de chaque constituant (principe d'additivité des IOPs; Morel and Bricaud (1986), Morel (2001), Mobley (1994), Stramski et al. (2001, 2004)). Si nous prenons, par exemple, le coefficient de rétrodiffusion, le $b_b(\lambda)$ "bulk" est la somme des coefficients de rétrodiffusion de chaque constituant $[b_b(\lambda)]_i$:

$$b_b(\lambda) = \sum_{i=1}^N [b_b(\lambda)]_i, \quad (2.8)$$

Le coefficient de rétrodiffusion s'exprime à partir de la section efficace de rétrodiffusion

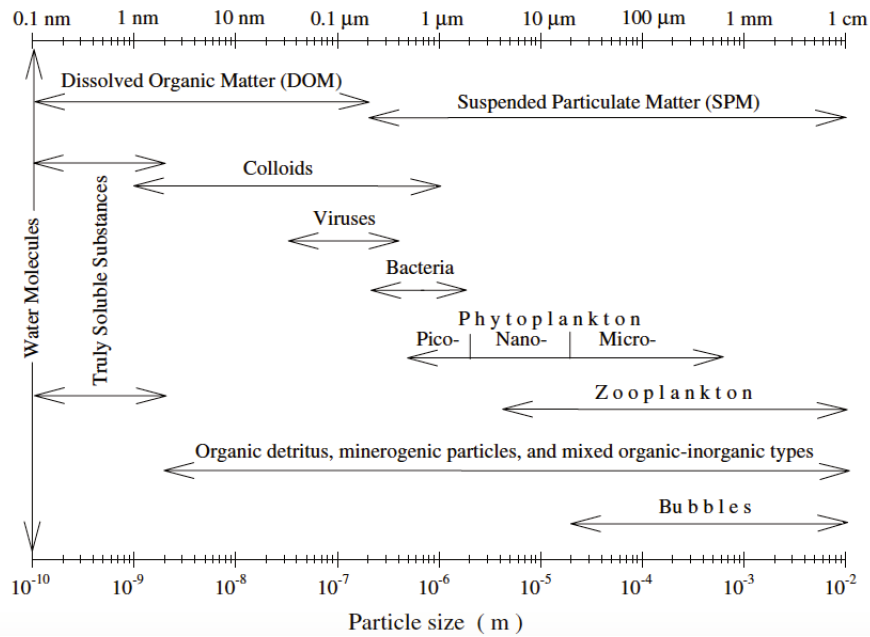


FIGURE 2.2 – Graphique logarithmique présentant la taille des différents constituants présents dans l'eau de mer. Graphique extrait de Stramski et al. (2004).

($[\sigma_{bb}]_i$) et de la concentration du constituant (N_i) :

$$b_b(\lambda)_i = N_i \times [\sigma_{bb}]_i. \quad (2.9)$$

Ces deux dernières équations peuvent être écrites pour le coefficient et la section efficace d'absorption en remplaçant respectivement $b_b(\lambda)_i$ et $[\sigma_{bb}]_i$ par $a(\lambda)_i$ et $[\sigma_a]_i$. Comme cela a été expliqué dans la section 1.3, les propriétés optiques individuelles $[\sigma_{bb}]_i$ et $[\sigma_a]_i$ sont fonction de la taille, de l'indice de réfraction, de la structure interne et de la morphologie des particules.

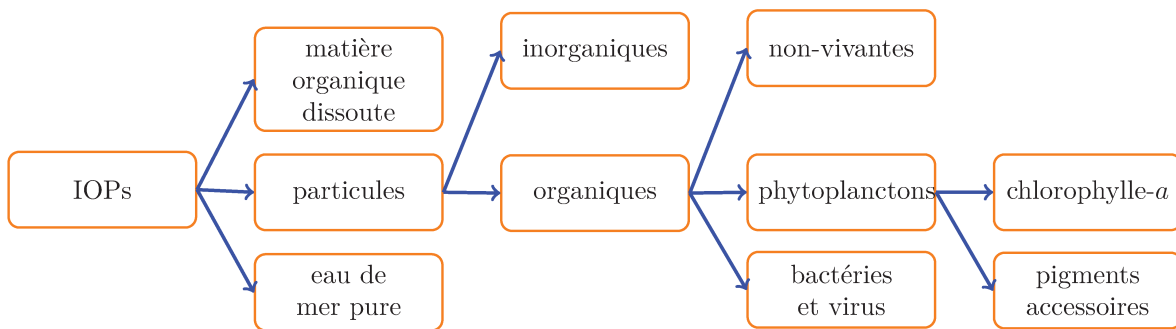


FIGURE 2.3 – Chaîne des composants dont dépendent les IOPs (figure issue et adaptée de la figure 1.3 du rapport de l'IOCCG n°5).

2.2 Constituants optiquement significatifs

Les éléments optiquement significatifs ont une taille allant de l'ordre du dixième de nm au cm (Fig. 2.2). Ils peuvent être divisés en trois grandes classes (Fig. 2.3) : i) l'eau de mer pure, ii) la matière organique dissoute (DOM) (taille des particules $< 0,2 \mu\text{m}$) et iii) la matière particulaire en suspension (taille des particules $> 0,2 \mu\text{m}$). Cette séparation à $0,2 \mu\text{m}$ n'est pas due à un changement de comportement chimique ou biologique mais à une limite expérimentale de filtration. Typiquement, il est possible d'utiliser des membranes en polycarbonate avec des pores de $0,2 \mu\text{m}$ pour effectuer la séparation. Cependant, à cause de la composition des membranes, les filtres GF/F Whatman ayant des pores de $0,7 \mu\text{m}$ sont communément utilisés pour différents types d'analyse (e.g. POC, Chl-*a*, a_p). Il est courant d'effectuer une pré-combustion de ces filtres (au four à 450°C durant 4h) afin de les décarboner et de réduire la taille des pores jusqu'à environ $0,4 \mu\text{m}$ (Nayar and Chou, 2003, Stramski et al., 2004).

Ces trois grandes classes permettent de compartimenter l'information totale en sous compartiments. Ainsi, à partir de l'Eq. (2.8), nous pouvons décomposer le coefficient d'absorption et de rétrodiffusion de la manière suivante :

$$a(\lambda) = a_w(\lambda) + a_{\text{DOM}}(\lambda) + \underbrace{a_{\text{phy}}(\lambda) + a_{\text{nap}}(\lambda)}_{= a_p(\lambda)} \quad (2.10)$$

$$b_b(\lambda) = b_{\text{bw}}(\lambda) + b_{\text{bp}}(\lambda), \quad (2.11)$$

où $a_w(\lambda)$, $a_{\text{DOM}}(\lambda)$, $a_p(\lambda)$, $a_{\text{phy}}(\lambda)$ et $a_{\text{nap}}(\lambda)$ respectivement les coefficients d'absorption de l'eau de mer pure, du DOM, de la matière particulaire, du phytoplancton et des particules non-algales. Les coefficients $b_{\text{bw}}(\lambda)$ et $b_{\text{bp}}(\lambda)$ sont respectivement les coefficients de rétrodiffusion de l'eau de mer pure et des particules. Notons que le coefficient de rétrodiffusion de la matière organique dissoute est supposé négligeable.

L'eau de mer pure est constituée de molécules d'eau et d'ions composant le sel. Les propriétés optiques d'absorption et de rétrodiffusion de l'eau de mer ont clairement été définies par Pope and Fry (1997) et Morel (1974). L'impact de la température sur les propriétés d'absorption de l'eau de mer a été analysé par Pegau and Zaneveld (1993). Les ions composant le sel ont pour impact d'augmenter d'environ 30% la diffusion par rapport à l'eau pure (Morel, 1974). Plus récemment, l'impact de la salinité sur les propriétés optiques de diffusion de l'eau de mer a été modélisé par Zhang et al. (2009). L'indicatrice de diffusion de l'eau de mer a été modélisée par Zhang et al. (2009) et Zhang and Hu (2009). La matière organique dissoute a traditionnellement été associée à la matière organique dissoute colorée (CDOM). Le CDOM est associé aux substances chromophoriques d'origine autochtone (production phytoplanctonique, activité bactérienne, dissolution des pelotes fécales, dégradation du phytoplancton, etc) ou terrigène (e.g. apports fluviaux). Le CDOM impacte uniquement le coefficient d'absorption dont le spectre suit une exponentielle décroissante (Bricaud et al., 1998, Babin et al., 2003a). La matière particulaire inclut à la fois des cellules biologiques vivantes mais aussi des particules non-vivantes d'origine organique ou terrigène. Il existe une large diversité de cellules vivantes : virus, procaryotes hétérotrophes que l'on nommera bactéries, ainsi que de nombreuses espèces de phytoplancton et de zooplancton. Les particules non vivantes regroupent les débris organiques (pelotes fécales issues du zooplancton, débris de organiques, cellules mortes, etc) et les particules inorganiques telles que les sédiments (argile, quartz, calcite, etc). Le coefficient a_p est impacté par les cellules phytoplanctoniques, les débris organiques et les organismes hétérotrophes (bactéries, flagellés et ciliés). Ainsi, a_p est scindé en un coefficient d'absorption des particules algales ($a_{phy}(\lambda)$) et en un coefficient d'absorption des particules non algales ($a_{nap}(\lambda)$). $a_{phy}(\lambda)$ varie selon la concentration des différents pigments photosynthétiques et selon la manière dont s'empilent les pigments au sein des cellules : le "package effect". Ce dernier a pour effet de diminuer l'absorption des particules pigmentées par rapport à l'absorption des mêmes pigments en solution. Le package effect dépend de la taille et de la structure interne des cellules (e.g. Duyens (1956), Morel and Bricaud (1981), Bricaud et al. (2004), Mercado et al. (1996), Wilhelm et al. (2014), Geider and Osborne (1987),

Osborne and Geider (1989), Nelson et al. (1993)). Tout comme a_{DOM} , $a_{\text{nap}}(\lambda)$ suit une relation en exponentielle décroissante en fonction de la longueur d'onde (Bricaud et al., 1998, Babin et al., 2003a).

Le coefficient de rétrodiffusion des particules a communément été modélisé comme une loi de puissance qui varie selon la distribution en taille des particules (Kostadinov et al., 2009, Loisel et al., 2006).

Finalement, à ces trois principales classes, nous pouvons aussi ajouter les bulles d'air, les liquides anthropogéniques (e.g. gouttes d'huile) et les colloïdes qui sont des éléments impactant aussi le signal optique mesuré (Stramski et al., 2004).

DEUXIÈME PARTIE

Matériels et méthodes

Conditions et mesures expérimentales

L'ensemble des données expérimentales utilisées durant cette thèse a été récolté lors d'une expérience de microcosme réalisée en avril 2014. Les échantillons ont été prélevés chaque matin et les analyses ont été réalisées sur l'ensemble de la journée. L'originalité de cette thèse réside sur le fait d'avoir effectué des mesures au cours de différentes phases de croissance de la population. L'objectif de ce chapitre est de décrire l'expérience ainsi que les protocoles d'analyses et les instruments utilisés.

3.1 Expérience en microcosme

Dans le cadre de cette thèse, les données ont été récoltées durant une expérience en microcosme de 20 jours réalisée sur deux espèces de phytoplancton. Des observations par le biais d'un microscope à balayage électronique (MEB) ainsi que des mesures biogéochimiques, optiques et cytométriques ont été réalisées à différentes fréquences.

3.1.1 Choix des espèces

L'expérience en microcosme a été réalisée sur deux cultures de phytoplancton : *Thalassiosira pseudonana* et *Chlamydomonas concordia*. Les cultures proviennent de la collection du centre de Roscoff (RCC, <http://roscoff-culturecollection>). Ces deux espèces ont été choisies pour leurs différences à la fois morphologiques et intra-cellulaires. Les cellules de *Thalassiosira pseudonana* (THAL) sont pourvues d'une paroi de silice. La forme des

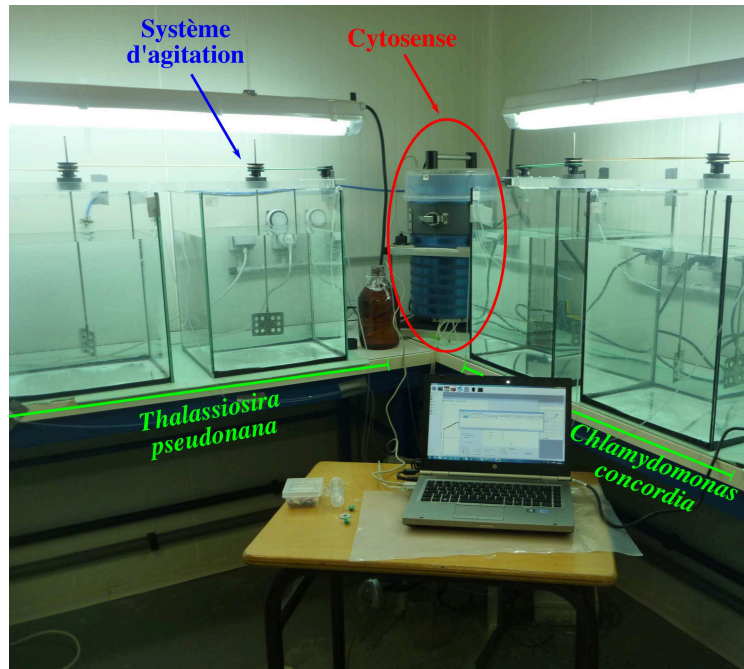


FIGURE 3.1 – Photographie des conditions expérimentales avant l'ajout des cultures dans le milieu.

cellules individuelles sont, dans la plupart des cas, cylindriques et, les cellules se sont agrégées en fin d'expérience. *Chlamydomonas concordia* (CHLAM) est une flagellée qui, contrairement à THAL, est dépourvue de paroi de silice. Tout au long de l'expérience, les clichés MEB et les observations au microscope optique ont montré que les cellules de CHLAM pouvaient être solitaires ou agrégées. Les cellules seules avaient, soit une forme d'ovoïde avec un flagelle, soit sphérique. Il a été supposé que les particules sphériques correspondaient à des zygotes. Ils résultent de la fusion d'un gamète male et d'un gamète femelle lors de la phase sexuée de CHLAM. En effet, les zygotes ont une forme sphérique, et sont entourés par une épaisse paroi organique.

3.1.2 Conditions expérimentales

L'expérience en microcosme a été conduite sur 20 jours afin d'analyser les propriétés optiques de chaque espèce à différentes phases de croissance (phase exponentielle, phase stationnaire ou phase de sénescence) et d'étudier, à partir de deux espèces, une large diversité de tailles, de formes, d'épaisseurs de parois, de configurations d'agrégats et de contenus en chlorophylle-*a*.

CHLAM et THAL ont été maintenues dans des conditions monospécifiques dans un milieu f/2 à 17°C, sous une densité de flux de photons d'environ $100 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et avec un cycle jour/nuit de 12 :12h. Elles ont été cultivées en "batch mode" durant 15 jours afin d'obtenir un volume de culture de 4,5 L. Ce volume de 4,5 L était primordial afin d'avoir une concentration en cellules phytoplanctoniques suffisante lors des analyses. Un jour avant le début de l'expérience, ces 4,5 L ont été ajoutés à 60L de milieu f/2. Le volume total de 64,5 L était nécessaire afin de réaliser les prélèvements quotidiens pour les analyses biogéochimiques tout en gardant un volume final suffisant pour les mesures optiques. En effet, l'immersion des instruments optiques nécessite une hauteur d'eau minimale de 25 cm (voir les détails dans la section 3.5.3). Comme le montre la figure 3.1, les espèces ont été dupliquées et les bacs ont été nommés B1-B2 pour THAL et B4-B5 pour CHLAM. Tout au long de l'expérience, les cultures ont reçu une densité de flux de photons d'environ $200 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le cycle jour/nuit 12 :12h et la température de 17°C ont été maintenus. La salinité des bacs variait entre 29,1 et 29,7. Une homogénéisation continue (de fréquence : 150 tr/min) du milieu a été effectuée afin d'éviter la formation de chaînes.

3.2 Filtrations

Les filtrations destinées à recueillir les échantillons pour les différentes analyses (MEB, POC, absorption, etc) ont été effectuées par aspiration sous vide (dépression inférieure à 5 inHg). La table 3.1 présente les spécificités des différents types de filtres qui ont été utilisés, et les conditions de conservation changeant suivant les analyses.

TABLE 3.1 – Spécificité des paramètres techniques selon le type d'analyse.

Analyse	Paramètres techniques						
	Fréquence de prélèvement	Type de Fixation	Température de stockage	Type de filtre	Pré- combution du filtre ¹	Durée du stockage	Nombre d'échantillon analysé
Morphologie par analyse MEB	1/2J	lugol/glutaraldéhyde 2,5 %	4°C	Mpc1 ²	NON	~1 - ~12 mois	7
[Chl- <i>a</i>] par Fluorimétrie (Turner designs trilogy)	1/2J	Azote liquide	-80°C	GF/F ³	NON	~4 mois	40
[POC] par Thermo NA 2000 CHN	1/2J	Aucune	55°C	GF/F	OUI	~4 - ~6 mois	40
a_p par Spectrophotométrie (Shimadzu UV 2450)	1/J	Azote liquide	-80°C	GF/F	OUI	~2 - ~3 mois	80
a_{CDOM} par Spectrophotométrie (Shimadzu UV 2450)	1/J	Aucune	4°C	Mpc2 ⁴	NON	~1 mois	80

¹ Pré-combustion des filtres durant 4h à 450°C afin de les décarbonner et réduire les pores du filtre à $\sim 0,4 \mu\text{m}$.

² Membrane en poly-carbonate de $0,4 \mu\text{m}$ de porosité (Millipore)

³ Filtre GF/F micro-pores de $0,7 \mu\text{m}$ (Whatman).

⁴ Membrane en poly-carbonate de $0,22 \mu\text{m}$ de porosité (Millipore)

3.3 Microscope à balayage électronique (MEB)

Tous les deux jours, des prélèvements ont été réalisés pour le MEB. Devant le coût élevé des analyses MEB, tous les prélèvements n'ont pas été analysés. Entre trois et quatre échantillons par espèce ont été consacrés à l'analyse MEB. Les jours ont été spécifiquement choisis afin d'obtenir des clichés des cellules à différents stades de croissance. Pour THAL, les observations concernaient les jours 5, 11, 13 et 15, et pour CHLAM, les jours 5, 11, et 15. Après la collecte, les échantillons ont été immédiatement fixés avec une solution de lugol / glutaraldéhyde 2,5 %. Le protocole des observations MEB est scindé en deux parties : une partie séchage des échantillons et une partie métallisation des échantillons. Le protocole de séchage est différent selon l'espèce car nous voulions observer la microstructure de THAL et notamment sa paroi de silice. Cependant, le protocole utilisé pour la métallisation est commun.

3.3.1 Méthode de séchage des échantillons

Le protocole utilisé pour CHLAM est le suivant : environ 4 ml de culture ont été filtrés à travers une membrane de poly-carbonate (Millipore, 0,4 μm) préalablement imbibée de polylysine. Le filtre obtenu a été immédiatement placé dans un bain de 70 % d'alcool. L'échantillon a été déshydraté à travers une série de bain d'alcool gradué jusqu'à 100 % d'éthanol (Merck PA). Ensuite, le filtre a été immergé dans une solution d'HMDS (hexaméthylsilazane, Molekula) pendant 30 minutes, et cela à deux reprises. Après l'élimination de l'excès d'HMDS, l'échantillon a été mis à sécher pendant une nuit sous une hotte aspirante.

Pour THAL, le protocole est le suivant : environ 1 ml de culture a été filtré à travers une membrane de poly-carbonate (Millipore, 0,4 μm). Par la suite, le filtre a été immergé dans de l'acide chlorhydrique (HCl) à 37 % (Merck, PA) à température ambiante pendant 24 h. Le traitement à l'acide détruit l'ensemble des composés organiques et permet ainsi l'observation de la microstructure. De plus, les deux valves composant la frustule des

cellules se détachent l'une de l'autre sous l'effet de l'acide, ce qui permet de mesurer les valves (parois de silice). Ensuite, la solution acidifiée a été à nouveau filtrée (Millipore, $0,4 \mu\text{m}$) et rincée avec de l'eau Milli-Q. Le filtre a été séché pendant 24 heures sous une hotte à flux laminaire.

3.3.2 Métallisation des échantillons

Pour THAL et CHLAM, les échantillons ont été montés sur des plots en aluminium (Agar Scientific) avec l'aide de pastilles en carbone autocollantes double face (Agar Scientific). Les échantillons ont ensuite été métallisés à Au/Pd (Polaron SC 7620) sous flux d'argon pendant 90 sec. Ensuite, les échantillons ont été observés au microscope électronique à balayage (SEM LEO 438VP, avec une tension d'accélération de 15 keV et un courant de faisceau de 10 pA)

3.4 Mesures biogéochimiques

Tous les deux jours, nous avons prélevé un échantillon pour les analyses de chlorophylle-*a* ([Chl-*a*]) et un échantillon pour les analyses de carbone organique particulaire ([POC]). Ces deux échantillons ont tous deux été filtrés par aspiration sous vide à travers un GF/F (Whatman, micro-pores de $0,7 \mu\text{m}$) préalablement chauffé à 450°C durant 4 heures. Après filtration, les filtres dédiés à l'estimation de la [Chl-*a*] ont été fixés à l'azote liquide et placés au surgélateur à -80°C , alors que les filtres dédiés à l'estimation de la [POC] ont été immédiatement placés à l'étuve à 55°C jusqu'à l'analyse.

3.4.1 La chlorophylle-*a* (Chl-*a*)

La concentration en chlorophylle-*a* a été estimée par fluorimétrie. Cette méthode se base sur la capacité qu'a la Chl-*a* à émettre dans le rouge suite à une absorption dans le bleu. L'extraction de la Chl-*a* a été réalisée à l'abri de la lumière et de la chaleur. Les filtres ont été broyés dans 4 ml d'acétone à 90 %. Ensuite, 4 ml de 90 % d'acétone ont été ajoutés

à chaque tube afin d'obtenir un volume d'extraction total V_e de 8 ml. Les échantillons ont directement été placés dans l'obscurité à 4°C pendant une nuit. Le lendemain, une centrifugeuse réfrigérée à 4°C a été utilisée pour séparer le substrat des filtres. Ainsi, il sera plus aisé de le prélever pour analyse. Les échantillons ont donc été centrifugés à 3000 trs/min pendant 5 minutes, les dépôts de filtre présents sur la paroi des tubes ont été remis en suspension avant une nouvelle centrifugation de 10 min à 3000 trs/min. La Fluorescence F_o a été mesurée à partir du surnageant par un fluorimètre (Turner Designs trilogy modèle 7200-000) préalablement calibré en utilisant une solution standard de chlorophylle-*a* (nidulans *Anacystis*, Sigma). Ensuite, 50 μ l d'acide chlorhydrique (0,3 N) ont été ajoutés à chaque échantillon afin de n'avoir que les pigments en solution. 3 minutes après l'ajout, une nouvelle mesure de fluorescence F_a est effectuée. Les valeurs de fluorescence ont ensuite été converties en concentration en Chl-*a* ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$) en appliquant les formules de Holm-Hansen et al. (1965) et Lorenzen (1966) :

$$[\text{Chl} - a] = K \times \frac{R_{max}}{R_{max} - 1} \times (F_o - F_a) \times \frac{V_e}{V_f}, \quad (3.1)$$

avec V_e et V_f et le volume d'extraction et le volume filtré en ml, K la pente de la droite de calibration de l'appareil et R_{max} le rapport d'acidification maximum (correspondant à la moyenne des rapports F_o/F_a de toutes les solutions de calibration utilisées).

3.4.2 Le carbone organique particulaire (POC)

Les concentrations en POC ont été obtenues en suivant le protocole JGOFS (Knap et al., 1996). Avant l'analyse, les échantillons POC ont été placés pendant 4 heures dans un dessiccateur saturé avec de l'acide chlorhydrique (HCl) fumant (37 %) pour éliminer le carbone inorganique. Les échantillons traités à l'acide ont été de nouveau séchés à 55°C pendant une nuit. La concentration en carbone organique particulaire a été obtenue par le biais d'un analyseur élémentaire CHN Thermo NA 2000 impliquant une combustion à haute température des filtres et permettant la mesure élémentaire en carbone, hydrogène et azote. L'instrument a été préalablement calibré avec une solution de sulfanilamide.

Notons qu'une mesure de blanc (composé du milieu f/2 et d'eau salée) a été retranchée à chaque mesure d'échantillon ; afin de mesurer uniquement la concentration en carbone du matériel particulaire en suspension dans le milieu.

3.5 Mesures des IOPs

3.5.1 Coefficient d'absorption des particules algales et non-algales

Chaque jour, un échantillon par bac était collecté et filtré par aspiration sous vide à travers un filtre GF/F (Whatman, micro-pores de $0,7 \mu\text{m}$) préalablement chauffé à 450°C afin de mesurer les coefficients d'absorption algale et non algale, nommés respectivement a_p et a_{nap} . Après prélèvement, les échantillons étaient fixés à l'azote liquide puis placés au surgélateur à -80°C jusqu'à l'analyse. Les mesures de a_p et a_{nap} ont été réalisées par spectrophotométrie en suivant les protocoles de Tassan and Ferrari (1995, 2002).

La mesure de a_p a été effectuée entre 400 et 750 nm avec un pas de 1 nm sur le spectrophotomètre Shimadzu UV 2450 équipé d'une sphère d'intégration. Ensuite, les pigments (partie algale du filtre) ont été extraits en utilisant une solution de chlore (NaClO 1%). Ainsi, une deuxième mesure a été réalisée afin d'estimer a_{nap} . L'amplification du chemin optique, due à des diffusions multiples entre le filtre et la couche de particules, a été corrigée en suivant les instructions de (Tassan and Ferrari, 1995, 2002). Le coefficient d'absorption des particules algales, a_{phy} , a été calculé en retranchant a_{nap} de a_p .

3.5.2 Coefficient d'absorption de la matière organique dissoute colorée (a_{CDOM})

Tous les matins, un prélèvement était effectué pour chaque bac puis filtré par aspiration sous vide à travers des membranes en poly-carbonate de $0,22 \mu\text{m}$ de porosité (Millipore). Le filtrat était recueilli dans une bouteille puis placé au réfrigérateur (4°C) jusqu'à l'analyse.

L'estimation du coefficient d'absorption de la matière organique dissoute colorée ($a_{\text{CDOM}}(\lambda)$)

a été réalisée par spectrophotométrie en suivant le protocole NASA décrit par Mitchell and Stramska (2003). Un spectrophotomètre à double faisceau (Shimadzu UV-2450) a été utilisé pour mesurer la capacité d'absorption de la CDOM (l'absorbance, $A_{\text{CDOM}}(\lambda)$, sans unité) entre 250 et 850 nm (pas de 1 nm). Les mesures de $A_{\text{CDOM}}(\lambda)$ sont réalisées à travers une cuve en quartz dont le trajet optique l_o est de 10 cm. Une cuve de référence, contenant de l'eau milli-Q, est utilisée pour s'affranchir du bruit instrumental et de l'impact de l'absorption de l'eau pure et de la cuve. Notons qu'à chaque spectre d'absorbance, une correction de la ligne de base a été appliquée en soustrayant la valeur d'absorbance moyenne entre 680 et 690 nm (Babin et al., 2003b). Cette gamme spectrale autour de 685 nm a été choisie en raison de l'absorption CDOM qui y est négligeable et des faibles effets de la température et de la salinité sur l'absorption de l'eau (Pegau et al., 1997, Babin et al., 2003a). Une fois la ligne de base soustraite, les valeurs d'absorbance sont converties en $a_{\text{CDOM}}(\lambda)$ (m^{-1}) en suivant l'équation :

$$a_{\text{CDOM}}(\lambda) = 2,303 \times \frac{A_{\text{CDOM}}(\lambda)}{l_o}. \quad (3.2)$$

3.5.3 Coefficient de rétrodiffusion

Des mesures optiques ont été effectuées quotidiennement avec l'ECO-BB9 (WetLabs) dans le but d'estimer le coefficient de rétrodiffusion particulaire b_{bp} . L'élément de volume mesuré dV se situe dans la zone d'intersection entre le cône d'émission de la source et le champ de vue angulaire du détecteur (zone en violet dans la figure 3.2). L'ECO-BB9 effectue la mesure de $\beta(\theta, \lambda)$ centrée autour d'un angle $\theta_m \approx 124^\circ$ à 9 longueurs d'onde (488, 510, 532, 595, 650, 676, 715, 765, 865 nm) L'ECO-BB9 a été directement plongé dans les bacs de culture. La dimension de ces bacs de 40 cm \times 40 cm \times 60 cm avait été préalablement étudiée afin de permettre un volume d'eau suffisamment important pour plonger l'ECO-BB9. Lors des mesures, des plaques en polyéthylène étaient placées sur les parois du bac afin d'éviter la réflexion de la lumière (Breneman (1981)). Deux jeux de 6 plaques de polyéthylène ont été utilisés (une pour chaque espèce) pour éviter toute

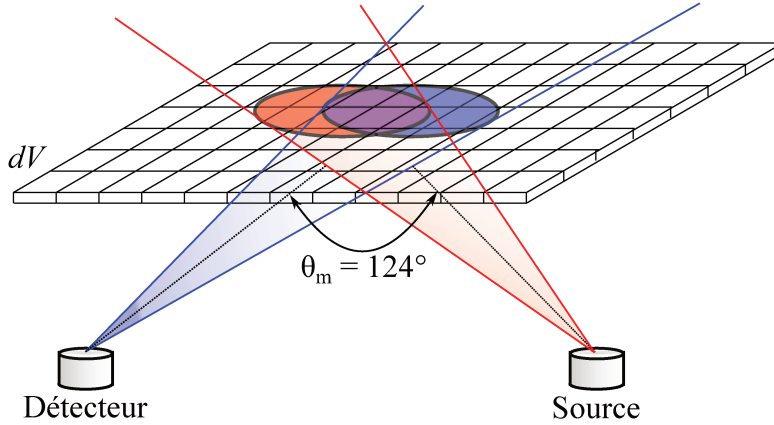


FIGURE 3.2 – Schéma d'une mesure de diffusion d'un élément de volume par l'instrument WET-Labs ECO BB9.

contamination d'une espèce à l'autre. L'ECO-BB9 et les plaques de polyéthylène étaient lavées avec de l'eau milli-Q entre chaque duplicat. À noter, qu'avant l'expérience, des mesures ont été effectuées sur de l'eau milli-Q afin de vérifier que la réflexion sur les parois des bacs n'impactait pas la mesure. Pour cela, l'instrument a été positionné verticalement et descendu dans le bac jusqu'à ce que ses fenêtres optiques soient à environ 5 cm du fond. L'instrument a ensuite été remonté lentement et les mesures ont été effectuées en continu jusqu'à ce qu'aucun changement sur le signal ne soit observé. Nous avons constaté que les réflexions sur les parois impactent le $\beta(\theta_m, \lambda)$ lorsque l'optique de l'instrument se trouve à moins de 25 cm du fond. Toutes les mesures ont été réalisées avec l'instrument immergé à ≈ 10 cm au-dessous de l'interface air-eau (30 cm du fond de la cuve à la fin de l'expérience). L'ensemble des mesures a été effectué dans l'obscurité pour que la lumière ambiante n'impacte pas le signal mesuré. Le temps d'acquisition était d'environ 2 minutes avec un taux d'échantillonnage de 1 Hz pour l'ECO-BB9 à 488 nm. Le bruit instrumental fut mesuré en plaçant de l'adhésif opaque sur les détecteurs, puis retranché aux comptes numériques mesurés. La valeur de $\beta(124^\circ)$ a ensuite été corrigée de la perte de lumière due à l'absorption le long du chemin optique :

$$\beta_c(124^\circ, \lambda) = \beta(124^\circ, \lambda) \times \exp[0,0391 \times (a_p(\lambda) + a_{\text{CDOM}}(\lambda))]. \quad (3.3)$$

La valeur de b_{bp} a été calculée en utilisant le facteur χ_p (Boss and Pegau, 2001) :

$$b_{bp}(\lambda) = 2\pi\chi_p(124^\circ)\beta_c(124^\circ, \lambda). \quad (3.4)$$

Deux valeurs de $\chi_p(124^\circ)$ ont été considérées : 0,9 et 1,076 (Sullivan et al., 2005, 2013). L'utilisation de deux valeurs nous a permis de discuter de l'impact du $\chi_p(124^\circ)$ sur nos estimations (Chapitre 7). Notons que des mesures de blanc, réalisées avant la mise en eau des cultures, ont été soustraites aux mesures effectuées durant l'expérience afin d'évaluer la diffusion de l'eau milli-Q "additionnée" à du NaCl et à du milieu F/2.

3.6 La cytométrie

3.6.1 FACSCalibur

Le compartiment des procaryotes hétérotrophes, nommé bactéries dans la suite du manuscrit, a été quotidiennement échantillonné, puis fixé avec une solution de formaldéhyde (2%), fixé à l'azote liquide et stocké à -80°C . Les échantillons ont été analysés par la plate-forme de cytométrie en flux PRECYM¹. L'instrument utilisé est un cytomètre en flux de type FACSCalibur (BD Biosciences). Ce cytomètre est équipé d'un laser à gaz d'argon refroidi par air (15 mW) émettant à 488 nm et d'un laser à diode (10 mW) émettant à 635 nm. Le FACSCalibur possède 6 détecteurs : une photodiode pour la diffusion avant (forward, FSC_{FAC}), une PMT pour la diffusion de côté (sideward, SSC_{FAC}) et quatre détecteurs de fluorescence (PMTs) centrés à 530 nm (FL1), 585 nm (FL2), 661 nm (FL4) et 670 nm (FL3).

Pour l'énumération des procaryotes hétérotrophes, 0,3 ml de chaque échantillon a été incubé avec 2 μl de solution de SYBR Green I (Solution commerciale Molecular Probes diluée 10 fois dans de l'eau distillée). L'incubation a été réalisée dans l'obscurité afin de colorer les acides nucléiques et a duré 15 minutes. Les molécules de SYBR Green I se

1. Plateforme REgionale de CYtométrie pour la Microbiologie (<http://precym.com.univ-mrs.fr>) situé à l'Institut Méditerranéen d'Océanologie (MIO)

fixent sur les acides nucléiques permettant d'absorber la lumière incidente dans le bleu et d'émettre dans le vert. Chaque cellule a été optiquement caractérisée par trois variables : le FSC_{FAC} et le SSC_{FAC} tous deux liés à la taille et à la forme cellulaire, et l'intensité de la fluorescence verte (515-530 nm) reliée à la teneur en acide nucléique. La combinaison du signal de fluorescence SYBRGreen et du signal diffusé permet de distinguer les procaryotes hétérotrophes (Marie et al., 2000).

Le FACSCalibur est un cytomètre capable d'énumérer le nombre de particules, mais le volume échantillonné est inconnu. Afin d'obtenir l'abondance (nombre de cellules par unité de volume), deux méthodes ont été utilisées pour estimer le volume échantillonné. La première méthode consiste à ajouter aux échantillons, avant l'analyse des procaryotes hétérotrophes, une quantité connue de billes TruCount (BD Biosciences) en tant que standard interne. La concentration de billes dans l'échantillon est donc connue. Lors du passage, en combinant la concentration initiale de billes, le nombre de billes énuméré par FACSCalibur et le temps d'analyse, il est possible de calculer le volume échantillonné. À noter, que les billes TruCount sont aussi utilisées afin de vérifier le bon fonctionnement du cytomètre. Leur intensité doit rester identique entre les échantillons analysés. La deuxième méthode se base sur une estimation du débit. Une pesée de 3 tubes d'échantillons est réalisée avant et après un passage de 3 min au sein du cytomètre. La différence entre les deux pesées est la masse de l'échantillon analysé. Ensuite, la masse de 100 μ l d'échantillon est mesurée afin d'en déduire sa masse volumique. Ainsi, en combinant la masse de l'échantillon analysé, sa masse volumique, et le temps de passage, il est aisé d'obtenir le débit. Par la suite, il suffira de multiplier le temps de passage de chaque échantillon par le débit pour en déduire le volume échantillonné. Toutes les données ont été recueillies en échelle logarithmique et stockées en mode liste à l'aide du logiciel CellQuest (BD Biosciences). Ensuite, l'analyse des données visant à déterminer l'abondance bactérienne a été effectuée *a posteriori* en utilisant le logiciel v7.6.5 FlowJo (Arbre Star).

3.6.2 Le cytomètre en flux à scanning de type " Cytosense "

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé le cytomètre en flux de type "Cytosense" en mode paillasse acquis en 2010 par la plate-forme de cytométrie en flux PRECYM du MIO. Les mesures ont été effectuées chaque matin afin d'utiliser en synergie les mesures optiques. Le cytomètre en flux à impulsions Cytosense (Cytobuoy b.v., NL) a été conçu pour l'étude des cellules phytoplanctoniques. Par le biais de mesures optiques, il compte et analyse les particules ayant un diamètre compris entre 1 et 800 μm . Notons que des études récentes ont montré qu'il était maintenant possible d'analyser des particules de 100 nm.

L'échantillon est pompé par une pompe péristaltique vers le Cytosense à travers un tube en silicone de 800 μm . Le débit du prélèvement est contrôlable, entre 0,07 et 17 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$. Ensuite, l'échantillon est injecté dans un liquide de gaine porteur (eau de mer filtré à 0,45 μm puis à 0,2 μ pour notre étude). Ainsi, le liquide de gaine englobe l'échantillon qui est au centre de la cuvette d'écoulement (Fig. 3.3). La nature du liquide de gaine dépend de l'échantillon et doit avoir un indice de réfraction similaire à celui du liquide englobant les particules à analyser. Une variation de l'indice de réfraction modifierait la diffusion du faisceau laser dans le milieu et devrait être pris en compte lors de la calibration de l'instrument et des analyses. Outre l'indice de réfraction, la température et la densité des deux fluides doivent être similaires. Si la température ou la densité des deux fluides sont différentes la position de l'échantillon peut devenir instable (dévier de la ligne centrale d'écoulement) et diminuer la précision des mesures. La vitesse du liquide de gaine augmente progressivement de 1 à 220 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ dans une section conique. Ainsi, l'échantillon est progressivement étiré jusqu'à la formation d'une "ligne de particules" (Fig. 3.3). Les particules sont séparées et alignées par une focalisation hydrodynamique le long de la ligne de courant du fluide. Tout comme une étude récente de Gilev et al. (2016), on considère que les particules non sphériques sont alignées verticalement suivant leur plus grand axe. Ainsi, on suppose que leur plus grand axe est donc perpendiculaire au faisceau laser. Tout écart éventuel par rapport à cette orientation sera discuté dans la section suivante.

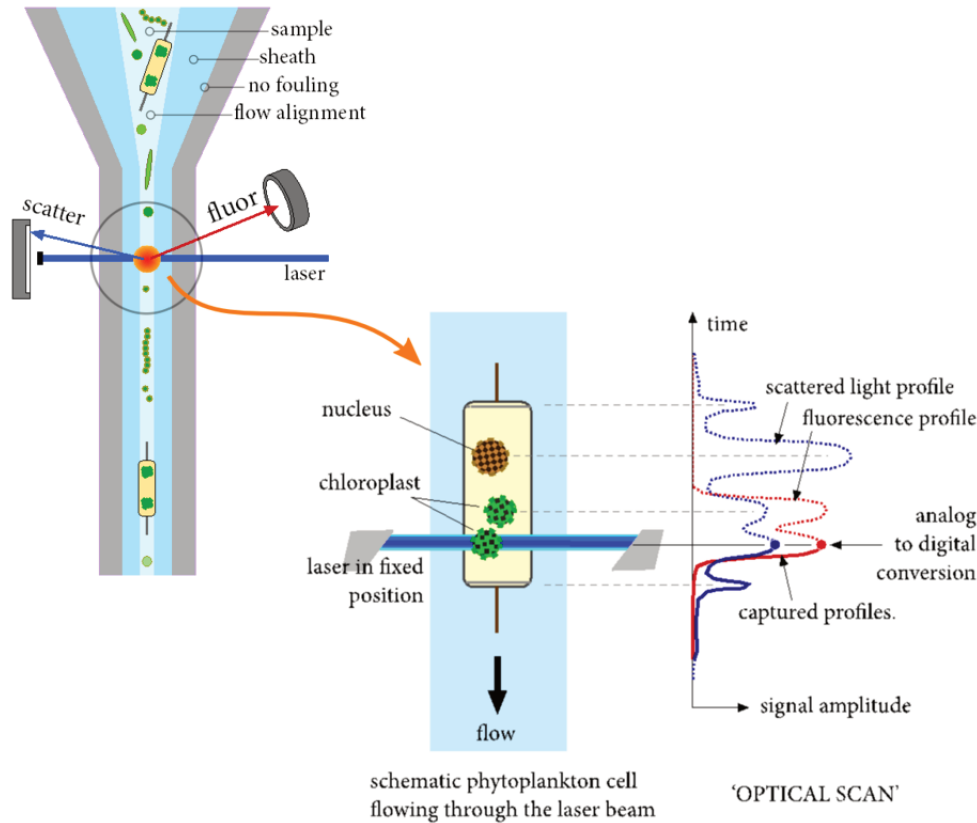


FIGURE 3.3 – En haut, principe d'analyse des particules par le Cytosense et en bas, analyse d'une particule par le Cytosense en utilisant le profil optique composé ici du signal diffusé (en bleu) et de fluorescence (en rouge) (Image extraite du manuel Cytobuoy).

L'analyse optique de chaque particule s'effectue dans une cuve en quartz d'1 mm de diamètre. La vitesse de passage des particules devant le faisceau laser est fixée par la vitesse du liquide de gaine. Lors de nos analyses, la vitesse est fixée à $2,2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Table 3.2). Le faisceau laser utilisé est un Coherent Inc. Sapphire qui émet à une longueur d'onde de 488 nm. Sa puissance est de 15 mW, son diamètre d'émission est d'environ 0,7 mm et il est linéairement polarisé. Le faisceau subit un "Beam shaping" en passant par un système optique complexe. L'objectif du "Beam shaping" est de convertir le faisceau unique en deux faisceaux gaussiens horizontalement polarisés à $+45^\circ$ et -45° (Fig. 3.4). Les deux faisceaux sont partiellement superposés afin d'illuminer la particule sur une plus large zone, tout en ayant un faisceau de hauteur étroite avec une intensité constante. La hauteur du faisceau résultant est d'environ $5 \mu\text{m}$ (H ; Fig. 3.4) et la largeur est d'environ $600 \mu\text{m}$ (W ; Fig. 3.4), ce qui permet d'englober le fluide porteur. Chaque particule passant devant le fais-

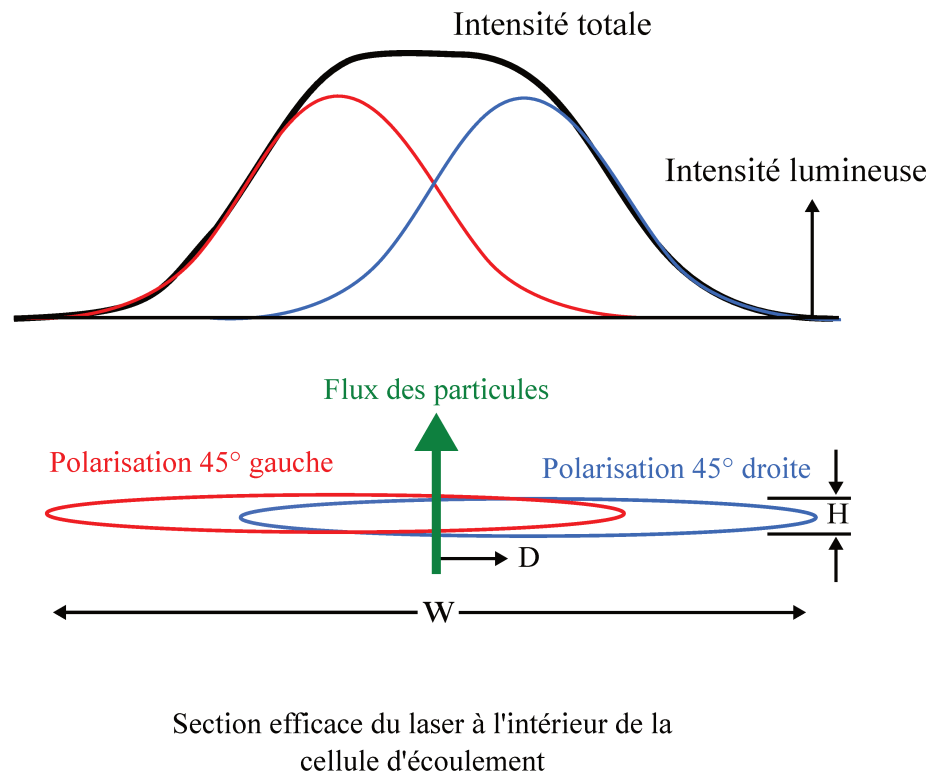


FIGURE 3.4 – Principe du "beam shaping" et de la distribution de l'intensité lumineuse lors du passage des particules analysées par le Cytosense (schéma adapté à partir de Duforêt-Gaurier et al. (2015)).

ceau est donc illuminée à la fois par le faisceau polarisé à $+45^\circ$ et par le faisceau polarisé à -45° . Si une particule passe par le centre de la cellule d'écoulement, le faisceau diffusé contiendra une quantité égale des deux états de polarisation. Cependant, si la particule traverse le faisceau à une certaine distance D du centre de la cellule d'écoulement, elle contiendra proportionnellement plus de lumière d'un état polarisé que l'autre (détails dans le préambule de la partie III).

Pour chaque particule traversant le faisceau, les photons sont diffusés et parfois accompagnés d'une émission de fluorescence. Les photons sont alors captés par des détecteurs avant (FSC), de côté (SSC) et de fluorescence (Fig. 3.5). Le détecteur avant, composé de deux photodiodes (Positive Intrinsic Negative diode; PIN), capte le signal diffusé entre 2° et 15° (Forward scatter; FSC). Un polariseur à $+45^\circ$ est placé devant une photodiode et un autre à -45° devant l'autre. Dans le logiciel d'analyse, le signal mesuré par les deux photodiodes est sommé afin d'obtenir la diffusion avant de chaque particule. Le signal de côté (sideward scatter; SSC) et les signaux de fluorescence sont captés et amplifiés par des

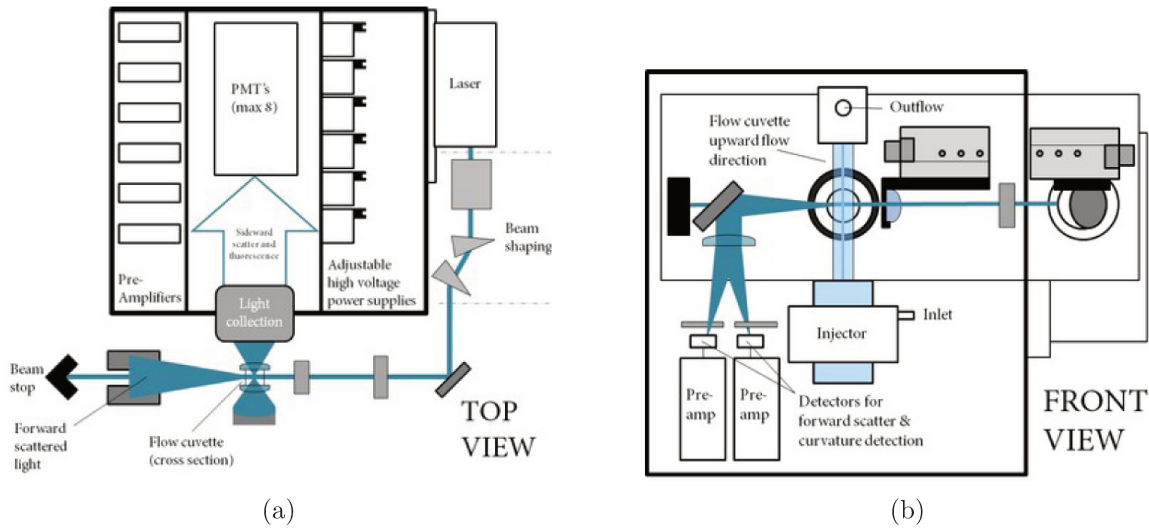


FIGURE 3.5 – a) Vue de dessus et b) vue de face schématique du système optique (images extraites du manuel CytoBuoy)

tubes photomultiplicateurs (PMTs) entre 45° et 135° . Une série de miroirs dichroïques et de filtres optiques est utilisée pour séparer les différentes longueurs d'onde. La fluorescence émise par les pigments photosynthétiques présents au sein des cellules phytoplanctoniques est détectée à trois bandes spectrales : fluorescence rouge (669-726 nm ; FLR), fluorescence orange (594-651 nm ; FLO), fluorescence jaune/verte (530-585 nm ; FLY).

Afin de ne pas enregistrer le bruit électronique, des particules parasites (débris, bactéries) ou bien des artefacts qui pourraient remplir inutilement les disques durs, un seuil de déclenchement (trigger level) de l'enregistrement est appliqué sur l'un des paramètres (le signal SSC ou la fluorescence par exemple). Pour cette expérience, le trigger level est de 15 mV sur le signal SSC. Ainsi, ce seuil de déclenchement "définit" le moment où l'on considère qu'une particule entre et sort du faisceau laser. Notons que le programme CytoUSB (CytoBuoy b.v., NL) a été utilisé pour piloter l'instrument (e.g. débit de prélèvement, seuil de déclenchement ; Table 3.2) et la collecte des données. Contrairement à un cytomètre "classique" qui n'enregistre que le signal maximal de chaque canal, le Cytosense enregistre tout le profil de la particule (plusieurs points par particule). La fréquence d'enregistrement est de 4 MHz (4 données par μs , soit 1 donnée par $0,5 \mu\text{m}$). Les profils sont utilisés pour obtenir des informations supplémentaires sur la taille et la structure interne de la cellule (Fig. 3.3) et permettent une meilleure classification des espèces. À partir de

TABLE 3.2 – Paramètres techniques utilisés pour les analyses Cytosense

Paramètres	Valeurs
Débit de pompage de l'échantillon	$3 \mu\text{l.s}^{-1}$
Vitesse de passage des particules	$2,2 \text{ m.s}^{-1}$
Seuil de déclenchement de l'enregistrement (Trigger level)	Signal SSC de 15 mV

chaque signal mesuré (FSC, SSC, FLR, etc), dix descripteurs de signaux mathématiques sont calculés par le programme CytoClus (CytoBuoy b.v., NL) : longueur de la particule, total, maximum, moyenne, inertie, centre de gravité, facteur de remplissage, asymétrie, nombre de pics ou cellule et TOF (Fig. 7.10 en annexe). De plus, le programme CytoClus a été utilisé pour analyser manuellement les données collectées par le Cytosense (Dubelaar and Jonker, 2000). L'analyse s'effectue par le biais de graphiques en 2 dimensions, formant un nuage de points, nommés cytogrammes. La classification des particules se faisant manuellement, elle dépendra donc de l'expertise de l'utilisateur.

Pour terminer, un dispositif "image-in-flow", monté dans le Cytosense, prend des photos des cellules dans une région d'intérêt préalablement définie.

3.6.3 Orientation des particules non sphériques

Il est important de noter que l'axe de symétrie des particules non sphériques peut former un angle ϵ avec la ligne de flux (Maltsev, 2000). Ainsi, considérer que la particule a son plus grand axe orienté perpendiculairement au faisceau incident ne serait plus valable. En effet, l'angle ϵ est fonction du temps (t) passé par la particule dans le flux. L'angle ϵ

est défini ainsi (Maltsev, 2000) :

$$\epsilon(t) = \tan^{-1} \left[\text{eps} \tan \left(\frac{2 S D \text{esp}}{\text{eps}^2 + 1} t \right) \right], \quad (3.5)$$

avec eps excentricité, S le paramètre du profil du flux de Poiseille et D la distance entre la particule et le centre de la ligne de flux. Le paramètre S est calculé de la manière suivante :

$$S = \frac{V_{max}}{R_c^2}, \quad (3.6)$$

avec V_{max} la vitesse au centre du flux et R_c le rayon de la cuvette d'écoulement. Pour rappel, nous avons utilisé un V_{max} d'environ $2,2 \times 10^3 \mu\text{m}.\text{ms}^{-1}$ et le rayon de la cuvette d'écoulement du Cytosense est d'environ $500 \mu\text{m}$. Il en résulte que S est égal à environ $8,8 \times 10^{-3} \mu\text{m}^{-1}.\text{ms}^{-1}$. L'excentricité des cellules phytoplanctoniques peut varier entre 0,4 et 40 (Clavano et al., 2007)). En considérant le design du Cytosense, le diamètre du flux de l'échantillon est d'environ $60 \mu\text{m}$ et donc, D peut varier entre 0 et $\pm 30 \mu\text{m}$.

Durant notre étude, les mesures de Cytosense ont été réalisées pour des cellules phytoplanctoniques avec des excentricités différentes. De plus, pour chaque particule passant à travers le faisceau laser, D peut varier. Cependant, il n'est pas aisé de quantifier D et l'excentricité pour chaque particule. C'est pourquoi la valeur de ϵ (pour un temps donné t) n'a pas pu être quantifiée.

Pour une espèce donnée, plusieurs centaines de mesures de signal avant (FSC) et de côté (SSC) ont été effectuées. Par analogie à l'équation (1.18) dans la section 1.4, si nous voulions obtenir un signal moyen ($\langle FSC \rangle$ et $\langle SSC \rangle$) représentatif de l'espèce, nous devrions moyenner les signaux sur l'ensemble des orientations possibles :

$$\langle FWS/SWS \rangle = \int_0^{\epsilon_{max}} d\epsilon \times p(\epsilon) FWS/SWS(\epsilon), \quad (3.7)$$

avec, $p(\epsilon)$ la fonction densité de probabilité satisfaisant la condition suivante :

$$\int_0^{\epsilon_{max}} d\epsilon \times p(\epsilon) = 1. \quad (3.8)$$

Ainsi, pour calculer $\langle FWS/SWS \rangle$ nous devrions caractériser $p(\epsilon)$, ce qui est impossible car nous ne pouvons pas calculer ϵ . C'est pourquoi, nous avons choisi, tout comme Gilev et al. (2016), de supposer que l'axe le plus long de la particule est orienté selon la ligne de flux et donc perpendiculaire au faisceau laser.

Simulation des propriétés optiques :

Codes de diffusion simple

Pour rappel, l'un des objectifs de la thèse est d'utiliser différents codes de diffusion simple afin de comprendre comment les paramètres morphologiques et intracellulaires impactent la diffusion telle qu'elle est mesurée par le Cytosense. Ainsi, après avoir présenté le formalisme théorique, l'expérience et les analyses effectuées, il nous reste à décrire les différents codes utilisés.

4.1 Codes de diffusion simple

Quatre codes de diffusion simple, en libre accès, ont été utilisés : le code de Mie¹, le code T-Matrix², le code Generalized Multiparticle Mie-solution³ et le code Scattnlay⁴. Ces codes calculent, en résolvant les équations de Maxwell, le champ électromagnétique diffusé par des particules dont la taille est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde de l'onde incidente. Les simulations ont permis de générer une base de données numériques conséquente pouvant être utilisée pour de nombreuses applications en optique marine. Notons que tous les calculs de diffusion simple ont été réalisés en prenant une longueur d'onde de 488 nm pour le rayonnement incident et un indice de réfraction de l'eau égale à 1,334 (Morel and Bricaud, 1986).

Les tables 4.1 et 4.2 présentent, respectivement, les capacités et les limites de chaque code

1. <http://scattport.org>

2. <http://www.giss.nasa.gov/staff/mmishchenko/tmatrix.html>

3. <http://diogenes.iwt.uni-bremen.de/vt/laser/codes/Yu-linXu/Yu-linXu-codes.htm>

4. <http://www.scattport.org>

TABLE 4.1 – Récapitulatif des spécificités des codes de diffusion simple utilisés.

Nom du code	Paramètre					
	Forme des particules	Orientation des particules	PSD ¹	Particule homogène	Particule hétérogène	Limitation en taille
Mie	sphère	∅	OUI	OUI	NON	NON
T-Matrix "V2" ²	sphère sphéroïde cylindre	fixe	OUI	OUI	NON	OUI
Scattnlly	sphère	∅	NON	OUI	OUI	OUI
GMM	agrégats	fixe	NON	OUI	NON	OUI

¹ Distribution en taille des particules² Version permettant de simuler les propriétés optiques de particules non-sphériques en orientation fixe

ainsi que leurs principales entrées et sorties.

TABLE 4.2 – Principales entrées et sorties du code de Mie, T-matrix, Scattnlay et GMM (Generalized Multiparticle Mie-solution).

Nom du code	Données d'entrée	Outputs (paramètres simulés)
Mie	$\theta_{\min}^d - \theta_{\max}^d \Delta \theta^d$ PSD λ_r $m = m_r + im_i$	$\mathbf{F}(\theta^d)$ σ_b, Q_b, σ_c et Q_c G
T-Matrix (orientation fixe)	$\theta^i, \phi^i, \theta^d$ et ϕ^d λ_r r_s ou r_v $m = m_r + im_i$ eps Type de la particule (cylindre ou sphéroïde) α, β et γ	$\mathbf{F}(\theta^d, \phi^d)$ σ_b et σ_c
GMM	$\theta_{\min}^d - \theta_{\max}^d \Delta \theta^d$ λ_r Position et rayon de chaque sphère Indice de réfraction complexe de chaque sphère α, β et γ	$\mathbf{Z} \times (\frac{2\pi}{\lambda})^2$ σ_b et σ_a Paramètre de taille d'une sphère de surface ou de volume équivalente
Scattnlay	$\theta_{\min}^d - \theta_{\max}^d \Delta \theta^d$ Nombre de couches composant la particule Paramètre de taille de chaque couche (Fig. 4.1)	Matrice d'amplitude ¹ Q_a et Q_b

¹ La matrice d'amplitude est une matrice (2×2) . Les relations entre les éléments de la matrice de phase et les éléments de la matrice d'amplitude sont détaillées dans Mishchenko et al. (2002) p 11.

4.1.1 Le code de *Mie*

La théorie de Mie est une solution particulière des équations de Maxwell décrivant la diffusion élastique d'une onde électromagnétique par une particule sphérique et homogène. Les codes basés sur la théorie de Mie ou "code de Mie" sont très largement utilisés pour diverses applications. De nombreuses versions, en différents langages informatiques, sont disponibles en libre accès (<http://scattport.org>). En optique marine ou en optique atmosphérique, on utilise très fréquemment le code "BHMIE" de Bohren and Huffman (1983) ou le programme "Mie Meerhoff" de Dolman (1989). Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé le code "Mie Meerhoff" de Dolman (1989)

4.1.2 Le code *T-Matrix*

La méthode T-Matrix (Mishchenko et al., 1996, Mishchenko, 2000) est référencée comme étant l'un des outils le plus efficace pour simuler les propriétés optiques de particules non sphériques possédant une symétrie de révolution (e.g. sphéroïdes ou cylindres) (Zhai et al., 2013, Mishchenko et al., 2002). Ce code est limité à un décalage de phase ($\rho = 2s(\lambda)(m_r - 1)$) d'environ 10. Durant la thèse, d'autres méthodes auraient pu être utilisées pour effectuer les simulations (e.g. DDscat et FDTD). Cependant, ces méthodes sont moins pratiques notamment à cause de leurs temps de calcul beaucoup plus importants (Wriedt et al., 1998). Compte tenu du nombre de simulations que nous voulions effectuer, un temps de calcul le plus court possible était indispensable.

Le code T-Matrix a été utilisé sous une première version afin de simuler les propriétés optiques de particules présentant une symétrie de rotation (cylindres ou sphéroïdes) dans des orientations aléatoires. Une deuxième version de ce code existe pour simuler les propriétés optiques de particules à symétrie rotationnelle ayant une orientation fixe. Cette deuxième version a été utilisée afin de simuler la diffusion des particules non sphériques traversant le faisceau laser du Cytosense de manière orienté (selon leur plus grand axe). Nous avons expliqué dans la section 1.3.2 que l'orientation d'une particule par rapport au faisceau incident est décrite grâce aux angles d'Eulers α , β et γ . Comme cela a été ex-

plié, il est commode d'orienter \mathbf{e}_z selon la direction de propagation de l'onde incidente et \mathbf{e}_{zp} selon l'axe de rotation de la particule. Nous sommes ainsi typiquement dans les deux configurations présentées dans le paragraphe 1.3.2, figures 1.6 et 1.7. Ainsi, pour les particules prolates, les angles (α, β, γ) sont $(0^\circ, 90^\circ, 0^\circ)$ et pour les particules oblates, ils sont $(0^\circ, 0^\circ, 0^\circ)$.

4.1.3 Le code *Generalized Multiparticle Mie-solution* (GMM)

Le code *Generalized Multiparticle Mie-solution* (GMM) (Xu, 1995, Xu and Gustafson, 2001) et le code "Multiple sphere T-matrix" (MSTM) (Mackowski and Mishchenko, 2011) permettent de simuler les propriétés optiques d'agrégats composés de sphères homogènes dans une orientation fixe. Afin de statuer sur le code le plus adéquat à nos besoins, nous avons comparé les fonctions de phase de sphères homogènes, de différentes tailles et d'indice de réfraction, simulées à partir du code de Mie (code de référence) avec celles simulées à partir du code GMM et du code MSTM. Les résultats ont montré que le code GMM fournit des résultats similaires à ceux obtenus par le biais du code de Mie sur une gamme de tailles et d'indices de réfraction plus importante que le code MSTM. Ainsi, nous avons décidé d'utiliser le code GMM durant cette thèse.

Notons que le formalisme utilisé dans le code GMM est légèrement différent de celui utilisé dans le code T-matrix et donc de celui introduit dans le premier chapitre de cette thèse. La direction de propagation de l'onde incidente est définie selon \mathbf{e}_z et le plan de diffusion est défini par le plan (OXZ) . L'axe de symétrie des particules est orienté selon \mathbf{e}_{xp} (perpendiculairement à la direction d'incidence). Notons que les observations MEB ont été utilisées afin de définir la configuration des agrégats. Compte tenu de la configuration des agrégats (Fig. 4.2) et suivant la convention utilisée par Edmonds (1957), les angles d'Euler sont : $\alpha = 0^\circ$, $\beta = 90^\circ$ et $\gamma = 0^\circ$.

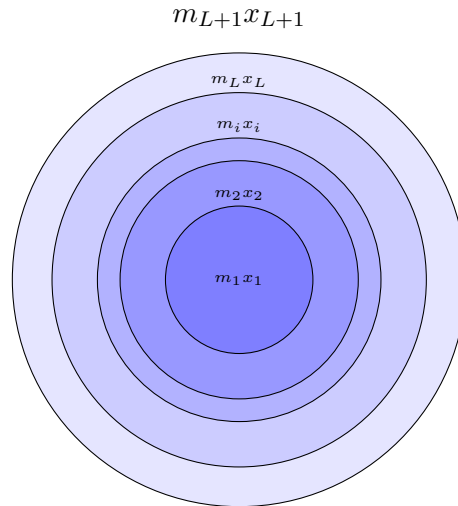


FIGURE 4.1 – Géométrie de sphère multicouche utilisée pour le calcul des propriétés optiques dans le code Scattnlay.

4.1.4 Le code *ScattnLay*

Le code ScattnLay (Yang, 2003, Peña and Pal, 2009) constitue une alternative à la théorie de Mie pour simuler les propriétés optiques des cellules phytoplanctoniques, en tenant compte de leur variabilité structurelle. En effet, il considère une particule comme une sphère concentrique (Fig. 4.1). Notre choix s'est porté sur ce code principalement pour son temps de calcul court. Le code est numériquement stable et précis pour une large gamme de paramètres de taille (paramètre de taille supérieur à 350 pour les cas simulés durant cette thèse). Notons que la stabilité du code dépend du nombre de couches composant la sphère et de l'indice de réfraction de chacune d'entre elles. Chaque j -ième couche, avec $j = 1, 2, \dots, K$, se caractérise par son indice de réfraction complexe par rapport au milieu ($m_j = m_{rj} + im_{ij}$) et par son paramètre de taille s_j . La lettre K représente le nombre de couches constituant la cellule.

4.2 Base de données

Dans le cadre de cette thèse, nous avons développé deux bases de données distinctes. La première base de données (DTB1) inclut des calculs de diffusion simple pour des agrégats et des cylindres oblates ou prolates dans des orientations fixes. Cette base de données est

utilisée pour analyser l'impact de la morphologie des particules phytoplanctoniques, avec une orientation fixe, sur la diffusion. La deuxième base de données (DTB2) se compose de simulations de sphères homogènes et hétérogènes composées de une, deux et trois couches. DTB2 a pour objectif d'inclure les propriétés optiques d'une large diversité de cellules phytoplanctoniques.

4.2.1 Base de données DTB1

Des simulations de diffusion simple ont été effectuées avec le code T-Matrix pour des particules en orientation fixe. Nous avons simulé, en monodispersion, des cylindres oblates et prolates ayant des diamètres de sphères équivalentes en surface (D_e) compris entre 3 et 7 μm (incrément de 1 μm). Les eps varient entre 0,6 et 1,6 (incrément de 0,1). Notons que ces gammes de taille et d'excentricité ont été choisies en se basant sur les observations MEB réalisées pour THAL. Nous avons utilisé un indice de réfraction complexe pour les cellules de phytoplancton de : $m = 1,05 + i0,01$ (comme cela est référencé par Clavano et al. (2007)).

En utilisant le code GMM, nous avons ajouté dans DTB1, des simulations pour 17 configurations d'agrégats différentes. Les agrégats étaient composés de 2, 3, 4, 5, 8 et 9 sphères (Fig. 4.2). Le diamètre de chaque sphère composant les agrégats est de 4 μm . Leur indice de réfraction complexe est de $m = 1,05 + i0,01$. Les agrégats sont nommés C_2 , C_{3a} , C_{3b} , C_{4a} à C_{4d} , C_5 , C_{8a} à C_{8h} et C_9 . Le numéro indique le nombre de sphères composant l'agrégat et la lettre identifie une configuration donnée. Les observations MEB de CHLAM ont montré que les agrégats les plus rencontrés correspondent aux configurations C_2 , C_{3a} , C_{3b} , C_5 et C_9 . Tous les agrégats présentent un plan de symétrie à l'exception de C_{4a-d} et C_{8a-h} .

Notons que l'ensemble de la base de données a été utilisé dans le chapitre 5 alors que seul les agrégats possédant un plan de symétrie ont été considérés dans le chapitre 6.

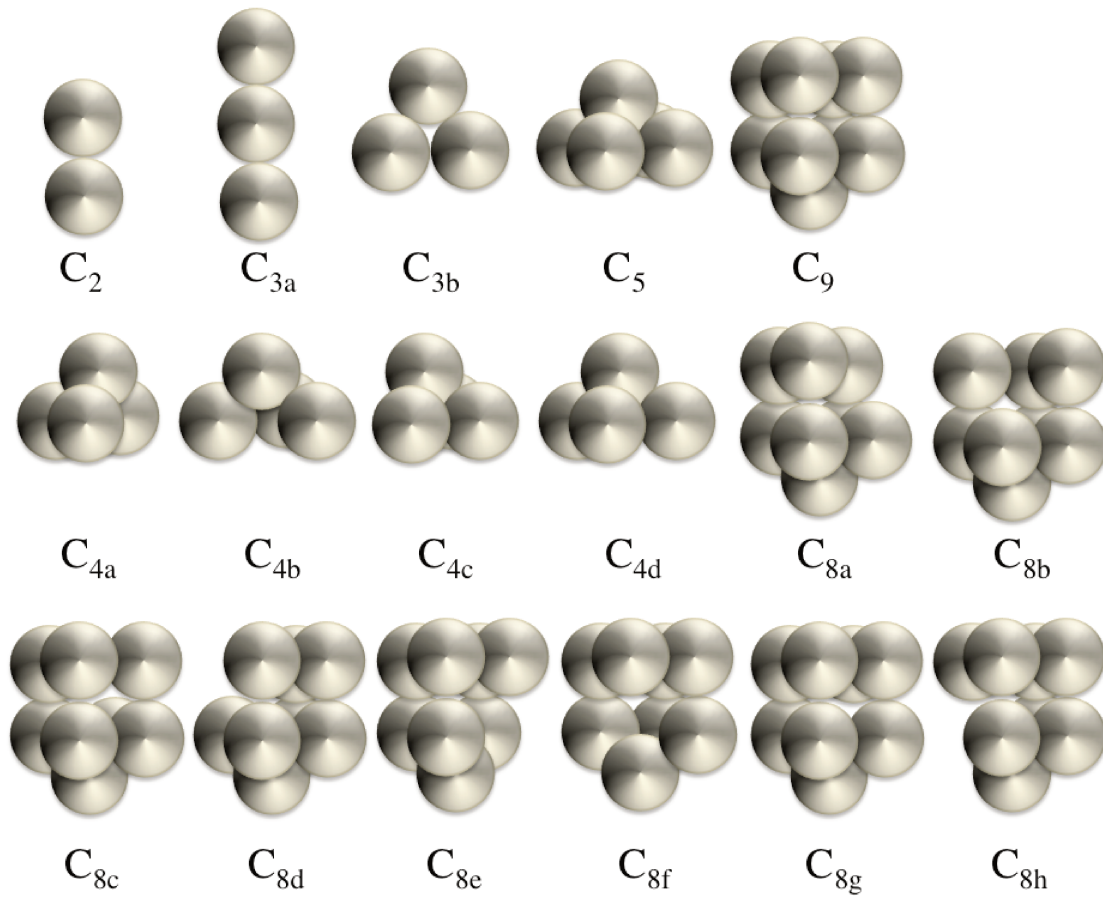


FIGURE 4.2 – Géométrie des agrégats simulés. C signifie clusters, le nombre indique le nombre de sphères et la lettre indique les différentes configurations.

4.2.2 Base de données DTB2

La seconde base DTB2 se compose de 590.000 simulations, effectuées avec le code Scattnlly. L'utilisation de ce code demande de caractériser la structure interne des cellules afin de renseigner les entrées des codes. Un bilan exhaustif portant sur la structure interne des cellules phytoplanctoniques a été effectué par Bernard et al. (2009). Nous avons utilisé ces informations afin de définir les indices de réfraction complexes de chaque couche et leurs proportions relatives. Les tables 4.3, 4.4 et 4.5 résument les valeurs d'indice de réfraction référencées dans la littérature pour le cytoplasme, le chloroplaste et la paroi de silice.

Les sphères homogènes ont été utilisées comme modèle de référence afin d'analyser l'impact de l'hétérogénéité des cellules sur les propriétés optiques. Les valeurs de la partie réelle de l'indice de réfraction s'étendent de 1,03 à 1,09 avec un incrément de 0,1. Ces

valeurs correspondent à des cellules avec un fort contenu en eau (Ahn et al., 1992, Aas, 1996, Mobley, 1994, Carder et al., 1972, Bricaud et al., 1988, Bricaud and Morel, 1986). La partie imaginaire de l'indice de réfraction varie de 0,001 à 0,015 avec un incrément de $2,857 \cdot 10^{-4}$. La limite inférieure représente les cellules faiblement absorbantes tandis que la limite supérieure représente les cellules extrêmement absorbantes ayant une forte concentration de pigments photosynthétiques (Quirantes and Bernard, 2004, Stramski and Mobley, 1997, Stramski et al., 2001, Morel and Bricaud, 1981, Bricaud and Morel, 1986).

Les cellules phytoplanctoniques possèdent une structure interne complexe composée de plusieurs organites (vacuole de gaz, chloroplaste, noyau, etc). Il paraît difficile d'intégrer toute cette variabilité structurelle en un modèle simple tel qu'une sphère concentrique. Cependant, l'utilisation de modèles hétérogènes tels qu'un modèle à couches concentriques permet une meilleure description des interactions entre le rayonnement et le phytoplancton par rapport à un modèle considérant les cellules phytoplanctoniques comme des sphères homogènes. Ainsi, tout comme Bernard et al. (2009), nous avons utilisé un modèle simplifié sphérique à deux couches composé d'une couche interne, le cytoplasme (cyt), et d'une couche externe, le chloroplaste (chl) (Fig. 4.3). Le cytoplasme est non pigmenté et faiblement absorbant comme il est principalement composé d'eau (Bricaud et al., 1992, Zaneveld and Kitchen, 1995, Bernard et al., 2009, Stephens, 1995). Le chloroplaste, constitué de pigments-protéines et responsable de la photosynthèse, est extrêmement absorbant (Geider and Osborne, 1987, Morel and Bricaud, 1981). Le chloroplaste résulte d'un empilement de thylakoïdes entourés par un stroma. Les pigments se situent dans les membranes du thylacoïde où nous trouvons les antennes qui recueillent et transfèrent l'énergie lumineuse vers le centre de réaction (light-harvesting complex)(Grossman et al., 1990, Lee, 2008). Il est important de garder à l'esprit cette hétérogénéité au sein du chloroplaste. Cependant, l'analyse de l'impact de l'hétérogénéité du chloroplaste dépasse le cadre de cette thèse. C'est pourquoi, le chloroplaste est considéré comme une couche homogène. Bernard et al. (2009) référencèrent des proportions relatives pour la couche de chloroplaste entre 4,4% et 57% avec une valeur médiane de 20%. Notons que, le modèle $80\%_{\text{cyt}}-20\%_{\text{chl}}$ a été référencé

par Bernard et al. (2009) comme le plus adéquat pour simuler les propriétés optiques des cellules phytoplanctoniques. Afin de couvrir une grande partie de la gamme de proportions relatives référencée pour le chloroplaste, nous avons considéré deux autres modèles. Ainsi, les proportions relatives des modèles simulés sont 60%_{cyt}-40%_{chl}, 70%_{cyt}-30%_{chl} et 80%_{cyt}-20%_{chl}.

Les cellules avec une paroi de silice (comme THAL) ont été modélisées par des sphères à trois couches. Le cytoplasme est la couche interne, le chloroplaste est la couche intermédiaire et la paroi de silice non absorbante (Aas, 1996) est la couche extérieure (Fig. 4.3). Nous avons utilisé les observations MEB afin d'avoir une idée de l'ordre de grandeur du volume relatif de la paroi de silice (V_{Si}). Arbitrairement, nous avons choisi d'effectuer 100 mesures d'épaisseur de parois à partir des observations MEB du quatrième jour de l'expérience. La valeur moyenne, égale à $1,375\% \pm 0,34$, est considérée comme une valeur moyenne de référence. Un V_{Si} de 5% est considéré comme un cas extrême dans la mesure où c'est la valeur maximale référencée (Kitchen and Zaneveld, 1992). Les volumes relatifs sont donc 80%_{cyt}-18,625%_{chl}-1,375%_{Si} ou 80%_{cyt}-15%_{chl}-5%_{Si}.

La partie réelle de l'indice de réfraction du cytoplasme ($m_r(\text{cyt})$) est fixée à 1,02. Cette valeur est dans l'intervalle d'indices référencés (Table 4.3). Le $m_i(\text{cyt})(\lambda)$ est calculé de la manière suivante (Bernard et al., 2009) :

$$m_i(\text{cyt})(488) = m_i(\text{cyt})(400) \exp[-0,01 \times (488 - 400)], \quad (4.1)$$

avec $m_i(\text{cyt})(400) = 0,0005$. Ainsi, $m_i(\text{cyt})$ est fixé à $2,0739 \times 10^{-4}$ à 488 nm. La valeur de $m_r(\text{Si})$ est égale à 1,07 ou 1,09 (Table 4.5) et $m_i(\text{Si})$ est égal à 0,0001 ou nul (Kitchen and Zaneveld, 1992, Stramski et al., 2001, Mueller, 1973). Concernant le chloroplaste, $m_r(\text{chl})$ et $m_i(\text{chl})$ sont calculés à partir de la formule de Gladstone et Dale (Aas, 1996) :

$$\sum_j m_j \nu_j = m_m, \quad (4.2)$$

où m_j et ν_j représentent l'indice de réfraction complexe et le volume relatif de la j -th couche, et m l'indice de réfraction complexe équivalent ($m = m_r + im_i$). Notons que $m_r(\text{chl})$ et $m_i(\text{chl})$ sont choisis de telle sorte que le m_r et le m_i des cellules de phytoplancton tombent dans les gammes de m_r et m_i choisies pour les sphères homogènes. La connaissance de l'indice de réfraction équivalent complexe est utile pour comparer les simulations de sphères hétérogènes et homogènes ou les simulations de sphères hétérogènes entre elles, quel que soit le nombre de couches et la proportion relative de chaque couche. La table 4.4 présente les valeurs de $m_r(\text{chl})$ référencées dans la littérature. Lors des simulations, les valeurs de $m_r(\text{chl})$ supérieures à 1,23 et inférieures à 1,06 ont été ignorées parce qu'elles ne sont pas de la gamme de valeurs référencées (en excluant les valeurs extrêmes). Il en résulte que les bornes supérieures et inférieures de m_r sont respectivement 1,04 - 1,09 pour les sphères 60%_{cyt}-40%_{chl}, 1,04 - 1,08 pour les sphères 70%_{cyt}-30%_{chl}, 1,03 - 1,06 pour les sphères 80%_{cyt}-20%_{chl} et les sphères 80%_{cyt}-18,625%_{chl}-1,375%_{Si}, et 1,03 - 1,05 pour les sphères 80%_{cyt}-15%_{chl}-5%_{Si} (incrément de 0,01). Les diamètres ont été fixés de telle manière à englober la gamme de tailles observée au cytomètre. Il paraît utile de rappeler que le Cytosense fournit une estimation de la longueur des particules. Pour les particules plutôt sphériques comme THAL et CHLAM (faible excentricité), nous supposons que la longueur est égale au diamètre de la particule. Les simulations ont été effectuées pour des diamètres d allant de 1 à 40 μm (incrément de 0,166 μm). La table 4.6 résume l'ensemble des entrées utilisées pour générer la base de données DTB2.

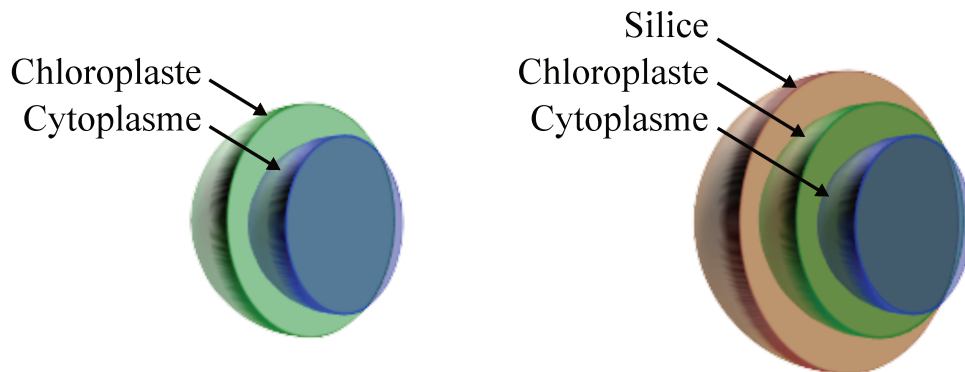


FIGURE 4.3 – Schéma représentant les deux types de modèles concentriques simulés par le biais du code Scattnlly. Le schéma à gauche représente le modèle à deux couches composé d'un cytoplasme (couche interne) et d'un chloroplaste (couche externe). Le schéma à droite représente le modèle à 3 couches (cytoplasme-chloroplaste-silice), utilisé pour les cellules avec une paroi de silice.

TABLE 4.3 – Indices de réfraction réels référencés pour le cytoplasme.

$m_r(\text{cyt})$	Référence
1,015	Bricaud et al. (1992)
1,02	Kitchen and Zaneveld (1992)
1,02	Zaneveld and Kitchen (1995)
1,02 - 1,05	Meyer (1979)
1,02	Bernard et al. (2009)
1,035	Quirantes and Bernard (2006)
1,025 - 1,03 - 1,04	Meyer and Brunsting (1975)
1,015	Charney and Brackett (1961)
1,027	Brunsting and Mullaney (1974)

TABLE 4.4 – Indices de réfraction réels référencés pour le chloroplaste. (Table adaptée à partir de Bernard et al. (2009))

$m_r(\text{chl})$	Référence
1,09	Zaneveld and Kitchen (1995)
1,14	Quirantes and Bernard (2006)
1,14	Bernard et al. (2009)
1,14-1,15 ¹	Aas (1996)
1,07-1,11	Mueller (1973)
1,06	Charney and Brackett (1961)
1,065 - 1,199	Paillotin et al. (1998)
1,13	Renge et al. (1996)
1,124	Caffarri et al. (2001)
1,22	Andersson et al. (1991)
1,22 ²	Andersson et al. (1991)
1,15-1,39 ²	Gruszecki et al. (1999)
1,02 1,06	Bryant et al. (1969)
1,199	Kleima et al. (2000)
1,150 - 1,179	Cinque et al. (2000)
1,08	Quinby-Hunt and Hunt (1989)
1,12	Matthews and Bernard (2013)

¹ Valeurs pour la chlorophylle

² Valeurs pour le complexe photosynthétique ("light harvesting complexe")

TABLE 4.5 – Indices de réfraction réels référencés pour la paroi de silice.

$m_r(\text{Si})$	Référence
1,09	Zaneveld and Kitchen (1995)
1,07	Geider and Osborne (1987)
1,09	Kitchen and Zaneveld (1992)
1,08-1,09	Mueller (1973)
<1,084> ±0,03	Aas (1996)

TABLE 4.6 – Ensemble des entrées utilisées afin de générer la base de données DTB2

Indices de couches constants			
$m_r(\text{cyt})$	$m_i(\text{cyt})$	$m_r(\text{Si})$	$m_i(\text{Si})$
1,02	$2,0739 \times 10^{-4}$	1,07/1,09	0/0,0001
Entrées "globales"			
Modèle ($m_r(\text{Si}) - m_i(\text{Si})$) ¹	m_r (inc) ²	m_i (inc)	Taille (inc) (μm)
100%	1,03 - 1,09 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)
60%-40%	1,04 - 1,09 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)
70%-30%	1,04 - 1,08 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)
80%-20%	1,03 - 1,06 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)
80%-18,625%-1,375% (1,07 - 0,0001)	1,03 - 1,06 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)
80%-18,625%-1,375% (1,07 - 0,0)	1,03 - 1,06 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)
80%-18,625%-1,375% (1,09 - 0,0001)	1,03 - 1,06 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)
80%-18,625%-1,375% (1,09 - 0,0)	1,03 - 1,06 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)
80%-15%-5% (1,07 - 0,0001)	1,03 - 1,05 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)
80%-15%-5% (1,07 - 0,0)	1,03 - 1,05 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)
80%-15%-5% (1,09 - 0,0001)	1,03 - 1,05 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)
80%-15%-5% (1,09 - 0,0)	1,03 - 1,05 (0,01)	0,001 - 0,015 ($2,857 \cdot 10^{-4}$)	1 - 40 (0,166)

¹ Les pourcentages sont les proportions relatives du cytoplasme, du chloroplaste et de la paroi de silice. 100% représente une sphère homogène.

² Incrément utilisé

TROISIÈME PARTIE

Résultat

Préambule

Dérivation des sections efficaces de diffusion avant, de côté et de rétrodiffusion à partir de mesures Cytosense

La méthodologie de Duforêt-Gaurier, **Moutier** *et al.*, 2015 (voir le papier en annexe) a été utilisée lors de cette thèse afin d'obtenir les sections efficaces de diffusion avant (σ_{FSC}), de côté (σ_{SSC}) et de rétrodiffusion (σ_{b_b}) (μm^2) à partir de mesures Cytosense. Ce chapitre vise à présenter de manière succincte cette méthode.

4.3 Considérations théoriques

Pour rappel, le faisceau laser incident du Cytosense est un faisceau linéairement polarisé qui subit un "Beam shaping" convertissant le faisceau unique en deux faisceaux gaussiens horizontalement polarisés à $+45^\circ$ et -45° .

Selon la position de la particule dans le fluide d'écoulement, la particule reçoit une fraction polarisée à $+45^\circ$ ou -45° . Le vecteur de Stokes du faisceau incident (\mathbf{I}_0) est :

$$\mathbf{I}_0 = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} I \\ 0 \\ (2\alpha - 1)I \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (4.3)$$

avec α la fraction de lumière provenant du faisceau de lumière polarisé à $+45^\circ$. L'intensité du signal mesurée par le détecteur avant (I_{FSC}) et de côté (I_{SSC}) est égale à :

$$I_{\text{FSC/SSC}} = \frac{1}{2R^2} [Z_{11}(\Theta)I_0 + (2\alpha - 1)Z_{13}(\Theta)I_0], \quad (4.4)$$

avec $Z_{11}(\Theta)$ et $Z_{13}(\Theta)$ des éléments de la matrice de phase (section 1.3). Pour des particules sphériques, la matrice de diffusion, telle qu'elle est définie dans l'Eq. (1.16), est indépendante de la direction d'incidence et de l'orientation du plan de diffusion, et dépend uniquement de l'angle de diffusion Θ . Nous nous plaçons dans la même configuration que dans la section 1.4.1 : \mathbf{n}^i est orienté selon \mathbf{e}_{zp} et le plan (OX_pZ_p) (avec $x_p \geq 0$) est le plan méridien d'incidence (Fig. 1.8). Dans un tel cas, il a été montré qu'une matrice de rotation $\mathbf{L}(\phi^d)$ est suffisante pour calculer la matrice de phase :

$$\mathbf{Z}(\mathbf{n}^i, \mathbf{n}^d) = \mathbf{F}(\theta)\mathbf{L}(\phi^d) \quad (4.5)$$

$$= \begin{bmatrix} F_{11}(\theta) & F_{12}(\theta)\cos(2\phi^d) & -F_{12}(\theta)\sin(2\phi^d) & 0 \\ F_{12}(\theta) & F_{11}(\theta)\cos(2\phi^d) & -F_{22}(\theta)\sin(2\phi^d) & 0 \\ 0 & F_{33}(\theta)\sin(2\phi^d) & F_{33}(\theta)\cos(2\phi^d) & F_{34}(\theta) \\ 0 & -F_{34}(\theta)\sin(2\phi^d) & -F_{34}(\theta)\cos(2\phi^d) & F_{33}(\theta) \end{bmatrix}. \quad (4.6)$$

Ainsi, en combinant l'Eq. (1.13), (1.14), (4.4) et (4.6), la section efficace de diffusion avant s'écrit de la manière suivante :

$$\sigma_{\text{FSC}} = 2\pi \int_{2^\circ}^{15^\circ} F_{11}(\theta)\sin(\theta)d\theta. \quad (4.7)$$

La même équation peut être écrite pour les sections efficaces de diffusion de côté et de rétrodiffusion en changeant les bornes d'intégration (respectivement $[45^\circ, 135^\circ]$ et $[90^\circ, 180^\circ]$ à la place de $[2^\circ, 15^\circ]$).

Cependant, pour les particules non sphériques ayant une orientation fixe, les Eq. (4.6)–(4.7) ne sont plus valides. En effet, la matrice de diffusion est dépendante de l'orientation de la particule et de l'angle ϕ^d . Ainsi, le terme Z_{13} n'est pas nul après intégration et la

polarisation impacte donc le signal mesuré. En combinant les équations (1.13) et (4.4) (avec $I_d = I_{\text{FSC}}$), la section efficace de diffusion avant devient :

$$\sigma_{\text{FSC}} = \int_{0^\circ}^{360^\circ} \int_{2^\circ}^{15^\circ} (Z_{11}(\theta, \phi) + (2\alpha - 1)Z_{13}(\theta, \phi)) \sin(\theta) d\theta d\phi. \quad (4.8)$$

Les équations (4.7) et (4.8) peuvent être écrites pour les sections efficaces de diffusion de côté et de rétrodiffusion en changeant les bornes d'intégration (respectivement $[45^\circ, 135^\circ]$ et $[90^\circ, 180^\circ]$ à la place de $[2^\circ, 15^\circ]$).

Notons que, dans le cadre de l'étude de Duforêt-Gaurier et al. (2015), seules des particules sphériques ont été analysées.

4.4 Calibration du Cytosense

L'objectif de la calibration est de convertir les signaux avant et de côté mesurés par le Cytosense en sections efficaces de diffusion avant et de côté. En d'autres termes, elle permet de convertir les comptes numériques (CN) en μm^2 . Pour ce faire, les fonctions de pondération angulaire ont été calculées pour les détecteurs avant ($W_{\text{FSC}}(\theta)$) et de côté ($W_{\text{SSC}}(\theta)$) à partir de l'étude du design instrumental (détails en annexe). Ensuite, des mesures Cytosense ont été effectuées sur des billes de polystyrène (PS) non absorbantes de différents diamètres (Table 4.7) et d'indice de réfraction connu, $m_{\text{PS}} = 1,20(\pm 0,01) + i0$. Pour chaque particule, le premier terme de la matrice de diffusion ($F_{11}(\theta)$) a été calculé à partir de la théorie de Mie. La fonction de phase et les fonctions de pondération angulaire ont été calculées entre 2° - 15° et 45° - 135° avec un incrément de $0,1^\circ$. Ainsi, les sections efficaces diffusion avant et de côté peuvent être calculées comme suit (cf. annexe) :

$$\sigma_{\text{FSC}_{\text{Mie}}} = \sum_{\theta=2^\circ}^{\theta=15^\circ} W_{\text{FSC}}(\theta) F_{11}(\theta) \sin(\theta) d\theta \quad (4.9)$$

$$\sigma_{\text{SSC}_{\text{Mie}}} = \sum_{\theta=45^\circ}^{\theta=135^\circ} W_{\text{SSC}}(\theta) F_{11}(\theta) \sin(\theta) d\theta \quad (4.10)$$

En suivant une démarche similaire à celle de Ackleson and Spinrad (1988), le signal mesuré par le Cytosense FSC_{cyto} et SSC_{cyto} (en comptes numériques, NC), pour des particules de diamètre quelconque d , est converti en σ_{FSC} et σ_{SSC} en utilisant une bille de référence (RF) :

$$\sigma_{\text{FSC}}(d) = \frac{\sigma_{\text{FSC}_{\text{Mie}}}(RF)}{FSC_{\text{cyto}}(RF)} \times FSC_{\text{cyto}}(d) \quad (4.11)$$

$$\sigma_{\text{SSC}}(d) = \frac{\sigma_{\text{SSC}_{\text{Mie}}}(RF)}{SSC_{\text{cyto}}(RF)} \times SSC_{\text{cyto}}(d) \quad (4.12)$$

Pour les billes de polystyrène, les résultats ont montré que la différence relative absolue entre la théorie de Mie et les mesures était, en moyenne, de 33,7% pour le signal FSC et de 23,9% pour le signal SSC. Les différences les plus importantes ont été observées sur le signal SSC pour les particules les plus larges ($d \geq 20 \mu\text{m}$). Ces écarts étaient dus à une saturation du détecteur qui est plus importante pour les PMTs (détecteur SSC) que pour les PIN photodiodes (détecteur FSC). Dans leur discussion, les auteurs ont souligné la nécessité de tester la méthode sur des particules naturelles et, plus particulièrement, dans le cadre de l'optique marine, sur des cellules phytoplanctoniques.

4.5 Dérivation de la section efficace backward

L'idée de Duforêt-Gaurier et al. (2015) est d'utiliser les $\sigma_{\text{SSC}}(488)$ comme un proxy de $\sigma_{\text{b}_b}(488)$. Les auteurs ont montré, à partir de 495900 simulations (incluses dans la base de données DTB2), qu'une relation relie ces deux grandeurs. Ainsi, une relation théorique a été établie :

$$\sigma_{\text{b}_b}(488) = 10^B \times \sigma_{\text{SSC}}(488)^A, \quad (4.13)$$

avec A et B les coefficients de la régression. Afin de vérifier la validité de la paramétrisation, des mesures ont été effectuées sur des billes de silice. Ainsi, les valeurs de $\sigma_{\text{SSC}}(488)$ obtenues à partir du Cytosense ont été comparées à des mesures ECO-BB9 (WetLabs). Les résultats ont montré que la différence relative était entre 35% et 60%. Ces écarts

TABLE 4.7 – Taille, coefficient de variation et taille des différentes billes de polystyrène utilisées pour la calibration du Cytosense.

Diamètre (μm)	Coefficient de variation (%)	Référence
1,0	3	Polysciences Inc. 07310-15
1,5	5	Polysciences Inc. 17133-15
3,0	5	Polysciences Inc. 17134-15
4,5	7	Polysciences Inc. 17135-5
6,0	10	Polysciences Inc. 07312-5
10,0	10	Polysciences Inc. 17136-5
20,0	10	Polysciences Inc. 18329-5
25,0	10	Polysciences Inc. 07313-5
45,0	10	Polysciences Inc. 07314-5
75,0	10	Polysciences Inc. 24049-5
90,0	10	Polysciences Inc. 07315-5

étaient du même ordre de grandeur que la variabilité instrumentale.

Les auteurs ont noté que la paramétrisation pouvait ne plus être valable pour les particules naturelles non sphériques en orientation fixe. En effet, le signal diffusé par ce type de particules peut être impacté par la polarisation contrairement aux particules sphériques (section 4.3). C'est pourquoi, les auteurs ont souligné l'importance d'analyser l'impact potentiel de la polarisation sur le signal diffusé qui est une étape indispensable avant une utilisation de la paramétrisation pour des particules naturelles non sphériques.

Durant cette thèse, la relation globale est légèrement différente de celle développée dans l'étude de Duforêt-Gaurier et al. (2015). En effet, elle a été développée à partir de l'ensemble des données de la base DTB2 qui contient 94100 cas supplémentaires. La paramétrisation globale suit la relation suivante :

$$\sigma_{\text{bb}}(488) = 10^{0,6} \times \sigma_{\text{SSC}}(488)^{1,09} \quad (R^2 = 0.9). \quad (4.14)$$

Notons que ces cas ont été ajoutés afin de prendre en compte le cas extrême de V_{Si} ré-

TABLE 4.8 – Relations théoriques entre les sections efficaces de côté et de rétrodiffusion, $\sigma_{b_b}(488\text{nm}) = 10^B \times [\sigma_{\text{SSC}}(488\text{nm})]^A$, calculées à partir de simulations pour des sphères homogènes, à deux ou trois couches.

Modèle	$m_r(\text{Si})-m_i(\text{Si})$	A	B	R ²
100%		1,16	-0,77	0,96
60%-40%		1,13	-0,6	0,99
70%-30%		1,105	-0,57	0,99
80%-20%		1,098	-0,56	0,98
80%-18,625%-1,375%	1,07 - 0,0001	1,04	-0,59	0,82
80%-18,625%-1,375%	1,07 - 0,0	1,039	-0,59	0,82
80%-18,625%-1,375%	1,09 - 0,0001	1,003	-0,61	0,83
80%-18,625%-1,375%	1,09 - 0,0	1,0	-0,6	0,83
80%-15%-5%	1,07 - 0,0001	1,09	-0,6	0,9
80%-15%-5%	1,07 - 0,0	1,095	-0,59	0,9
80%-15%-5%	1,09 - 0,0001	1,073	-0,6	0,91
80%-15%-5%	1,09 - 0,0	1,074	-0,6	0,91

¹ Les pourcentages sont les proportions relatives du cytoplasme, du chloroplaste et de la paroi de silice. 100% représente une sphère homogène.

férencé dans la littérature ($V_{\text{Si}} = 5\%$). La variabilité autour de la relation moyenne (Fig. 4.4) peut être expliquée par la taille, les indices de réfraction mais aussi par les différents modèles utilisés. Si l'on considère les modèles indépendamment, la pente de la relation varie entre 1,00 et 1,16 et l'ordonnée à l'origine varie entre -0,56 et -0,77 (Table 4.8). Utiliser une relation spécifique à la structure interne des particules étudiées (e.g. un modèle avec une paroi de silice pour les diatomés) pourrait fournir de meilleures estimations de $\sigma_{b_b}(488)$. Ainsi, les paramétrisations par modèle pourront, par la suite, être utilisées afin d'analyser les écarts obtenus entre la paramétrisation globale et une relation spécifique.

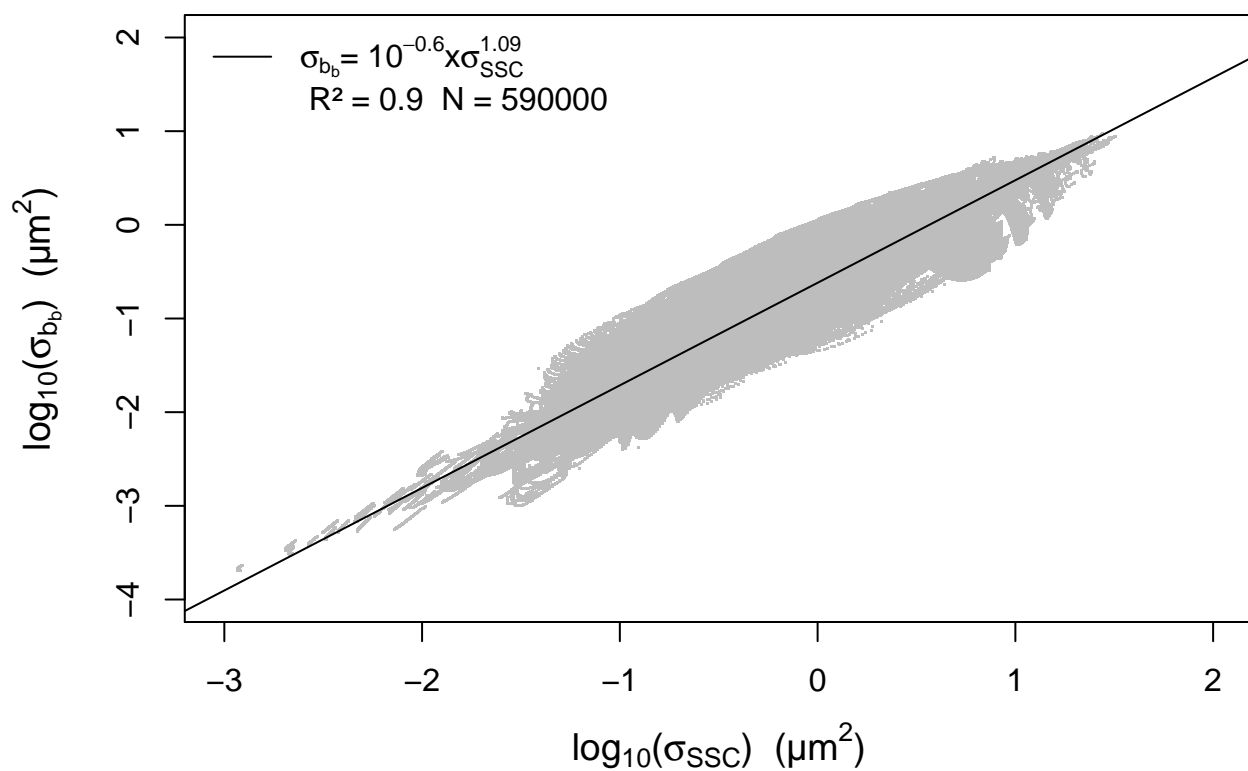


FIGURE 4.4 – Section efficace de rétrodiffusion (σ_{b_b}) en fonction de la section efficace de côté (σ_{SSC}) (échelle logarithmique). La ligne noire correspond à la droite de régression calculée à partir de l'ensemble des données de DTB2.

Scattering of individual particles from cytometry : tests on phytoplankton cultures

Les travaux résumés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans le journal Optic Express : <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-24-21-24188>.

Ce chapitre fait suite à l'étude de Duforêt-Gaurier et al. (2015) dans laquelle les auteurs ont souligné la nécessité de tester leur méthode sur des particules naturelles. Le cytomètre en flux Cytosense (CytoBuoy b.v., NL), acquis en 2010 par la plate-forme de cytométrie en flux PRECYM de l'Institut Méditerranéen d'Océanographie (MIO; <http://precym.mio.univ-amu.fr>), a été utilisé durant l'expérience de microcosme afin d'analyser les propriétés optiques de cellules phytoplanctoniques. À partir de la méthode de Duforêt-Gaurier et al. (2015), les sections efficaces de diffusion avant, de côté et de rétrodiffusion ont été estimées pour deux espèces morphologiquement différentes (*Thalassiosira pseudonana* et *Chlamydomonas concordia*) durant un cycle de vie complet. Ainsi, la méthode a été testée sur un ensemble varié de cibles. En effet, au cours des différentes phases de croissance d'une population de cellules phytoplanctoniques, la morphologie et la structure interne des cellules changent. Comme souligné dans le préambule, dans le cas de particules non sphériques ayant une orientation fixe, la polarisation du faisceau laser incident peut impacter le signal diffusé par la particule et enregistré par les détecteurs. Il en résulte que le Cytosense pourrait être utilisé pour mesurer σ_{FSC} et σ_{SSC} , mais la paramétrisation développée pour dériver σ_{b_b} à partir de σ_{SSC} ne serait plus valable.

La première partie de ce chapitre consiste à vérifier la validité de la paramétrisation pour des particules non sphériques avec une orientation fixe. Le code T-matrix et le code GMM ont été utilisés afin d'effectuer des simulations théoriques modélisant la diffusion de particules non-sphériques (sphéroïdes et agrégats) et d'examiner l'impact de la polarisation sur le signal Cytosense. Ces simulations ont montré que seul le signal diffusé par des particules ne possédant aucun plan de symétrie peut être impacté par la polarisation. Notons que l'impact de la polarisation ne dépasse pas, *a priori*, la variabilité due à l'indice de réfraction ou à la taille des particules autour de la paramétrisation globale. C'est pourquoi, il a été considéré que la paramétrisation reste valide malgré l'impact de la polarisation.

La deuxième partie de ce chapitre a pour objectif de vérifier les estimations de σ_{FSC} et de σ_{SSC} . Comme aucune mesure *in situ* n'est disponible, les estimations de σ_{FSC} et σ_{SSC} ont été comparées aux valeurs simulées de la base de données DTB2 (présentée dans la section 4.2.2). Les comparaisons ont montré que les valeurs estimées à partir de mesures Cytosense pour les cultures sont cohérentes avec les valeurs prédites par la théorie. En moyenne, plus de 92 % des estimations du Cytosense sont englobées par les valeurs simulées. La partie non retrouvée par les simulations peut être due à l'agrégation des cellules ou bien à une légère sous-estimation de la méthode. Par exemple, les valeurs de σ_{SSC} et de σ_{FSC} obtenues pour les agrégats C_2 , C_{3a} , C_{3b} , C_5 et C_9 sont en moyenne respectivement 37% et 10% inférieures aux valeurs obtenues pour des sphères homogènes de surfaces équivalentes.

La dernière partie de ce chapitre vise à comparer la section efficace de rétrodiffusion et l'efficacité de rétrodiffusion estimées à partir des mesures Cytosense avec des mesures *in situ* référencées dans la littérature. Les résultats ont montré que les σ_{b_b} et les Q_{b_b} estimées lors de la phase exponentielle se situent dans la gamme de valeurs référencée par Vaillancourt et al. (2004) pour THAL. Ce type de comparaison n'est pas possible pour CHLAM car aucune valeur n'a été trouvée dans la littérature. Concernant σ_{b_b} , les écarts avec la littérature pouvaient être dues à une erreur de calibration ou à l'utilisation de la relation moyenne non spécifique à une espèce donnée. Concernant Q_{b_b} , étant égale

au ratio entre σ_{b_b} et la section géométrique (Eq. (1.15)), outre un possible biais lors de l'estimation de σ_{b_b} , une erreur lors de l'estimation de la taille peut aussi expliquer les écarts avec les valeurs référencées.

Scattering of individual particles from cytometry : tests on phytoplankton cultures

W. Moutier,^{1*} L. Duforêt-Gaurier,¹ M. Thyssen,² H. Loisel,^{1,3,4} X. Mériaux,¹ L.

Courcot,¹ D. Dessailly,¹ and S. Alvain¹

¹ Laboratoire d’Océanologie et de Géosciences (LOG), Université du Littoral Cote d’Opale (ULCO), CNRS UMR 8187, 32 avenue Foch, 62930 Wimereux, France

² Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), Université d’Aix-Marseille (AMU), CNRS/IRD UMR 7294, Campus de Luminy, 13288 Marseille, France

³ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Université de Toulouse, UPS (OMP), CNRS, UMR 5566 LEGOS, 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France

⁴ Space Technology Institute (STI), Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

abstract

This study presents an application of the Cytosense flow cytometer (CytoBuoy b.v., NL) for the analysis of the optical properties of phytoplankton cells. For the first time, the forward, sideward and backward cross sections (σ_{FSC} , σ_{SSC} and σ_{b_b}) were derived for two species morphologically different (*Chlamydomonas concordia* and *Thalassiosira pseudonana*). The objective of this work is to check the validity of the estimates before any applications in the frame of marine optics studies. Thus, estimates of σ_{FSC} and σ_{SSC} are tested with radiative transfer computations as no in situ measurements are available. A synthetic database is built considering homogeneous, multi-layered spheres, aggregates and cylinders. Scanning electron micrographs were performed to investigate the cell morphology to simulate particles as close as possible to the real cells. This set of numerical results represents a valuable database for many kind applications dealing with marine optics. Comparisons showed that the Cytosense estimates for the cultures are consistent with values predicted by the theory. In average, more than 92% of the Cytosense estimates were encompassed by predicted values. The backscattering cross section and the

backscattering efficiency were compared with in situ measurements found in the literature wherever possible. Results showed that σ_{b_b} and Q_{b_b} estimations fall within the range of the referenced values.

5.1 Introduction

Studies about the contribution of the phytoplanktonic compartment to the bulk Inherent Optical Properties (IOPs, Preisendorfer (1986)) increased over the last few years. These studies highlighted the importance of accounting for the heterogeneity/morphology of the phytoplankton cells when considering the scattering and more particularly the backscattering. Simulations were performed considering phytoplankton cells as two or three-layered spheres (Bricaud et al., 1992, Kitchen and Zaneveld, 1992, Meyer and Brunting, 1975, Meyer, 1979, Quirantes and Bernard, 2004, Zaneveld and Kitchen, 1995, Bernard et al., 2009, Dall’Olmo et al., 2012, Matthews and Bernard, 2013, Quinby-Hunt and Hunt, 1989, Quirantes and Bernard, 2006, Svensen et al., 2007). Results indicated a higher backscattering coefficient or efficiency than predicted by the Mie theory, which considers particles as homogeneous spheres (Stramski and Mobley, 1997, Stramski et al., 2001, Ahn et al., 1992, Stramski and Kiefer, 1991, Morel and Bricaud, 1986, Bricaud et al., 1983, Bricaud and Morel, 1986, Morel and Ahn, 1991). Laboratory measurements confirmed multilevel light scattering by the cell, i.e. both by the outer cell membrane or frustule and the internal structure of the cell, as well as by its molecular structure (Volten et al., 1998, Dubelaar et al., 1987, Voss et al., 1998, Witkowski et al., 1998, 1993, Vaillancourt et al., 2004, Whitmire et al., 2010). Many studies concluded that it will be important, in the future, to investigate more precisely how the cells physiological conditions influence the scattering. Hobilabs Hydroscat, WET Labs ECO-BB or ECO-VSF are dedicated to routine *in situ* measurements of scattering at one or three scattering angles used for the assessment of the backscattering coefficient. These instruments can be deployed on a large variety of platforms at different time and space scales, relevant to the sediment or phytoplankton dynamics. However, they do not allow to accurately describe the contribution of each particulate compartment and to investigate the impact of the variations of the internal structure, except in the case of pure phytoplankton cultures. In this context, flow cytometers are valuable tools to analyze the individual scattering of particles and

so move beyond the bulk information. They allow measurements of the sideward and forward scattering as well as fluorescence for each single particle going through the laser beam. Dubelaar et al. (1987) pointed out the impact of a gas vacuole on the sideward and the forward scattering intensity from the Cytosense benchtop flow cytometer. This study illustrates potential applications of the Cytosense to analyze the impact of cell morphology on scattering. Green et al. (2003b) developed a method to derive the refractive index and the particle size combining flow cytometer measurements and simulations from Mie theory. This method was tested in New England continental shelf waters to quantify the contributions of phytoplankton and other particles to the inherent optical properties (Green et al., 2003a). They showed that the summed contributions of individual particle to phytoplankton absorption and particle scattering were close to values derived from bulk measurements. However, in some cases, as example during blooms conditions, their method leads to ambiguous estimates. They indicated clearly that there is a need for new approaches that overcome the limitations of Mie Theory.

More recently, Duforêt-Gaurier et al. (2015) developed a new methodology to derive the forward, sideward and backward cross sections of individual particles from measurements of the Cytosense. This method is valid for homogeneous and heterogeneous spherical or non spherical particles contrary to previous methodologies deriving particle diameter and complex refractive index but assuming particles as homogeneous spheres. The method was successfully tested on different NIST (National Institute of Standards and Technology) traceable beads. In their discussion, the authors pointed out the need to test the method on more complex natural particles and more particularly, in the framework of marine optics, on phytoplankton cells. In the continuity of the Duforêt-Gaurier *et al.*, 2015's work, the objectives of the present study were to apply the methodology on phytoplankton cells to test its robustness on natural particles and so identify and analyze its potential errors. For that purpose, the method was tested on two species, *Thalassiosira pseudonana* (a diatom) and *Chlamydomonas concordia* (a flagellate green algae), during a complete life cycle. These two species are very distinct from a morphological point of view. *Thalassiosira pseudonana* stands for particles with a silica wall and single cells are

in most cases cylindrical. *Chlamydomonas concordia* is a small ovoid and may potentially form aggregates during the experience. Moreover, the cell size, the shape, the thickness of the silica wall, the Chlorophyll_a by cell or the aggregate configurations, change during the life cycle ; it permits to test the method on an large set of targets.

The proposed study is divided in three steps. First, before testing the method on natural particles, we have to address an issue pointed by Duforêt-Gaurier et al. (2015) in their discussions. Indeed, for particles of all shapes and all sizes, the polarization of the incident laser beam may impact the signal scattered by the particle and recorded by the detectors. It results that the Cytosense could still be used to measure the sideward and forward cross sections but not anymore to derive the backscattering coefficient. For that purpose, numerical computations have been realized for non-spherical particles (spheroids and aggregates) with the oriented T-matrix code (Mishchenko, 2000) and the Generalized Multiparticle Mie-solution (GMM) code (Xu and Gustafson, 2001) to examine theoretically the impact of the polarization on the Cytosense signal. Second, the comparison exercise was realized to quantify the accuracy of the Cytosense estimates over phytoplankton cells cultures. As no database of the sideward and the forward cross sections is available in the literature, the Cytosense estimates were compared with radiative transfer computations. 590,000 simulations were carried out to include homogeneous and layered sphere models representing the optical properties of a large diversity of phytoplankton cells. The backward cross section and backward efficiency factor estimates were compared with available *in situ* data found in the literature. Third, after the analysis of the sources of errors, few possible improvements were proposed in the conclusions. Considering the objectives cited above, the present study can be considered as technical. However, such work is mandatory before considering any potential utilization of the Cytosense in the framework of marine optics.

5.2 Material and method

5.2.1 Phytoplankton cultures

Monospecific cultures *Thalassiosira pseudonana* (THAL) and *Chlamydomonas concordia* (CHLAM) were obtained from the Roscoff Culture Collection (RCC, <http://roscoff-culture-collection.org>). THAL is a diatom and stands for particles with a silica wall and CHLAM is a flagellate green algae. CHLAM and THAL were maintained in monospecific conditions in a f/2 medium at 17 °C, under a photon flux density of about 100 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ with a 12 :12h light :dark cycle. They were grown in batch mode during 15 days to obtain 4.5 L of culture. One day before the beginning of the microcosm experiment, the 4.5 L of culture were added to 60 L of fresh f/2 medium. A volume of 60 L was required to realize a daily sampling for biogeochemical analysis, while maintaining a sufficient depth (≥ 25 cm) for the optical measurements. The cultures were maintained under a surface illumination of 200 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The 12 :12h light :dark cycle and the temperature of 17 °C were maintained. A continuous agitation was applied to homogenize the medium and to avoid the formation of chains. The salinity of the four batches was between 29.1-29.7.

5.2.2 Flow cytometry

In this study, we used the Cytosense (CytoBuoy b.v., NL; <http://www.cytobuoy.com>) of the PRECYM flow cytometry platform of the Mediterranean Institute of Oceanography (MIO; <http://precym.mio.univ-amu.fr>). The Cytosense is a benchtop pulse-shape flow cytometer designed for the observation of phytoplankton cells. It counts and analyzes particles with diameters between 1 and 800 μm . The sample intake speed is of 3 $\mu\text{l.s}^{-1}$. Particles in suspension are injected into a free carrying sheath fluid, that narrows down the suspension into a thin line of fluid. The velocity of the particle suspension is governed by the sheath flow rate, factory set at about 2.2 m.s^{-1} . The particles are aligned along the path of the fluid, which is perpendicular to the direction of the laser beam. Considering

the design of the Cytosense and the analysis conditions, we assume that for non-spherical particles, the particle longer axis is vertically oriented perpendicularly to the laser beam. Particles flow one by one, through, the focused laser beam. The laser is a Coherent Inc. Saphyre, 488 nm, vertically polarized, with a power of 15 mW and a beam diameter of 0.7 mm. The Cytosense beam shaping, converts the single beam in two horizontally displaced beams with polarization of $+45^\circ$ and -45° relative to the original polarization of the laser beam. The superposition of these two Gaussian beams, with partly overlapping light distributions provides a flat light distribution over the sensing zone of the detectors. With this double beam solution, particles are illuminated by radiation coming from the $+45^\circ$ and -45° polarized beams. If a particle is flowing in the middle of the flow cell, the light scattered by the particle contains equal amounts of both polarization states. If a particle is flowing through the combined irradiance profile of both laser beams at some distance d away from the middle, the scattered light will contain proportionally more light from one beam than from the other one with the other polarization state (see Fig. 1 in Duforêt-Gaurier et al. (2015)). The forward scattered light (FSC) is collimated and directed onto two PIN photodiode detectors, one with a $+45^\circ$ angle polarizer in front of the photodiode and one with a -45° angle polarizer. In the analysis software, the signals from the two detectors are summed together to provide the forward scattering of each particle. The collection solid angle of the forward scatter detectors starts at ca. 2° , going up to ca. 15° . The sideward scattered light (SSC), together with the fluorescence emission, is collected at 90° (with a solid angle between ca. 45° and ca. 135°) by series of photomultiplier tubes, using a set of dichroic mirrors and band pass filters. The fluorescence emitted by photosynthetic pigments in algal cells is detected at three different spectral bands. The resulting signatures, which are displayed as red and orange fluorescence respectively, assist in determining the pigment type of each particle. The yellow fluorescence detector is specific to stains of certain calibration beads. Digital data acquisition is initiated as the particle enters into the laser beam and is terminated when the particle is no longer detected. The data recording is done at a frequency of 4 MHz. Data recording was triggered by the SSC signal (15 mV). This trigger permitted to remove a part of the instrumental

electronical noise as the smallest particles.

The proprietary Cytoclus software (CytoBuoy b.v., NL) was used to manually analyze the data (Dubelaar and Jonker, 2000). It enables the clustering of data points representing cells having similar optical properties, constituted by their forward and sideward scattering, and their various fluorescence signals. The clustering uses up to 10 simple mathematical signal descriptors of each available detector signal (for example, length, height, center of gravity, asymmetry, number of humps...). The various clusters are selected manually by drawing gates in correlated bivariate scatter plots. This combines objective factors from the cytograms and subjective considerations linked to the operator expertise. Moreover, an image-in-flow device, mounted in the Cytosense, takes pictures of cells within a predefined zone of interest.

5.2.3 Theoretical considerations

Light scattering is produced by the presence of an object (such as a particle) with a refractive index different from that of the surrounding medium. The refractive index is expressed in a complex form as $m(\lambda) = m_r(\lambda) + i m_i(\lambda)$, where λ is the wavelength of the radiation, relative to the medium. The real part determines the phase velocity of the wave ($v(\lambda) = c/m_r(\lambda)$) with c the speed of light in a vacuum. The imaginary part represents the absorption of light as it propagates through the particle with $a_{cm}(\lambda)$ the absorption coefficient of the cellular material equal to $4\pi m_i(\lambda)/\lambda$. The direction of propagation of a transverse electromagnetic wave is specified by a unit vector \mathbf{n} or, equivalently, by a couple (θ, ϕ) , where $\theta \in [0, \pi]$ is the polar (zenith) angle and $\phi \in [0, 2\pi]$ is the azimuth angle (Mishchenko et al., 2002). The angular distribution and polarization of the scattered field depend on the polarization, directional characteristics of the incident field, and on the properties of the particle as its size parameter ($s(\lambda) = \pi D/\lambda$ with D its diameter), its shape, composition, structure and orientation. The single scattering of light by an object is described by the scattering cross section $\sigma_{sca}(\lambda)$ (units, m^2) and the phase matrix $\tilde{Z}(\lambda, \mathbf{n}_{sca}, \mathbf{n}_{inc})$ with \mathbf{n}_{inc} and \mathbf{n}_{sca} the direction of the incident and scattered radiation. The

scattering cross section is defined by (Mishchenko et al., 2002) :

$$\sigma_{sca}(\lambda) = \frac{r^2}{I_{inc}(\lambda, \mathbf{n}_{inc})} \int_{4\pi} d\mathbf{n}_{sca} I_{sca}(\lambda, \mathbf{n}_{sca}), \quad (5.1)$$

with r the distance from the particle, I_{sca} is the incident intensity. The scattered intensity I_{sca} is defined from the incident Stokes vector, from the incident radiation, as follows :

$$I_{sca} = \frac{1}{r^2} (Z_{11}I_{inc} + Z_{12}Q_{inc} + Z_{13}U_{inc} + Z_{14}V_{inc}). \quad (5.2)$$

Note that, in Eq. (5.2), the spectral and directional dependencies are omitted for clarity.

The phase matrix of a particle is defined by :

$$\tilde{Z} = \begin{pmatrix} Z_{11} & Z_{12} & Z_{13} & Z_{14} \\ Z_{21} & Z_{22} & Z_{23} & Z_{24} \\ Z_{31} & Z_{32} & Z_{33} & Z_{34} \\ Z_{41} & Z_{42} & Z_{43} & Z_{44} \end{pmatrix}. \quad (5.3)$$

As previously, λ , \mathbf{n}_{inc} and \mathbf{n}_{sca} have been omitted for clarity. For a spherical particle, we assume that the incident light propagates along the positive z-axis of the laboratory reference frame (L{X, Y, Z}) and that the XZ-plane with $X \geq 0$ is the meridional plane of the incident beam. In this case, the Stokes vector of the scattered beam can be computed with respect to its own reference plane and the phase matrix can be written as :

$$\begin{aligned} \tilde{Z}(\lambda, \mathbf{n}_{sca}, \mathbf{n}_{inc}) &= \tilde{F}(\lambda, \theta) \tilde{L}(\phi) \\ &= \begin{pmatrix} F_{11}(\lambda, \theta) & F_{12}(\lambda, \theta) \cos 2\phi & -F_{12}(\lambda, \theta) \sin 2\phi & 0 \\ F_{12}(\lambda, \theta) & F_{22}(\lambda, \theta) \cos 2\phi & -F_{22}(\lambda, \theta) \sin 2\phi & 0 \\ 0 & F_{33}(\lambda, \theta) \sin 2\phi & F_{33}(\lambda, \theta) \cos 2\phi & F_{34}(\lambda, \theta) \\ 0 & -F_{34}(\lambda, \theta) \sin 2\phi & -F_{34}(\lambda, \theta) \cos 2\phi & F_{44}(\lambda, \theta) \end{pmatrix}, \end{aligned} \quad (5.4)$$

with $\tilde{L}(\phi)$ the rotation matrix (see Fig. 4.6 p. 96 in Mishchenko et al. (2002)). The scattering matrix $\tilde{F}(\lambda, \theta)$ is independent on the particle orientation and is constant with

respect to the azimuth. Combining Eq. (5.1)–(5.4), the sideward cross section is written as follows :

$$\sigma_{\text{SSC}}(\lambda) = 2\pi \int_{45^\circ}^{135^\circ} F_{11}(\lambda, \theta) \sin(\theta) d\theta. \quad (5.5)$$

Integrating $F_{11}(\lambda, \theta)$ over the backward hemisphere gives the backscattering cross section :

$$\sigma_{\text{bb}}(\lambda) = 2\pi \int_{90^\circ}^{180^\circ} F_{11}(\lambda, \theta) \sin(\theta) d\theta. \quad (5.6)$$

For a non spherical particle in a fixed orientation, Eq. (5.4)–(5.6) are no more valid. Indeed, $\tilde{F}(\lambda, \theta)$ becomes dependent of the particle orientation and depends on the azimuth angle. Considering the Cytosense design, ignoring a multiplication factor, Duforêt-Gaurier et al. (2015) found that the Stokes parameters of the incident light are defined by $(I, 0, (2\alpha - 1)I, 0)$ with α the fraction of light coming from the $+45^\circ$ polarized beam. Duforêt-Gaurier et al. (2015) noted that as the forward detected signal is the sum of the intensity of the two forward detectors, it is proportional to :

$$Z_{11}(\lambda, \theta, \phi)I + (2\alpha - 1)Z_{13}(\lambda, \theta, \phi)I, \quad (5.7)$$

with Z_{11} and Z_{13} the elements of the phase matrix (Eq. (5.3)). For the sideward detector with no polarizer, the detecting signal (SSC) is also given by Eq. (5.7). Thus, the sideward cross section can be written as follows :

$$\sigma_{\text{SSC}}(\lambda) = \int_{0^\circ}^{360^\circ} \int_{45^\circ}^{135^\circ} (Z_{11}(\lambda, \theta, \phi) + (2\alpha - 1)Z_{13}(\lambda, \theta, \phi)) \sin(\theta) d\theta d\phi. \quad (5.8)$$

The same equation can be written for the backward cross section by changing the limits of integration ($[90^\circ, 180^\circ]$ instead $[45^\circ, 135^\circ]$). The efficiency factor Q is the ratio of the cross section area to the geometrical cross section ($\langle G \rangle$) (Morel and Bricaud, 1986) :

$$Q_{\text{SSC}} = \frac{4\sigma_{\text{SSC}}}{\pi D^2}. \quad (5.9)$$

The same equation can be written for the backward scattering with b_b instead of SSC. For non-spherical particles, D is the surface or volume equivalent sphere diameter.

5.2.4 Radiative transfer computations

In this study, four free public access radiative transfer codes were used for computing the scattering properties of homogeneous spheres, layered spheres, aggregates and non spherical particles in fixed orientation. Radiative transfer computations were carried out considering the wavelength of the incident radiation equal to 488 nm and the refractive index of water equal to 1.334 (Morel and Bricaud, 1986).

T-Matrix

The T-matrix code (Mishchenko, 2000) is one of the most widely used tools for rigorously computing of electromagnetic scattering by non spherical particles. It is limited to particles with a phase shift parameter ($\rho = 2s(\lambda)(m_r - 1)$) up to about 10 (Clavano et al., 2007). The code is largely used for rotationally symmetric particles (spheroids or cylinders) in random orientations but a version exists also for rotationally symmetric particles in a fixed orientation. The latter is used, in this study, to simulate the scattering of non spherical particles flowing through the laser beam.

To describe the scattering of a non spherical particle in a fixed orientation, we have to define the directions of incident and scattered radiations and the orientation of the particle with respect to the reference frame. The laboratory reference frame, named L , is a right-handed Cartesian coordinate system with orientations (X, Y, Z) fixed in space. To specify the orientation of the particle, we introduce the particle reference frame, named P , with the (X_p, Y_p, Z_p) axis. The reference frames L and P have the same origin inside the particle. It is convenient to choose the direction of the Z_p axis such as it corresponds to the revolution axis of the particle, and to choose the Z axis along the propagation direction of the incident radiation (Mishchenko, 2000, Chen et al., 2006) (Fig. 5.1). The orientation of P with respect to L is specified by three Euler angles (α , β and γ) that transform

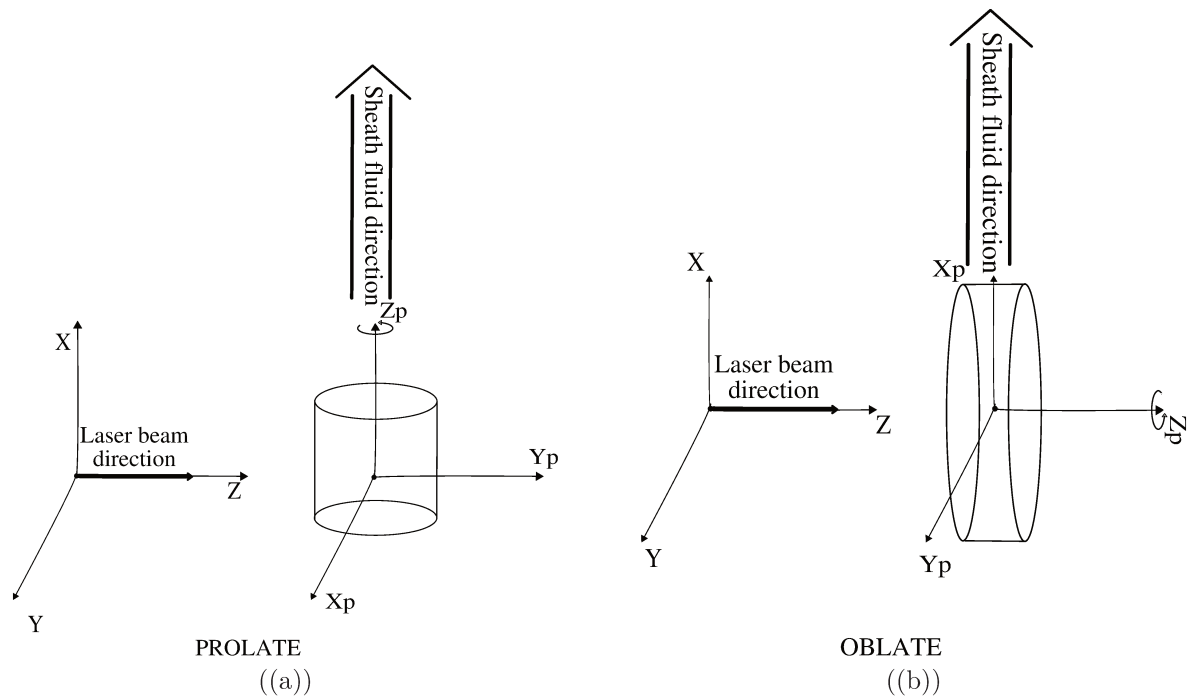


FIGURE 5.1 – Coordinate systems defined for a) a prolate and b) an oblate cylinder, incidence geometry and scattering configuration. $L\{ X, Y, Z \}$ is the laboratory reference frame with Z -axis along the propagating direction of the incident beam (bold arrow). $P\{ X_p, Y_p, Z_p \}$ is the particle reference frame. The particle flows up following the sheath fluid.

$L\{ X, Y, Z \}$ into $P\{ X_p, Y_p, Z_p \}$ (Mishchenko, 2000). Considering the orientations of the particles (Fig. 5.1), the Euler angles are equal to $(0^\circ, 90^\circ, 0^\circ)$ for prolate particles (EPS < 1, with EPS the ratio of the diameter to the particle length, Mishchenko and Travis (1998)) and $(0^\circ, 0^\circ, 0^\circ)$ for oblate particles (EPS > 1). The code inputs are : the Euler angles, the refractive index of the particle, the equivalent size diameter and the EPS of the particle.

Generalized Multiparticle Mie-solution

Computations of aggregates in fixed orientation are performed with the Generalized Multiparticle Mie-solution (GMM) code (Xu and Gustafson, 2001). The GMM's code, is an extension of the Mie solution from a single particle to the multi-particle case. The scattering formulation and numerical techniques used in this code are beyond the scope of this study but are described in Xu (1995) or more recently in Xu and Gustafson (2001). The direction of propagation of the incident plane wave defines the positive Z -axis and the

TABLE 5.1 – Position (x_p, y_p, z_p) of each sphere composing the simulated aggregate in the particle frame. C stands for Cluster, the number indicates the number of spheres composing the aggregate and the letter stands for a given configuration

Cluster name	Sphere position in the particle frame								
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉
C_2	{0,0,0}	{4,0,0}							
C_{3a}	{0,0,0}	{4,0,0}	{-4,0,0}						
C_{3b}	{3.46,0,0}	{0,2,0}	{0,-2,0}						
C_{4a}	{0,2,2}	{0,-2,-2}	{0,-2,2}	{2.83,0,0}					
C_{4b}	{0,2,-2}	{0,-2,-2}	{0,-2,2}	{2.83,0,0}					
C_{4c}	{0,2,-2}	{0,2,2}	{0,-2,2}	{2.83,0,0}					
C_{4d}	{0,2,-2}	{0,2,2}	{0,-2,-2}	{2.83,0,0}					
C_5	{0,2,-2}	{0,2,2}	{0,-2,-2}	{0,-2,2}	{2.83,0,0}				
C_{8a}	{0,2,2}	{0,-2,-2}	{0,-2,2}	{-4,2,2}	{-4,2,-2}	{-4,-2,-2}	{-4,-2,2}	{-6.83,0,0}	
C_{8b}	{0,2,-2}	{0,-2,-2}	{0,-2,2}	{-4,2,2}	{-4,2,-2}	{-4,-2,-2}	{-4,-2,2}	{-6.83,0,0}	
C_{8c}	{0,2,-2}	{0,2,2}	{0,-2,2}	{-4,2,2}	{-4,2,-2}	{-4,-2,-2}	{-4,-2,2}	{-6.83,0,0}	
C_{8d}	{0,2,-2}	{0,2,2}	{0,-2,-2}	{-4,2,2}	{-4,2,-2}	{-4,-2,-2}	{-4,-2,2}	{-6.83,0,0}	
C_{8e}	{0,2,-2}	{0,2,2}	{0,-2,-2}	{0,-2,2}	{-4,2,-2}	{-4,-2,-2}	{-4,-2,2}	{-6.83,0,0}	
C_{8f}	{0,2,-2}	{0,2,2}	{0,-2,-2}	{0,-2,2}	{-4,2,2}	{-4,-2,-2}	{-4,-2,2}	{-6.83,0,0}	
C_{8g}	{0,2,-2}	{0,2,2}	{0,-2,-2}	{0,-2,2}	{-4,2,2}	{-4,-2,-2}	{-4,-2,2}	{-6.83,0,0}	
C_{8h}	{0,2,-2}	{0,2,2}	{0,-2,-2}	{0,-2,2}	{-4,2,2}	{-4,-2,-2}	{-4,-2,2}	{-6.83,0,0}	
C_9	{0,2,-2}	{0,2,2}	{0,-2,-2}	{0,-2,2}	{-4,2,2}	{-4,2,-2}	{-4,-2,-2}	{-4,-2,2}	{-6.83,0,0}

scattering plane is defined by the X-Z plane. Considering the configuration of the clusters (Table. 5.1) and following the convention used by Edmonds (1957), the Euler angles are : $\alpha = 0^\circ$, $\beta = 90^\circ$ and $\gamma = 0^\circ$. In addition, the code inputs are the position (x,y,z) , the size and the refractive index of each sphere which composes the aggregate.

ScattnLay

The ScattnLay code constitutes an alternative to the Mie theory to simulate the optical properties of phytoplankton cells accounting for their structural variability. It considers a particle as a multi-layered sphere. The code is based on calculations of Mie scattering coefficients and efficiency factors combined with a standard solution of the scattering amplitude functions. In fact, the solution of the scattering by concentric layered spheres consists in expressing the electromagnetic fields in each layer l in terms of appropriate sets of spherical wave functions (see details in Yang (2003) and Peña and Pal (2009)). The code is efficient, numerically stable, and accurate for a large range of size parameters

($s(\lambda)$ up to 350) and refractive index. Each j -th layer, with $j = 1, 2, \dots, K$, is characterized by its complex refractive index relative to the medium ($m_j = m_{rj} + im_{ij}$) and by its size parameter s_j . The letter K stands for the number of layers constituting the cell.

5.2.5 Numerical databases

Database DTB1

A numerical database named DTB1 includes computations of aggregates and oblate or prolate cylinders in a fixed orientation. Firstly, radiative transfer simulations were performed with the T-Matrix algorithm for fixed oriented particles. We simulated monodispersed prolate and oblate cylinders with surface equivalent sphere diameter (D_e) between 3 and 7 μm (increment of 1) and EPS between 0.6 and 1.6 (increment of 0.1). These D_e and EPS ranges were observed on *Thalassiosira pseudonana* from scanning electron microscopy. We used a mean complex refractive index for phytoplankton cells of $m = 1.05 + i0.01$ (Clavano et al., 2007).

Secondly, computations were performed for 17 different cell aggregates. They were composed of 2, 3, 4, 5, 8 and 9 spheres arranged as indicated in Table 5.1. Each sphere composing the cluster had a diameter of 4 μm and a refractive index of : $m = 1.05 + i0.01$. In the following, clusters are named $C_2, C_{3a}, C_{3b}, C_{4a}$ to C_{4d}, C_5, C_{8a} to C_{8h} and C_9 ; the number indicates the number of spheres composing the cluster and the letter identifies a given configuration for the position of the spheres. The SEM micrographs of *Chlamydomonas concordia* showed that the most frequently encountered clusters correspond to the C_2, C_{3a}, C_{3b}, C_5 and C_9 . Note that, all the clusters presented a symmetric plan except C_{4a-d} and C_{8a-h} .

Database DTB2

A second database named DTB2 is made up of 590,000 computations, carried out with the ScattnLay code. An exhaustive review of the internal structure of phytoplankton cells was performed by Bernard et al. (2009). We used this review to define the relevant re-

fractive indices and the relative proportions of the different layers. Homogeneous spheres are used as the reference model to discuss the impact of the cell heterogeneity. The values of the real part of the refractive index range from 1.03 to 1.09 with 0.01 increments. Such values corresponds to cells with a high water content (Ahn et al., 1992, Aas, 1996, Mobley, 1994, Carder et al., 1972, Bricaud et al., 1988, Bricaud and Morel, 1986). The imaginary part spans from 0.001 to 0.015 in increments of $2.857 \cdot 10^{-4}$. The lower limit represents weakly absorbing cells, whereas the upper limit represents the extremely absorbing cells having photosynthetic pigments (Quirantes and Bernard, 2004, Stramski and Mobley, 1997, Stramski et al., 2001, Morel and Bricaud, 1981, Bricaud and Morel, 1986). As Bernard et al. (2009), we simulated a two-layered sphere model composed of an inner layer, the cytoplasm (cyto) and an outer layer, the chloroplast (chl). The cytoplasm is non pigmented and weakly absorbing as it is mostly composed of water (Bricaud et al., 1992, Zaneveld and Kitchen, 1995, Bernard et al., 2009, Stephens, 1995). The chloroplast, constituted of pigment-proteins, responsible for photosynthesis, is extremely absorbing (Geider and Osborne, 1987, Morel and Bricaud, 1981). The relative proportions are $60\%_{cyto}-40\%_{chl}$, $70\%_{cyto}-30\%_{chl}$ and $80\%_{cyto}-20\%_{chl}$. In addition, cells with a silica wall (as THAL) are simulated as three-layered spheres. The cytoplasm is the inner layer, the chloroplast is the middle layer and the non-absorbing silica wall is the outer layer (Aas, 1996). The relative volumes are $80\%_{cyto}-18.625\%_{chl}-1.375\%_{Si}$ or $80\%_{cyto}-15\%_{chl}-5\%_{Si}$. The relative volume of the silica wall (V_{Si}) is measured from SEM micrographs. Arbitrarily, we chose the fourth day of the experiment to measure V_{Si} . The mean value, equal to $1.375\% \pm 0.34$, is considered as a mean reference value. The V_{Si} of 5% is considered as an extreme case as in Kitchen and Zaneveld (1992). The real part of the cytoplasm refractive index ($m_r(cyto)$) is fixed to 1.02. This value falls within the interval of referenced indices ($1.015 \leq m_r(cyto) \leq 1.035$; Bricaud et al. (1992), Kitchen and Zaneveld (1992), Meyer (1979), Zaneveld and Kitchen (1995), Bernard et al. (2009), Quirantes and Bernard (2006), Charney and Brackett (1961)). The $m_i(cyto)$ is fixed to 2.0739×10^{-4} (according to Eq. (22) in Bernard et al. (2009)). The value of $m_r(Si)$ is equal to 1.07 or 1.09 (as given in Kitchen and Zaneveld (1992), Aas (1996), Geider and Osborne (1987), Mueller

(1973)) and $m_i(Si)$ is of 0.0001 or 0.0 (as in Kitchen and Zaneveld (1992), Stramski et al. (2001), Mueller (1973)). Concerning the chloroplast, $m_r(chl)$ and $m_i(chl)$ are calculated according to the Gladstone and Dale formula (Aas, 1996) :

$$\sum_j m_j \nu_j = m_m, \quad (5.10)$$

where m_j and ν_j are the complex refractive index and the relative volume of the j -th layer, and m_m the complex equivalent refractive index ($m_m = m_{r_m} + im_{i_m}$). Note that, $m_r(chl)$ and $m_i(chl)$ are selected so that the equivalent m_{r_m} and m_{i_m} of phytoplankton cells fall within the m_{r_m} and m_{i_m} ranges of homogeneous spheres. The knowledge of the complex equivalent refractive index is useful to compare the simulations of heterogeneous and homogeneous spheres or the simulations of heterogeneous spheres among themselves, regardless the number of layers and the relative proportion of each layer. The $m_r(chl)$ values above 1.23 and under 1.06 were disregarded because they do not fall within the range of referenced values (Bernard et al. (2009) and references there in). It results that the upper and lower limits of the equivalent m_{r_m} are 1.04-1.08 for 70%_{cyto}-30%_{chl} spheres, 1.03-1.06 for 80%_{cyto}-20%_{chl} spheres and 80%_{cyto}-18.625%_{chl}-1.375%_{Si} spheres, and 1.03-1.05 for 80%_{cyto}-15%_{chl}-5%_{Si} spheres (in increments of 0.01). Diameters were fixed to enclose the range of size as observed from the Cytosense. Remind that, the Cytosense provides estimates of the particle length. For rather spherical particles as THAL and CHLAM, we assume that the length is equal to the diameter of the particle (see section 5.3.6). Simulations were performed for D between 1 to 40 μm (0.166 μm increment).

5.3 Results

5.3.1 Morphology of the species

The morphologies of THAL and CHLAM are different as shown on the SEM images (Fig. 5.2). THAL (Figs. 5.2(a) and 5.2(b)) is a species of marine diatom characterized by

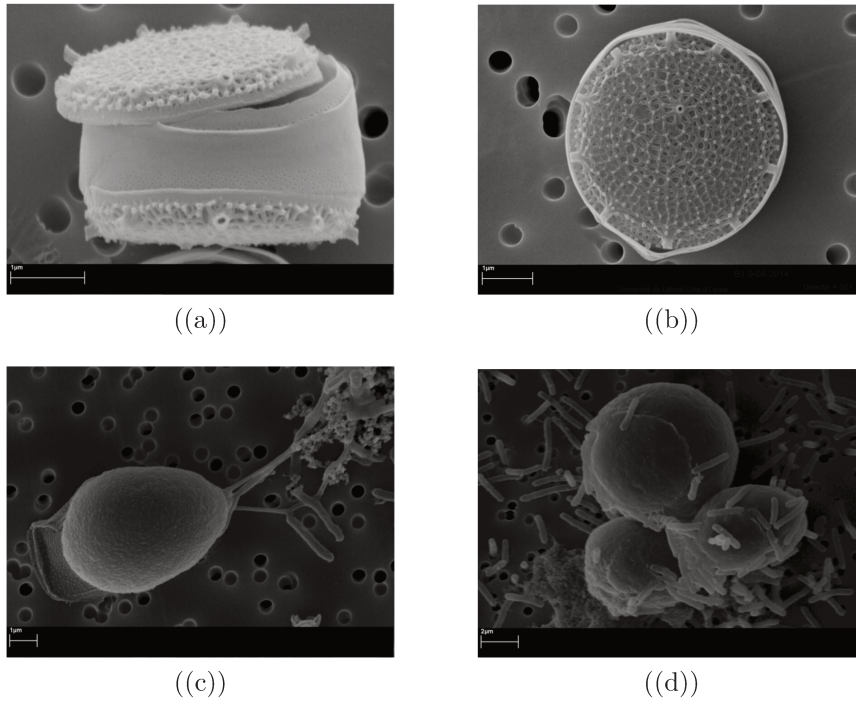


FIGURE 5.2 – Scanning electron microscopy images of a) side and b) top view of *Thalassiosira pseudonana* ; c) single cell of *Chlamydomonas concordia* ; and d) aggregate form of *Chlamydomonas concordia* (for the fourth day of the experiment).

a silica wall. SEM micrographs showed that THAL shape was cylindrical with an surface equivalent diameter D_e between 3 and 7 μm . Over the whole experiment, the mean EPS values varies between 0.6 and 1.6. We note an aggregate formation at the end of the experiment (see section 5.3.6). CHLAM is a flagellate and contrary to THAL, does not have a silica wall. The CHLAM cell is an ovoid with a flagellum (Fig. 5.2(c)). CHLAM cells can form aggregates as shown on Fig. 5.2(d). The surface equivalent diameter was between 2 and 34 μm and the mean EPS was between 0.6 and 0.7.

5.3.2 Impact of the polarization

In this paper, the methodology of Duforêt-Gaurier et al. (2015) is used to derive the forward (σ_{FSC}), sideward (σ_{SSC}) and backward (σ_{bb}) cross sections (μm^2). First, the weighting functions for the forward and sideward detectors, are calculated to convert numerical counts into cross sections. Then, the σ_{SSC} is converted into σ_{bb} using the theoretical relationship defined in Duforêt-Gaurier et al. (2015). As shown in the section 5.2.3 and as

pointed out by the authors in their conclusions, for oriented non-spherical particles, the signal measured by the Cytosense depends on the first element of the scattering matrix Z_{11} but can also depend on Z_{13} . In this case, the weighting functions of the forward and sideward detectors are still valid but the theoretical relationship to derive σ_{b_s} from σ_{SSC} can not be applied anymore. Indeed, this relationship was established from computations according to Eq. (5.5) without considering Z_{13} . For small cylinders, ovoids or aggregates as THAL and CHLAM, it is important to check if Z_{13} has a significant impact on the sideward and/or backward cross sections (Eq. (5.8)). For this purpose, the DTB1 database is used (see section 5.2.5). Figure 5.3 shows the ratio Z_{13}/Z_{11} (%) as a function of the azimuth and zenith angles for two cylinders with $D_e = 6 \mu\text{m}$. The first one is a prolate with an EPS of 0.7 (Fig. 5.3(a)) and the second one is an oblate with an EPS of 1.3 (Fig. 5.3(b)). The Z_{13}/Z_{11} ratio (absolute value) varies between 0% and $\pm 100\%$. It shows that, in some cases, Z_{13} is not negligible as compared to Z_{11} . The ratio Z_{13}/Z_{11} shows antisymmetric features. The values observed for ϕ between $[0^\circ, 90^\circ[$ (whatever θ) are positive, whereas the values between $[90^\circ, 180^\circ[$ are negative and are their exact opposite. The same observation can be done by comparing Z_{13}/Z_{11} for ϕ between $[180^\circ, 270^\circ[$ and between $[270^\circ, 360^\circ[$. The antisymmetrical features are due to Z_{13} and not Z_{11} . Indeed, we studied the Z_{11} values (not show here) as function of θ and ϕ as the same way as for Z_{13}/Z_{11} . We noticed that Z_{11} presents some symmetrical features : values between $[0^\circ, 90^\circ[$ are identical to values between $[90^\circ, 180^\circ[$. Similarly, values between $[180^\circ, 270^\circ[$ are identical to values between $[270^\circ, 360^\circ[$. The Z_{11} and Z_{13} functions are studied as a function of the zenith angle after the integration over the azimuth angle (not shown here). Due to the antisymmetrical features, $Z_{13}(\theta)$ is null whatever θ , contrary to $Z_{11}(\theta)$. $Z_{11}(\theta)$ displays, as expected, a highly peaked forward scattering and a rather flat broad minimum for medium scattering angles following by an increase at backward angles. It results that the sideward or backward cross section depends only on Z_{11} . Note that, same conclusions are observed for all of the other simulated cylinders. We supposed that Z_{11} displays symmetrical features and Z_{13} antisymmetrical features because cylinders are bisected by a plane of symmetry. To validate this hypothesis, we studied the Z_{13}/Z_{11} ratio

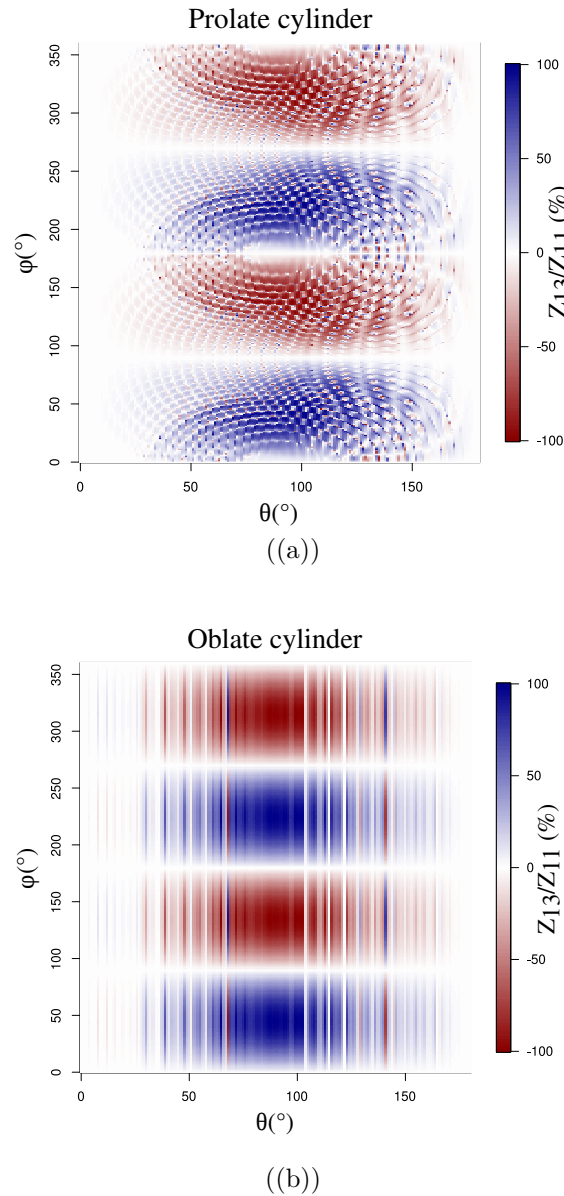


FIGURE 5.3 – Color contour plots Z_{13}/Z_{11} (%), vs the zenith and the azimuth angles for monodisperse a) prolate (EPS = 0.7) and b) oblate (EPS = 1.3) cylinders in a fixed orientation with an surface equivalent sphere radius of 3 μm in fixed orientation. The refractive index is $1.05 + i0.01$.

for aggregates with a plane of symmetry (C_5 and C_9) and aggregates without a plane of symmetry (C_{4a-d} and C_{8a-h}). Figure 5.4 displays only the ratio Z_{13}/Z_{11} (%) for the clusters C_9 and C_{8a} . For C_9 , Z_{13}/Z_{11} and Z_{11} shows antisymmetrical and symmetrical features, as previously observed for the cylinders. On the contrary, for C_{8a} , the values of Z_{13}/Z_{11} for ϕ between $[0^\circ, 90^\circ]$ are not strictly the opposites of the values between $[90^\circ, 180^\circ]$ (see black circles on the Fig. 5.4(b)). The same remark can be done comparing Z_{13}/Z_{11} for ϕ $[180^\circ, 270^\circ]$ and $[270^\circ, 360^\circ]$. Figure 5.5 displays Z_{11} and Z_{13} as a function

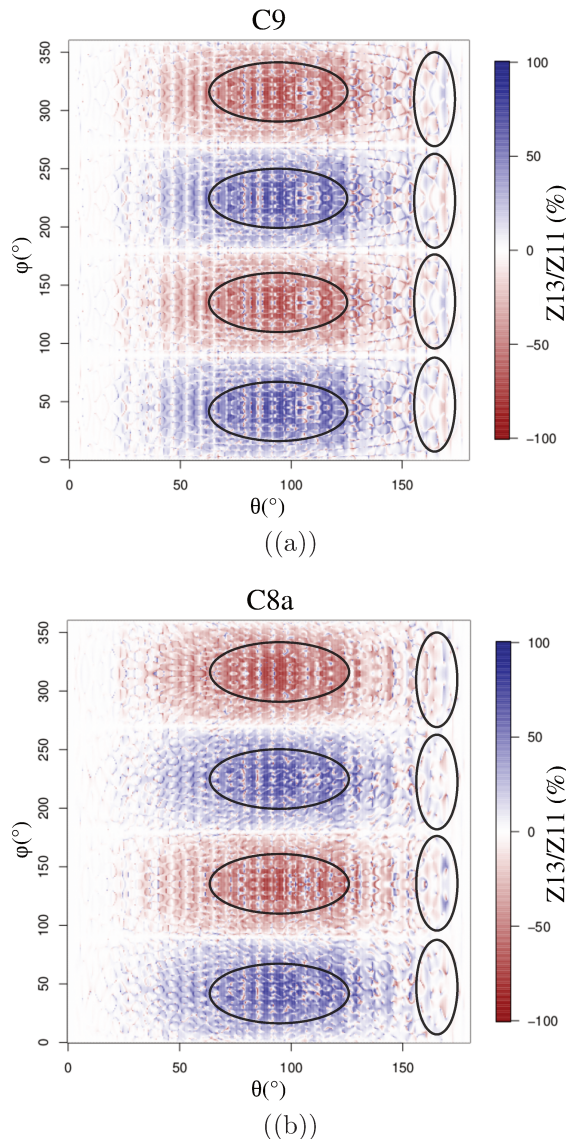


FIGURE 5.4 – Color contour plots Z_{13}/Z_{11} (%), vs the zenith and the azimuth angles for monodisperse aggregate for cluster a) C_9 and b) C_{8a} in a fixed orientation. The diameter and refractive index of each sphere are $4 \mu\text{m}$ and $1.05 + i0.01$, respectively.

of the zenith angle for the C_9 and C_{8a} aggregates after the integration over ϕ . Please note that the absence of values on the Z_{13} curve corresponds to negative values, not plotted using a logarithmic scale. The integrated Z_{11} values are similar for C_9 and C_{8a} . As for the cylinders, the integrated Z_{13} values are null for C_9 . On the contrary, and as expected, the integrated Z_{13} values are not null for C_{8a} . It results that Z_{13} impacts the sideward and backward cross sections. Considering the extreme case with $\alpha = 1$, which means that the particles is totally polarized at $+45^\circ$, we quantified the impact of Z_{13} on σ_{SSC} and σ_{b_b} for clusters C_{4a-d} and C_{8a-h} . Results showed that the absolute relative differences are not

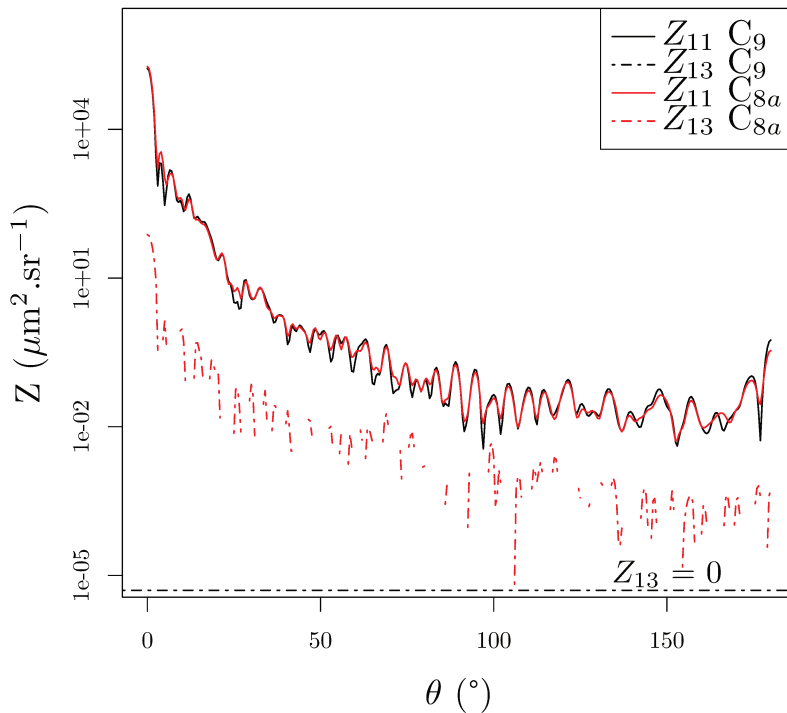


FIGURE 5.5 – Elements Z_{11} (solid lines) and Z_{13} (dotted lines) of the phase matrix (after integration according to the azimuth angle) as a function of the zenith angle for the cluster C_{8a} and C_9 .

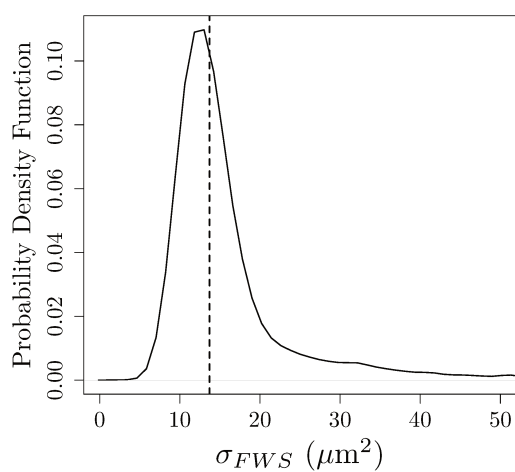
negligible (Table 5.2). We note that for other value of α , excepted if $\alpha = 0$, the impact of Z_{13} is lower. Computation results for aggregates (C_{4a-d} and C_{8a-h}) fall within the dispersion observed around the regression established in Duforêt-Gaurier et al. (2015). It results that the impact of Z_{13} does not exceed *a priori* the variability due to the refractive index or the particle size. For this reason, we will consider that the established relationship is valid despite the impact of the polarization. Moreover, the SEM micrographs showed that in most cases, aggregates present a plane of symmetry.

5.3.3 The Cytosense measurements

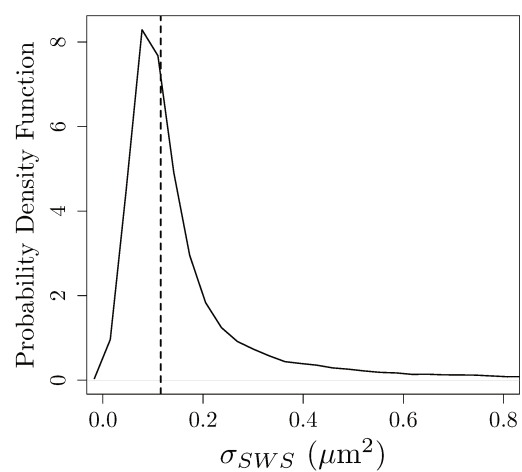
Cytosense measurements have been conducted over the four batches. From each Cytosense analyze, living phytoplankton cells and degenerated cells were identified separately from their optical properties and fluorescence signals. A distinction was also made bet-

TABLE 5.2 – The mean absolute relative difference (%) between the σ_{SSC} or σ_{bb} values obtained considering the Z_{13} term and without considering Z_{13} for different aggregate configurations.

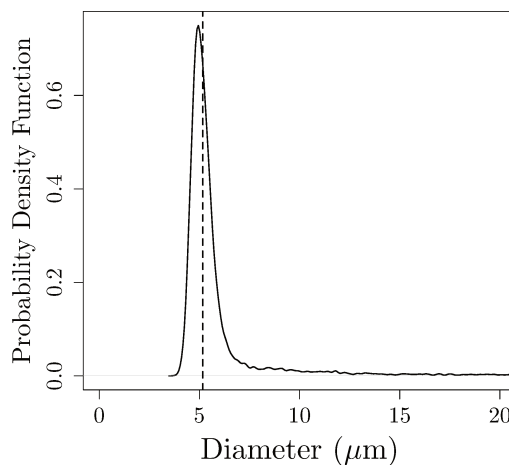
Variable	MARD (%)	
	C_{4a-d}	C_{8a-h}
σ_{SSC}	13.7	7.4
σ_{bb}	24.3	9.7



(a)



(b)



(c)

FIGURE 5.6 – Probability density function of (a) forward (b) sideward cross sections (μm^2) and (c) diameter of *Thalassiosira pseudonana* the fourth day experiment (21667 values). The dotted lines correspond to the median values.

ween clusters corresponding to living cells of THAL and clusters corresponding to living cells of CHLAM, to detect a possible contamination. The forward (FSC) and sideward scattering (SSC) signals were converted into forward (σ_{FSC}) and sideward (σ_{SSC}) scattering cross sections according to the Duforêt-Gaurier *et al.*, 2015's methodology. The probability density functions (PDFs) were calculated with the R software (version 3.2.5) from measurements observed for the living cells. Figures 5.6(a)-5.6(c) and 5.7(a)-5.7(c) display the PDFs of σ_{FSC} , σ_{SSC} and D for living cells of THAL and CHLAM. The median value of (σ_{FSC}), (σ_{SSC}) and D , named $\tilde{\sigma}_{\text{FSC}}$, $\tilde{\sigma}_{\text{SSC}}$ and \tilde{D} , were calculated from the PDFs. Results presented on the figures 5.6(a)-5.6(c) and 5.7(a)-5.7(c) correspond to measurements realized four days after the beginning of the experiment, during the exponential phase.

For CHLAM and THAL, about one per cent of the data corresponded to particles with a diameter between 40 and 100 μm . These values were much higher than diameters measured from SEM and also with diameters referenced in literature for the two species (Stramski and Mobley, 1997, Vaillancourt *et al.*, 2004, Whitmire *et al.*, 2010) but pulse shape flow cytometry records as well aggregates composed of several individual cells. We wanted to exclude any outliers, a cut-off value was applied at the last percentile ($q = 0.99$) to obtain a population representative of each species. Then, the median value was calculated for the forward ($\tilde{\sigma}_{\text{FSC}}$), sideward ($\tilde{\sigma}_{\text{SSC}}$) and cell diameter (\tilde{D}). The median value was preferred to the mean value as the PDFs of cross sections do not follow a Gaussian distribution. The median values are close to the PDF maximum, whereas mean values are much higher. For cross sections, median values were similar between the two species : $\tilde{\sigma}_{\text{FSC}}$ is 13.75 and 13.5 μm^2 and $\tilde{\sigma}_{\text{SSC}}$ is 0.118 and 0.117 μm^2 for CHLAM and THAL, respectively. However, in terms of scattering efficiency, differences were observed between CHLAM and THAL (see section 5.3.6). Concerning the diameter, the median was of 6.76 μm for CHLAM and 5.17 μm for THAL with a minimum and maximum values of 3.8 and 21.6 μm , and 3.7 and 39 μm , respectively.

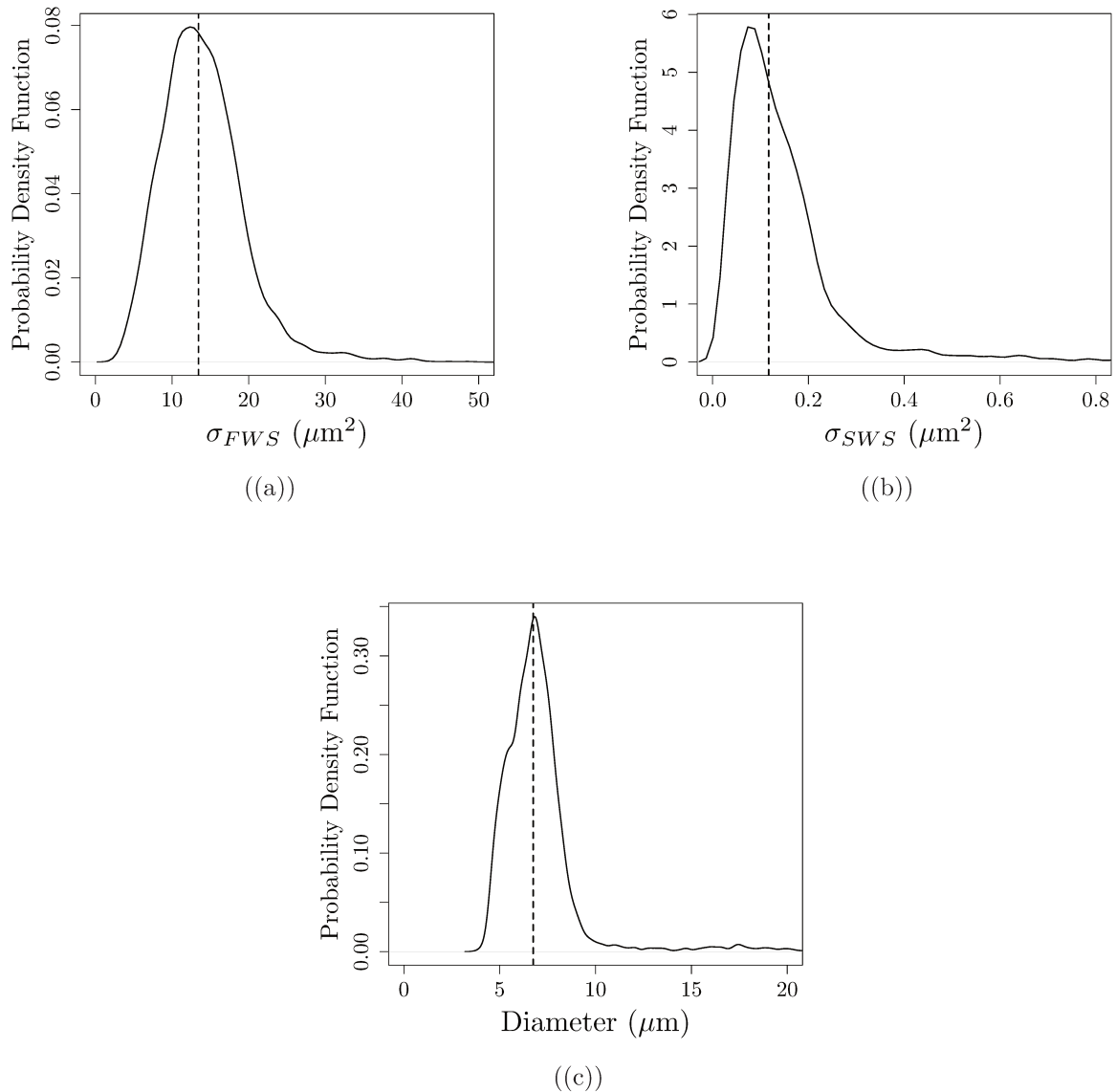
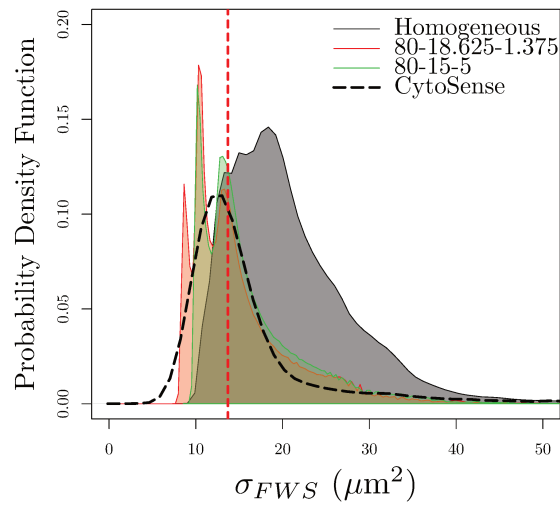


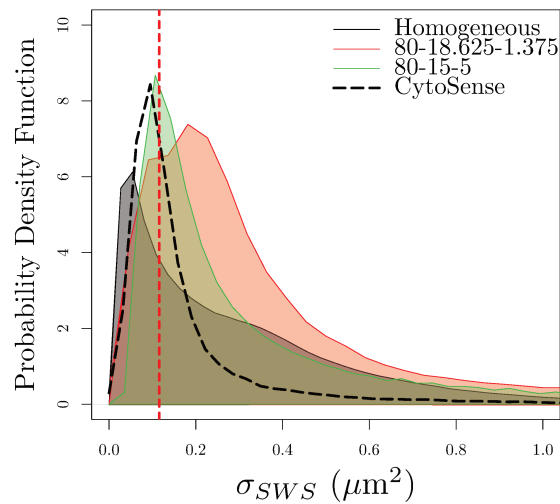
FIGURE 5.7 – Probability density function of (a) forward (b) sideward cross sections (μm^2) and (c) diameter of *Chlamydomonas concordia* the fourth day experiment (4638 values). The dotted lines correspond to the median values.

5.3.4 Comparison of the measured and theoretical values of forward and sideward cross sections

The first step consists in checking that the Cytosense estimates of σ_{FSC} and σ_{SSC} for the cultures, were consistent with values as predicted by theory. The comparison exercise was based on radiative transfer simulations because for phytoplankton cultures, *in situ* measurements of forward or sideward cross sections, particle by particle, are not available



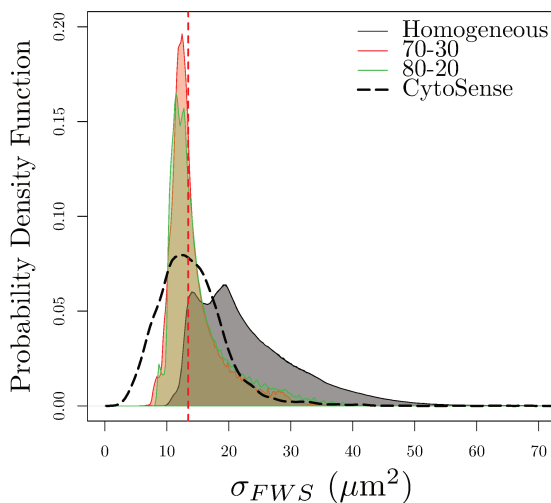
((a))



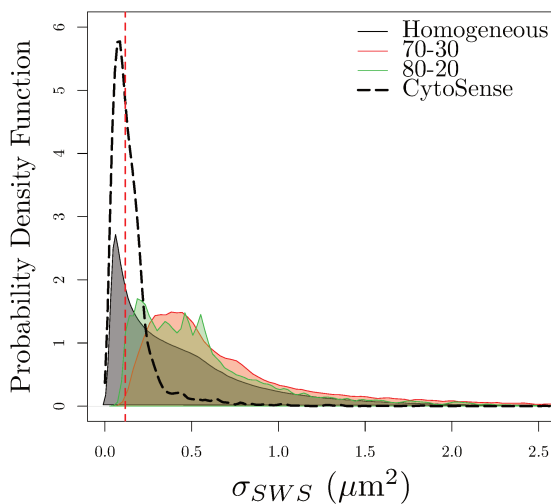
((b))

FIGURE 5.8 – Probability density function of (a) forward and (b) sideward cross sections (μm^2) simulated according to different models. The models plotted are : homogeneous sphere (gray), $80\%_{cyto}-18.625\%_{chl}-1.375\%_{Si}$ (red) and $80\%_{cyto}-15\%_{chl}-5\%_{Si}$ (green). The dotted lines are PDF derived from the Cytosense measurements of THAL, equivalent at the Fig. 5.6. The red dotted vertical lines correspond to the median of Cytosense measurements.

in literature. As explained previously, the T-Matrix code for oblate and prolate cylinders is limited to $\rho < 10$, which correspond to $D < 8 \mu\text{m}$. This code is not used for the comparison exercise because it does not allow to encompass entirely the particle size distribution (PSD) of the sample. For this comparison, we used only computations of ScattnLay code



(a)



(b)

FIGURE 5.9 – Probability density function of (a) forward and (b) sideward cross sections (μm^2) simulated according to different models. The plotted models are : homogeneous sphere (gray), 70%_{cyto}-30%_{chl} (red) and 80%_{cyto}-20%_{chl} (green). The dotted lines are PDF derived from the Cytosense measurements of CHLAM, equivalent at the Fig. 5.7. The red dotted vertical lines correspond to the median of Cytosense measurements.

(DTB2). For THAL, the Cytosense measurements were compared with computations of three-layer spheres (80%_{cyto}-18.625%_{chl}-1.375%_{Si} and 80%_{cyto}-15%_{chl}-5%_{Si}) standing for particles with a silica frustule (Fig. 5.8). For CHLAM, they were compared with computations of two-layered spheres only (Fig. 5.9). As the particle size impacts the cross section, simulations were multiplied by the particle size distribution measured on the

sample by the Cytosense (Figs. 5.6(c) and 5.7(c)). Thus, measured and simulated cross sections were directly compared. Study cases corresponding to homogeneous spheres were also considered as reference cases. For clarity, simulated forward and sideward cross sections are only provided in Fig. 5.8 for three sphere models. Some σ_{SSC} values for homogeneous spheres are in the same order of magnitude than those observed for coated spheres. It corresponds to study cases for which homogeneous spheres have a higher equivalent real refractive index (m_{rm}). If we consider the same m_{rm} for homogeneous and coated spheres, homogeneous spheres have always a weaker σ_{SSC} than heterogeneous spheres, and consequently have a higher σ_{FSC} . For instance, considering a 5 μm sphere and $m_m = 1.05 + i0.01$, $\tilde{\sigma}_{SSC}$ increases from 0.11 μm^2 using the homogeneous model to 0.20 μm^2 using the 80%_{cyto}-18.625%_{chl}-1.375%_{Si} model. For heterogeneous spheres, the variation of the refractive index inside the cell influences internal and external electromagnetic fields (Bernard et al., 2009, Gordon and Du, 2001). It implies more multiple internal reflections that increase the proportion of side or backscattering light and so decrease the proportion of forward scattering light. For σ_{SSC} , the position and the sharpness of the PFD maximum vary with the considered model. It highlights that the sideward scattering as the backscattering, is more influenced by the cell structure than the forward scattering (Meyer, 1979, Dubelaar et al., 1987, Dubelaar and Jonker, 2000, Sullivan et al., 2013). These results obtained from a very large and complete database are conform with previous studies (Meyer, 1979, Quirantes and Delgado, 2001). For CHLAM, lowest values of σ_{FSC} and σ_{SSC} were not featured by the simulations; they represent 9% and 16% of CHLAM data, respectively. It may evidence a slight underestimation of the Cytosense estimates as pointed out in Duforêt-Gaurier et al. (2015). In some cases, the aggregate formation could also induce some low σ_{FSC} values. We compared σ_{FSC} and σ_{SSC} for sphere aggregates with σ_{FSC} and σ_{SSC} for their respective surface equivalent homogeneous spheres. Aggregates C_2 , C_{3a} and C_9 displays lower σ_{FSC} , whereas aggregates C_{3b} , C_4 , C_5 and C_8 display higher σ_{FSC} (Fig. 5.10). For the sideward scattering, the σ_{SSC} are always lower for aggregates than for surface equivalent homogeneous spheres. Overall, the aggregate formation tends to decrease the scattering. For aggregates with a symmetric plane, the

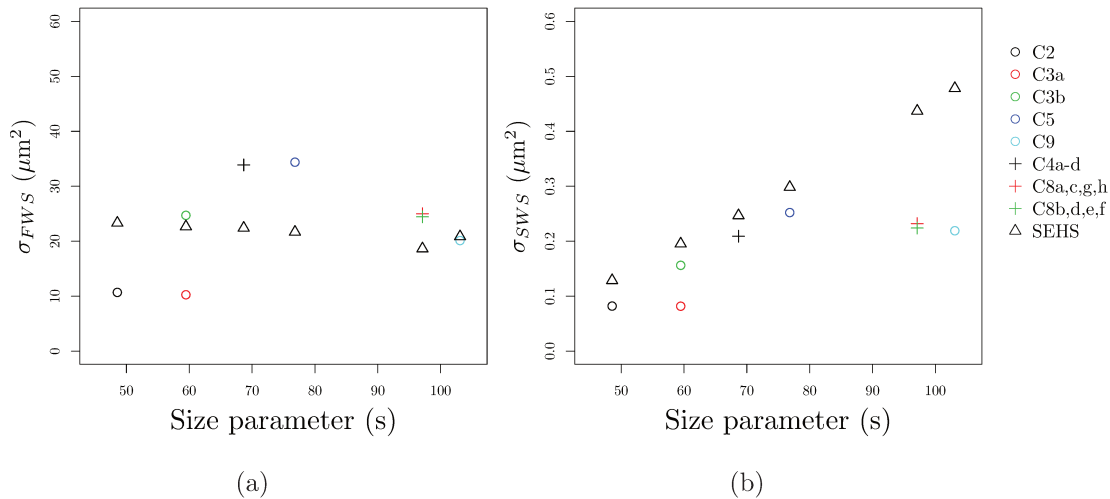


FIGURE 5.10 – (a) The forward and (b) sideward cross sections for aggregates with a symmetric plane (empty circle) without a symmetric plane (cross) and surface equivalent homogeneous sphere (SEHS; empty triangle) as a function of the size parameter (s).

σ_{SSC} and σ_{FSC} decrease in average of 37% and 10% respectively. As previously explained, the cell heterogeneity tends to decrease the forward scattering. So, if we combine the impact of cell heterogeneity and cell aggregation, we suppose that the forward scattering will be smaller. Unfortunately, this hypothesis cannot be tested, as to our knowledge, no code, in free access, simulates the optical properties of oriented aggregates formed by heterogeneous spheres.

5.3.5 The backscattering cross section

For each particle, the sideward cross section is converted into the backscattering cross section (σ_{b_b}) from a theoretical relationship as in Duforêt-Gaurier *et al.* (2015) :

$$\sigma_{b_b}(488) = 10^{-0.6} \times \sigma_{SSC}(488)^{1.09} \quad (R^2 = 0.9). \quad (5.11)$$

The Eq. (5.11) was established from the Duforêt-Gaurier *et al.*, 2015's theoretical database including 450,000 simulations from the ScattnLay code. In this study, 140,000 study cases were added to the existing database to consider three-layered sphere with (80%_{cyto}-15%_{chl}-5%_{Si}) and silica beads with a refractive index of 1.09 (only silica beads with a

refractive index of 1.07 were previously considered in the Duforêt-Gaurier *et al.*, 2015's database). This explains why the coefficients of Eq. (5.11) are slightly different from the coefficients of the Duforêt-Gaurier *et al.*, 2015's relationship. In the framework of the microcosm experiment, two specific theoretical relationships were developed to account for the cell structures of CHLAM and THAL, more precisely. The theoretical relationship P2 was established from computations of the 80%_{cyto}-20%_{chl} sphere model, whereas P3 was calculated only from computations of the 80%_{cyto}-18.625%_{chl}-1.375%_{Si} sphere model. Note that P3, stands for particles with a silica wall as THAL. The P1 relationship is calculated from computations of homogeneous spheres only. Estimates derived from P1 will be compared with estimates derived from P2 to highlight the impact of the heterogeneity. P1, P2 and P3 are :

$$(P1) \quad \sigma_{b_b}(488) = 10^{-0.77} \times \sigma_{SSC}(488)^{1.16} \quad (R^2 = 0.96) \quad (5.12)$$

$$(P2) \quad \sigma_{b_b}(488) = 10^{-0.56} \times \sigma_{SSC}(488)^{1.1} \quad (R^2 = 0.98) \quad (5.13)$$

$$(P3) \quad \sigma_{b_b}(488) = 10^{-0.59} \times \sigma_{SSC}(488)^{1.04} \quad (R^2 = 0.82). \quad (5.14)$$

For each daily Cytosense analyze and each batch, the median ($\tilde{\sigma}_{b_b}$) was calculated from the σ_{b_b} distribution of living phytoplankton cells. The values for the two batches of each species were similar. Thus, the mean $\tilde{\sigma}_{b_b}$ per species was calculated with its associated standard deviation over the time period of the exponential growth phase (named $\langle \tilde{\sigma}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle$) (Table 5.3). We do not present the mean $\langle \tilde{\sigma}_{b_b} \rangle$ calculated over the other growth phases as referenced values in the literature concerned only the exponential phase. Concerning THAL, using the parametrization P3, which stands for particles with a silica wall, the $\langle \tilde{\sigma}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle$ is higher of about 11% than the value obtained using the global parametrization. Similarly, for CHLAM, the $\langle \tilde{\sigma}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle$ is higher of about 6% using P2 than the mean value obtained using the global parametrization. For THAL and CHLAM,

TABLE 5.3 – The mean values of the backscattering cross sections (μm^2) for THAL and CHLAM during the exponential phase according to different parametrizations. Note that P3 is applied only for THAL as CHLAM are naked cells.

THAL	
Parametrizations	$\langle \tilde{\sigma}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle (\mu\text{m}^2)$
Global	0.035 ± 0.013
homogeneous spheres (P1)	0.021 ± 0.008
80%-20% (P2)	0.037 ± 0.014
80%-18.625%-1.375% (P3)	0.039 ± 0.013
CHLAM	
Parametrizations	$\langle \tilde{\sigma}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle (\mu\text{m}^2)$
Global	0.036 ± 0.01
homogeneous spheres (P1)	0.021 ± 6.10^{-3}
80%-20% (P2)	0.038 ± 0.011

using the parametrization P1, $\langle \tilde{\sigma}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle$ is about 60% lower than the values obtained using the global parametrization. The latter highlights that the backscattering signal is underestimated when the phytoplankton cells are considered as a homogeneous spheres.

In this section, the $\langle \tilde{\sigma}_{b_b} \rangle$ estimates will be compared with references values found in the literature. Unfortunately, as we did not find some referenced measurements of backscattering cross sections for CHLAM, the comparison exercise was only realized for THAL. The σ_{b_b} of THAL has already been studied by Stramski and Mobley (1997), Vaillancourt et al. (2004) and Whitmire et al. (2010). Stramski and Mobley (1997) derived the refractive index of different phytoplankton cultures from measurements of the PSD, $a(\lambda)$ and $c(\lambda)$. Then, the refractive index and the PSD are used as inputs to simulate the scattering phase function using Mie theory from which the backscattering cross section is derived. For THAL, Stramski and Mobley (1997) found low values around $0.008 \mu\text{m}^2$ at 488 nm. This large difference with our results was expected because the backscattering estimates from Stramski and Mobley (1997) were obtained from the Mie theory. As discussed previously, considering homogeneous spheres underestimates greatly σ_{b_b} . We note that the mean va-

lue obtained from P1, which considers only computations for homogeneous spheres, is higher than value obtained by Stramski and Mobley (1997). Indeed, Stramski and Mobley (1997) used a real refractive index of about 1.045 while P1 is obtained from radiative transfer simulations considering real refractive indices between 1.03 and 1.09. The imaginary refractive index is of about 0.007 for Stramski and Mobley (1997) and between 0.001 and 0.015 for P1. Vaillancourt et al. (2004) used a HOBI Labs Hydroscat-6 (HS6) or an ECO-VSF (WETLabs) to measure b_b during the exponential phase of batch cultures. They achieved the phytoplankton abundance by microscopic counts or flow cytometry. A digital image analysis of cells under epifluorescence microscopy was realized to estimate the biovolume and derive the equivalent size diameter. Vaillancourt et al. (2004) found values around 0.041 and 0.054 μm^2 at 470 and 510 nm, respectively. They measured the abundance of BAC for all the cultures. Contaminated cultures were removed from their study. During the exponential phase of our experiment, we found, especially with the P3 relationship, values similar to Vaillancourt *et al.*, 2004's ones. Whitmire et al. (2010) carried out measurements of b_b with an HOBI Labs Hydroscat-6 (HS6) and obtained the cell concentration, N , from a Coulter counter. During the exponential growth stage, Whitmire et al. (2010) referenced, at 442 nm, σ_{b_b} values of 0.149 μm^2 and 1.95 μm^2 for THAL suspensions, coming from two different culture collections. The authors explained such differences by the impact of the cell size on the backscattering signal. Indeed, the mean equivalent size diameter, derived from fitting a Gaussian function to the Coulter counter frequency distribution, was very different between the two THAL suspensions (4.2 μm and 13.93 μm). At the same growth stage, we found lower values. Differences with Whitmire et al. (2010) may be explained by a possible underestimation of our estimates due to the empirical relationship. Indeed, Duforêt-Gaurier et al. (2015) noticed that in some cases the empirical relationship can underestimate the backscattering cross section. Nevertheless, Whitmire et al. (2010) realized bulk measurements instead of single cell ones. It implies that non algal particles, as bacteria can increase $\tilde{\sigma}_{b_b}$. Although, Whitmire et al. (2010) assume a low bacteria contamination, they did not realize measurements of bacteria abundance and so did not quantify precisely their possible influence on their

estimates. Differences with Whitmire et al. (2010) and Vaillancourt et al. (2004) could be due to the difference of wavelength. It is rather difficult to quantify the impact of the wavelength. Actually, the backscattering coefficient, and consequently the cross section, do not follow a linear curve with the wavelength (Fig. 3 of Whitmire et al. (2010)).

For applications in natural waters, a specific relationship for diatoms could be used. It will required to re-calculate P3 from a larger database including three-layered sphere computations accounting for different thicknesses for the silica wall. Nevertheless, the use of the global parameterization is more straightforward as it required only to identify living cells. The use of a specific relationship would require a more detailed analysis of the cytograms to isolate carefully diatom cells.

5.3.6 The backscattering efficiency factor

The backscattering efficiency factor is derived from σ_{b_b} and D estimated from the Cytosense (\tilde{Q}_{b_b}) (Eq. (5.9)) and compared with referenced values. The mean values of \tilde{Q}_{b_b} were calculated for CHLAM and THAL, only for the exponential phase (Table 5.4). Estimates obtained from P1, P2 and P3 were compared as previously done for σ_{b_b} . For CHLAM, the $\langle \tilde{Q}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle$ is higher of about 8% using P2 than the mean value obtained using the global parametrization. Similarly, for THAL, using the parametrization P3, the $\langle \tilde{Q}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle$ is higher of about 13% than the value obtained using the global parametrization. For THAL, during the exponential phase, Whitmire et al. (2010) referenced Q_{b_b} values of $1.1 \cdot 10^{-2}$ and $1.3 \cdot 10^{-2}$ at 442 nm, while Vaillancourt et al. (2004) reported values of $4.3 \cdot 10^{-3}$ and $3.3 \cdot 10^{-3}$ (at 470 and 510 nm respectively). Our estimates, especially using the parametrization P3, are close to one of the two values measured by Vaillancourt et al. (2004). Differences can be explained as previously (difference of wavelength, underestimation of the Cytosense estimates, ...) but differences may be also explained by inaccuracies on the cell diameter as derived from the Cytosense. The Cytosense derives the longer axis of the particle (L) on the basis of the length of the recorded signal at half maximum. Some inaccuracies can occur on the Cytosense measurement of L . For THAL, the PDF

TABLE 5.4 – The mean values of the efficiency factor for THAL and CHLAM during the exponential phase according to different parametrizations. Note that P3 is applied only for THAL as CHLAM are naked cells.

THAL	
Parametrizations	$\langle \tilde{Q}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle$
Global	$1.06 \cdot 10^{-3} \pm 2.6 \cdot 10^{-4}$
homogeneous spheres (P1)	$6.3 \cdot 10^{-4} \pm 1.5 \cdot 10^{-4}$
80%-20% (P2)	$1.14 \cdot 10^{-3} \pm 2.8 \cdot 10^{-4}$
80%-18.625%-1.375% (P3)	$1.2 \cdot 10^{-3} \pm 2.9 \cdot 10^{-4}$
CHLAM	
Parametrizations	$\langle \tilde{Q}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle$
Global	$7.53 \cdot 10^{-4} \pm 1.3 \cdot 10^{-4}$
homogeneous spheres (P1)	$4.5 \cdot 10^{-4} \pm 7.9 \cdot 10^{-5}$
80%-20% (P2)	$8.1 \cdot 10^{-4} \pm 1.4 \cdot 10^{-4}$

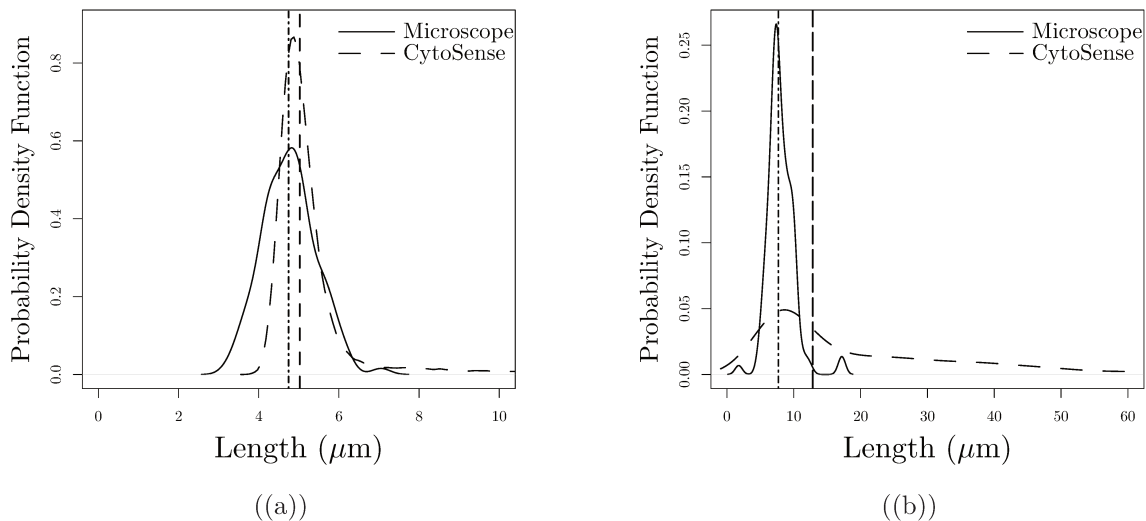


FIGURE 5.11 – Length of THAL from the optical microscope (solid lines) and from the Cytosense (long dashed lines) for a) the 4th and b) the 13th day of the experiment. The vertical dashed lines represent the medians values.

of L observed from optical microscopy ($L_{\text{Mic}} (\mu\text{m})$) is compared with the PDF derived from the Cytosense ($L_{\text{Cyt}} (\mu\text{m})$). Results are presented, on Fig. 5.11, for the 4th and the 13th day of the experiment. The mean EPS was of 0.9 (day 4) and 0.6 (day 13). For the

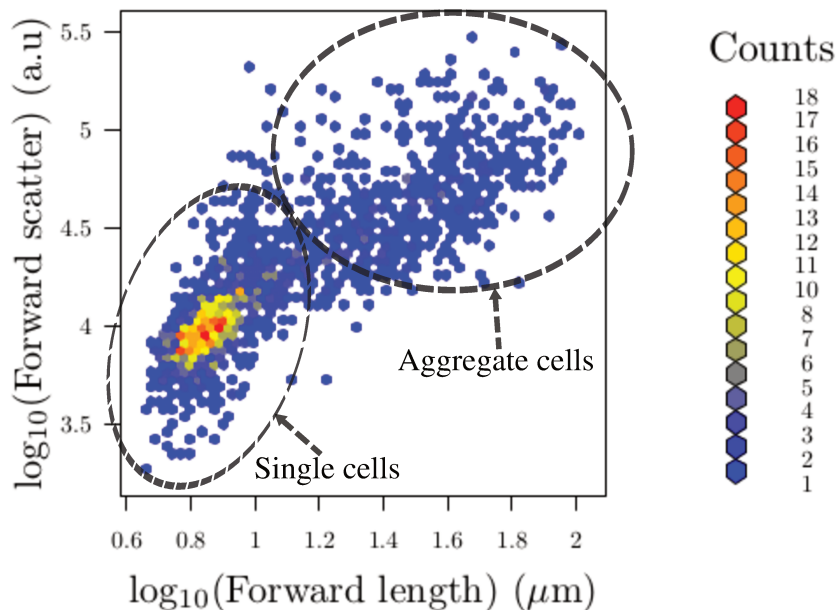


FIGURE 5.12 – Cytogram of the total forward (a.u) as a function of the forward length (μm) as estimated from the Cytoclus software. The two dashed black ellipses encompass approximatively the aggregate and single cells. Color bar represent the cells density.

4th day, the median values of the PDFs obtained were very close : $\tilde{L}_{Mic} = 4.75 \mu\text{m}$ and $\tilde{L}_{Cyt} = 5 \mu\text{m}$. Concerning the 13th, differences between \tilde{L}_{Mic} and \tilde{L}_{Cyt} were large ($\tilde{L}_{Mic} = 7.7 \mu\text{m}$ and $\tilde{L}_{Cyt} = 12.8 \mu\text{m}$) but the PDF modes were closer ($L_{Mic}^{\text{mod}} = 7.4 \mu\text{m}$ and $L_{Cyt}^{\text{mod}} = 8.7 \mu\text{m}$). First, the differences may be caused by an under-sampling during the optical microscopy analysis. Indeed, the \tilde{L}_{Mic} was calculated from 107 observations, while the \tilde{L}_{Cyt} was calculated from 997 observations. Second, flow cytometry images showed that THAL cells formed aggregates at the end of the experiment. Figure 5.12 displays the density plot of the forward scatter vs. the forward length for THAL on the 13th day. We observe a high concentration of points (63%) for length between 4 and 13 μm . These points correspond to the single cells and highlight the PDF mode. As the microscope only measures the size of single cells, it explains why the PDF mode of the microscope and the cytometer measurements are close. The aggregated cells, having a higher length and being less concentrate, impact especially the median value. If we considered only the single cells, the PSDs estimated from optical microscopy and from cytometry become very close : $\tilde{L}_{Mic} = 7.7 \mu\text{m}$ and $\tilde{L}_{Cyt} = 8.2 \mu\text{m}$. We note that, on the 13th day, the aggregated cells repre-

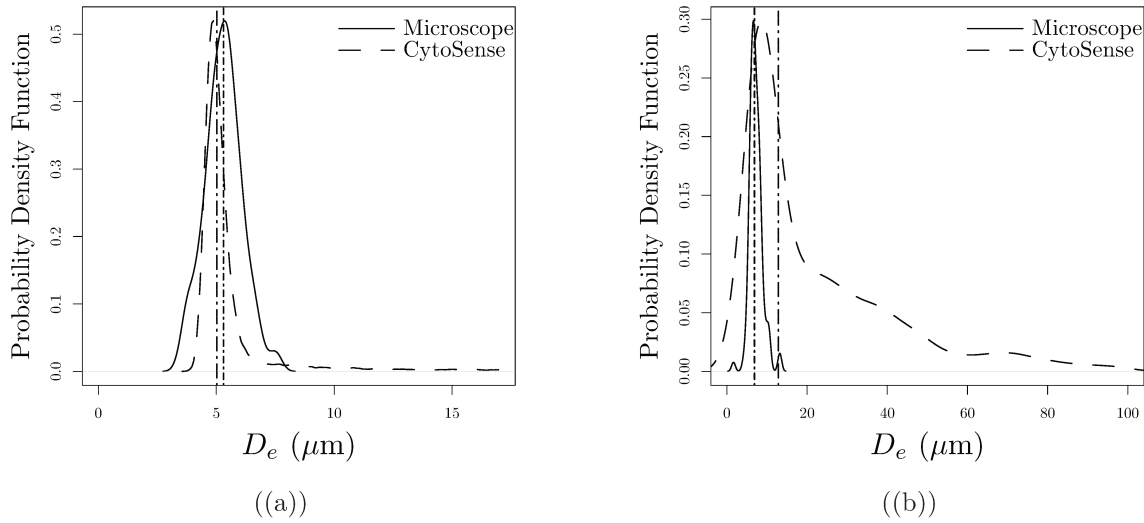


FIGURE 5.13 – Equivalent diameter of THAL from the optical microscope (solid lines) and longer axis from the Cytosense (long dashed lines) for a) the 4th and b) the 13th day of the experiment. The vertical dashed lines represent the medians values.

sented about 37% of the total number of cells, while they represented 5% on the 4th day. Similarly, Engel (2000) observed in the western Baltic Sea an enhance of the apparent coagulation efficiencies, and so aggregation, at the decline of a diatom bloom. This improvement was associated with an increase of the transparent exopolymer particles (TEP). TEP are sticky and their abundance may enhance the probability of particle collisions. Thus, they could control coagulation efficiencies and cause the formation of aggregates at the end of the bloom (Engel, 2000, 2004). An other sources of inaccuracies on D_e is due to the eccentricity. For particles with a high eccentricity, D_e is significantly different from the longer axis. It results that considering $D_e = \tilde{L}_{Cyt}$ introduce inaccuracies on the scattering efficiencies (Eq. (5.9)). Figure 5.13 compares for the 4th and 13th day of the experiment, L_{Cyt} with D_e calculated from optical microscopy observation :

$$D_e = \sqrt{\frac{l_{Mic}^2}{2} + (l_{Mic} \times L_{Mic})}, \quad (5.15)$$

with l_{Mic} the smaller axis of the particle. Figure 5.13(a) highlights that, for an EPS of 0.9, L_{Cyt} and D_e are very close with \tilde{L}_{Cyt} and \tilde{D}_e of 5 μm and 5.3 μm , respectively. As

expected, the differences between L_{Cyt} and D_e increase for a higher eccentricity. For an EPS of 0.6 : \tilde{D}_e is of $6.9 \mu\text{m}$ and \tilde{L}_{Cyt} is of $12.8 \mu\text{m}$ (Fig. 5.13(b)). The modes of the PDF are also different : $L_{Cyt}^{\text{mod}} = 8.7 \mu\text{m}$ and $D_e^{\text{mod}} = 6.6 \mu\text{m}$. We note that, for the 4th (EPS = 0.9) and the 13th (EPS = 0.6) days, use \tilde{L}_{Cyt} instead of D_e induce an absolute error of around 20 % on Q_{bb} .

5.4 Discussion and conclusion

The methodology of Duforêt-Gaurier et al. (2015) was applied for the first time on phytoplankton cultures (*Thalassiosira pseudonana* et *Chlamydomonas concordia*). For the first time, cytometric measurements of the scattering of phytoplankton cells permitted to estimate their scattering cross sections and efficiencies.

Most of the Cytosense estimates of the forward and sideward cross sections for the cultures are in agreement with values predicted by the theory. For CHLAM, only the lowest values of σ_{FSC} and σ_{SSC} are not consistent with the simulations but they represent only 9% and 16 % of the total forward and sideward measurements, respectively. Discrepancies may be due to the method itself. As pointed out by Duforêt-Gaurier et al. (2015), a source of errors may result in inaccuracies in the modeling of the Cytosense weighting functions during the calibration process. The authors noticed a slight underestimation of the Cytosense estimates when they compared their Cytosense estimates with ECO-BB9 measurements on bead suspensions. Discrepancies may be due to the codes used in this comparison exercise. The codes simulate the scattering and absorbing processes of an incident plane wave radiation, whereas the Cytosense laser beam is a Gaussian wave. Duforêt-Gaurier et al. (2015) (as previously Ackleson and Spinrad (1988)) have already discussed this issue. They noticed that the Mie predictions were in agreement with their NIST traceable measurements. Moreover, they observed that differences between predicted and observed cross sections did not increase with particle size. Duforêt-Gaurier et al. (2015) concluded that for particle size less than $80 \mu\text{m}$, errors due to the plane wave assumption were probably small because the horizontal dimension of the laser beam (300

μm) was large relative to the size of the particles. To analyze more fully this issue, we could use the algorithm of Mackowski and Mishchenko (2011). This code simulates absorption and scattering of an incident Gaussian wave by an homogeneous sphere and/or a sphere cluster. However, the code inputs are not trial because the incident Gaussian wave have to be perfectly characterized. As the CytoSense laser undergoes a beam shaping, its optical characteristics (as the beam width and the focal point) are modified through the optical system. For this reason, it is extremely complex and so challenging to accurately define the optical characteristics of the laser beam. Moreover, to our knowledge, no free access operational code exists to simulate the scattering of an incident Gaussian wave by an heterogeneous particle. Thus, if we want to take into account the Gaussian laser beam, we are limited to homogeneous spheres or homogeneous sphere clusters.

The $\langle \tilde{\sigma}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle$ and $\langle \tilde{Q}_{b_b}^{\text{expo}} \rangle$ values of THAL, fall within the range of *in situ* measurements realized by Vaillancourt et al. (2004) but were smaller than *in situ* measurements of Whitmire et al. (2010). As σ_{b_b} is derived from σ_{SSC} , calibration inaccuracies on σ_{SSC} directly impact σ_{b_b} and constitute a first source of errors. Moreover, the scattering of data around the mean relationship (Eq. (5.11)) introduces inaccuracies on σ_{b_b} estimates. In future studies, a specific relationship by phytoplankton functional types could be used to reduce the variability around the mean relationship. In a first time, the idea is to develop, for example, three relationships : one for the calcifiers, one for the silicifiers and one for the other types. Calcifiers and silicifiers presents well-defined structural characteristics with their respective calcite and silica wall, which can be well-identified to be modeled by the radiative transfer codes (Bricaud et al., 1992, Kitchen and Zaneveld, 1992, Zaneveld and Kitchen, 1995, Gordon and Du, 2001, Gordon, 2006). Discrepancies on σ_{b_b} with referenced values may also come from the difference of the type of measure : bulk measurements for backscattering sensors against and single cells measurements for the Cytosense. Duforêt-Gaurier et al. (2015) showed relative differences between 20% and 25% between simulations of monodispersed and polydispersed beads. Estimates of the scattering efficiencies $\langle \tilde{Q}_{b_b} \rangle$ depend on the size accuracy as $\langle \tilde{Q}_{b_b} \rangle$ is defined as the ratio of σ_{b_b} to the geometrical cross section (Eq. (5.9)). Discrepancies were observed

for calibration beads between the length derived from the Cytosense and the length as indicated by the manufacturer, more particularly for bead diameters less than $< 10 \mu\text{m}$ (Thyssen et al., 2015). Different studies are carried out by many research teams to improve the length estimates. Recently, Dugenne et al. (2014), who worked on larger cells, showed a correlation between the sideward signal and the cell biovolume thanks to the images collected with the "image in flow" device and taking into account the pulse shape of SSC per cell. Unfortunately, in the framework of this study, THAL and CHLAM cells were too small to apply the improvements proposed by Dugenne et al. (2014). The method of Duforêt-Gaurier et al. (2015) seems promising and in combination with adapted radiative transfer computations, will strongly enhance the impact of phytoplankton cells on the sideward and backscattering signal.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the support from the French Space Agency (CNES) through the TROPHY project (CNES/TOSCA program) and the PHYTOCOT project (CNES/TOSCA program). William Moutier is supported by the French Ministry of Higher Education through a PhD grant. The authors thank Dr. Annick Bricaud (Laboratoire d'Océanologie de Villefranche, France), Dr. Natacha Guiselin and Anne-Hélène Rêve (Laboratoire d'Océanologie et de Géoscience, France) for their precious advice. Thanks to Laurent Brutier (LOG/ULCO), Arnaud Cauvin and Michel Laréal for their technical help.

Evolution of the scattering properties of phytoplankton cells from cytometry measurements

Ce chapitre a été soumis pour publication dans la revue : "PLOS ONE"

Comme cela a été expliqué dans la section 2, les mesures "bulk" (e.g. $b(\lambda)$, $b_b(\lambda)$) sont affectées par chaque constituant (e.g. bactéries hétérotrophes, phytoplanctons, détritiques, cellules en dégénérescence, etc) présent dans le milieu étudié. De ce fait, ces mesures "bulk" sont moins sensibles aux variations optiques pouvant se produire au sein d'un compartiment spécifique (Ackleson and Robins, 1990). C'est pourquoi, à partir de mesures de type ECO-BB9, il est difficile d'analyser les variations du signal optique des cellules de phytoplancton causées par une variation morphologique ou intra-cellulaire. Pourtant ce type de variations se produit au cours des différentes phases de croissance de la population algale. Que ce soit lors de mesures *in-situ* ou lors d'analyses en laboratoire (e.g. expérience de microcosme), la diffusion des cellules phytoplanctoniques n'est que faiblement étudiée durant un cycle de vie complet. En effet, afin d'analyser spécifiquement le compartiment phytoplanctonique et de minimiser l'impact de particules non algales (e.g. détritiques, bactéries hétérotrophes) sur les mesures "bulk", les études se sont principalement limitées à la phase exponentielle (Whitmire et al., 2010). Ce chapitre a pour objectif de combler ce manque en analysant, à partir de mesures Cytosense, l'efficacité de diffusion forward (Q_{FSC}) et sideward (Q_{SSC}) de deux espèces phytoplanctoniques (*Thalassiosira pseudonana* et *Chlamydomonas concordia*) au cours de différentes phases de croissance. Pour ce faire,

la méthode de Duforêt-Gaurier et al. (2015) (chapitre III et annexe) a été utilisée durant les 20 jours d'expérience de microcosme. Afin d'expliquer les variations intra- et inter-espèces, les mesures cytométriques ont été combinées avec des simulations théoriques et des mesures optiques (coefficient d'absorption particulaire et détritique), biogéochimiques (concentration Chl-*a*) et des observations MEB. Les observations MEB ont notamment servi à observer la morphologie des cellules, les agrégats, et à mesurer l'épaisseur de la paroi à différents stades de croissance.

Sur l'ensemble de l'expérience, les efficacités de diffusion forward (Q_{FSC}) et sideward (Q_{SSC}) de *Thalassiosira pseudonana* étaient, en moyenne, respectivement 2,2 et 1,6 fois plus importantes que les efficacités de *Chlamydomonas concordia*. Nous avons également observé des variations intra-espèces des efficacités forward et sideward qui diffèrent significativement en fonction du stade de croissance de l'espèce considérée.

Les résultats ont montré que la plus basse efficacité de diffusion forward et sideward de CHLAM était due à une absorption plus forte (liée à un contenu en Chl-*a* par cellule vivante plus important), à la présence d'agrégats (constituant près de 50% des cellules de CHLAM tout au long de l'expérience), et à un indice de réfraction plus faible. L'indice de réfraction plus faible peut être dû à une densité pigmentaire moins élevée, générant une réfringence moins importante. En effet, CHLAM est moins vacuolée que THAL, ce qui a pour effet d'avoir un chloroplaste proportionnellement plus volumineux et moins dense en pigments.

Pour THAL et CHLAM, les variations intra spécifiques de Q_{FSC} étaient négativement corrélées au diamètre des cellules. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où la diffusion aux petits angles est influencée par la diffraction. Notons que l'impact de la taille peut être contre-balançé par l'efficacité d'absorption des cellules et/ou par une agrégation des cellules. Les simulations théoriques ont montré que les variations de Q_{SSC} semblent principalement dues à une variation de l'indice de réfraction réel de la couche de chloroplaste. Q_{SSC} peut aussi être impacté par une variation de l'efficacité d'absorption, du diamètre ou bien par une agrégation de cellules. Comme l'indice de réfraction réel du chloroplaste est le paramètre clé, un modèle à deux couches (cytoplasme-chloroplaste)

semble particulièrement approprié pour représenter les cellules de phytoplancton. Notez que, Bernard et al. (2009) ont obtenu les mêmes conclusions en désignant le modèle 80-20 comme le modèle le plus approprié pour reproduire des mesures *in situ* de réflectance au cours d'un bloom de phytoplancton.

Evolution of the scattering properties of phytoplankton cells from cytometry measurements

W. Moutier, L. Duforêt-Gaurier, M. Thyssen, H. Loisel, X. Mériaux, L. Courcot, D. Dessailly, A-H. Rêve, G. Grégori, A. Barani, M. Dugenne and L. Brutier

6.1 abstract

The scattering efficiency of phytoplankton cells are poorly analyzed during a complete life cycle due to the impact of detritus on bulk measurement after the exponential growth phase. Thus the analysis of the evolution of the optical properties thanks to their morphological and/or intra-cellular variations remains poorly studied. From the Cytosense flow cytometer (CytoBuoy b.v., NL), the temporal course of the forward and sideward efficiencies of two phytoplankton species (*Thalassiosira pseudonana* and *Chlamydomonas concordia*) were analyzed during a complete life-cycle. These two species considerably differ from a morphological point of view. Over the whole experiment, the forward and sideward efficiencies of *Thalassiosira pseudonana* were, in average, respectively 2.2 and 1.6 times higher than the efficiencies of *Chlamydomonas concordia*. Great intra-species variability of the efficiencies were observed according to the population growth stage of the considered species. It highlights the importance to consider the optical properties of phytoplankton cells as a function of the population growth stage of the considered species. Furthermore, flow cytometry measurements were combined with radiative transfer simulations and biogeochemical and optical measurements. Results showed that real refractive index of the chloroplast appeared as a key parameter driving the sideward signal and that a simplistic two-layered model (cytoplasm-chloroplast) seems particularly appropriate to represent the phytoplankton cells.

6.2 Introduction

The scattering and absorption characteristics of ocean water and all its constituents are described by the Inherent Optical Properties (IOPs) (Preisendorfer, 1976). Last decades, many studies have shown that the morphology and/or the internal structure of phytoplankton cells impact light absorption (e.g. Geider and Osborne (1987), Stephens (1995), Osborne and Geider (1989)) and scattering (e.g. Dubelaar et al. (1987), Witkowski et al. (1998), Volten et al. (1998), Duforêt-Gaurier et al. (2015), Quinby-Hunt and Hunt (1989)). For example, phytoplankton heterogeneity and inner complexity (gas vacuoles, chloroplast, silica wall, etc) explain why the backscattering signal is higher than predicted by the Mie theory, which considers a particle (i.e., a phytoplankton cell) as an homogeneous sphere (e.g. Bricaud et al. (1992), Kitchen and Zaneveld (1992), Meyer and Brunsting (1975), Meyer (1979), Whitmire et al. (2010), Quirantes and Bernard (2004), Zaneveld and Kitchen (1995), Matthews and Bernard (2013), Bernard et al. (2009), Witkowski et al. (1998), Vaillancourt et al. (2004), Dall’Olmo et al. (2009), Duforêt-Gaurier et al. (2015), Matthews and Bernard (2013), Quinby-Hunt and Hunt (1989), Quirantes and Bernard (2006), Svensen et al. (2007)). For instance, Dall’Olmo et al. (2009) showed that Mie simulations can match experimental measurements of backscattering if the real refractive index of particles used in simulations is around 1.09 which is higher than the average real refractive index expected for phytoplankton cell (Carder et al., 1972). Cell growth and growth conditions (light, temperature, and nutrients concentrations) change the morphology and internal structure of the cells (Stephens, 1995, Osborne and Raven, 1986, Rosen and Lowe, 1984, Blasco et al., 1982, Haupt.W and Sheuerlein.R, 1990). Rosen and Lowe (1984) observed a larger relative volume of the chloroplast (V_{chl}) for cells under a lower light illumination or in nutrient stress. Moreover, a variation of V_{chl} was observed according to the population growth stage. Thus, it evidences that the IOPs of phytoplankton vary according to the species and for a given species evolve during the population growth cycle (Kiefer et al., 1979, Bernard et al., 2009). Indeed, Bernard et al. (2009)

highlighted that the real refractive index for the chloroplast and V_{chl} are key parameters driving the backward efficiency.

Last two decade, Hobilabs Hydroscat, WET Labs ECO-BB or ECO-VSF instruments were developed to perform routine *in situ* measurements of scattering at one or three scattering angles and then to assess the bulk backscattering coefficient. As bulk measurements are impacted by the various water constituents (e.g., phytoplankton, viruses and heterotrophic bacteria, detritus, sediments and air bubbles), they are therefore less sensitive to the optical variability occurring within a specific sub-population (Ackleson and Robins, 1990). In this context, flow cytometry appears as a valuable tool to analyze the individual scattering of particles, and move beyond the bulk information. The Cytosense flow cytometer measures the sideward (SSC; 2°-15°) and the forward (FSC; 45°-135°) scattering, as well as several fluorescence intensities of each single particle which passes through the focused 488 nm laser beam. Duforêt-Gaurier et al. (2015) developed a new methodology to derive the forward, sideward and backward cross sections of single particles from the measurements made by this flow cytometer (Cytosense; CytoBuoy b.v., NL). A first validation of the method has been performed on bead suspensions (Duforêt-Gaurier et al., 2015), and then on phytoplankton cultures by Moutier et al. (2016).

After this technical step of validation, we propose here to use, for the first time, the Cytosense to study the inter- and intra-species variations of phytoplankton cultures. Thus, the objectives of the present study is to identify which morphological or intra-cellular parameters induce inter- or intra-species variations of the scattering properties. For this purpose, the method of Duforêt-Gaurier et al. (2015) is applied along a microcosm experiment conducted on two different taxa (a flagellate green algae and a diatom) during a complete population growth cycle. These two species are very distinct from a morphological point of view. The diatom *Thalassiosira pseudonana* stands for particles with a silica wall and single cells are in most cases cylindrical. The green algae *Chlamydomonas concordia* is a small ovoid and may potentially form aggregates during the experience. Moreover, the cell size, the shape, the thickness of the silica wall, the chlorophyll-*a* by cell or the aggregate configurations, change during the population growth cycle. The originality of this study

lies in combining cytometric measurements with biogeochemical measurements, Scanning Electron Microscopy (SEM) and radiative transfer simulations. Radiative transfer simulations are used to examine the impact of heterogeneity and aggregation to try to explain the variations observed on the different scattering parameters considered here. In this regards, the combination of in situ measurements and theoretical simulations has proven invaluable for assessing the cellular characteristics which impact the optical signal, as evidenced in previous studies (e.g. Bernard et al. (2009), Quirantes and Bernard (2006)).

6.3 Material and method

6.3.1 Phytoplankton cultures

Cultures of *Thalassiosira pseudonana* (THAL) and *Chlamydomonas concordia* (CHLAM) were obtained from the Roscoff Culture Collection (RCC, <http://roscoff-culturecollection.org>). THAL and CHLAM were maintained in monospecific conditions in a f/2 medium at 17°C, under a photon flux density of about 100 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ with a 12 :12h light :dark cycle. They were grown in batch mode during 15 days to obtain 4.5 L of culture. One day before the beginning of the microcosm experiment, the 4.5 L of culture were added to 60 L of fresh f/2 medium. A volume of 60 L is required to realize the daily sampling for biogeochemical analysis, and required to maintain a sufficient depth (≥ 25 cm) for the optical measurements. THAL and CHLAM batches were duplicated; and named B1 and B2 THAL batches and B4 and B5 CHLAM batches. During the experiment, the cultures were maintained under a surface illumination of 200 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The 12 :12h light :dark cycle and the temperature of 17°C were maintained. A continuous agitation was applied to homogenize the culture and to avoid chain formation. The salinity of the four batches was between 29.1-29.7. The microcosm experiment was conducted during 20 days cover all the culture phases.

6.3.2 Flow cytometry

In this study, we used the Cytosense acquired in 2010 by the PRECYM flow cytometry platform of the Mediterranean Institute of Oceanography (MIO; <http://precym.mio.univ-amu.fr>). The Cytosense is a benchtop pulse-shape flow cytometer designed for the observation of phytoplankton cells. It counts and analyses particles with diameters between 1 and 800 μm . The sample intake speed is of 3 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. The particle suspension is injected into a free carrying sheath fluid, that narrows down the suspension into a thin line of fluid. The particles are aligned and separated along the path of the fluid in the flow cell (hydrodynamic focusing), which is perpendicular to the direction of the laser beam. Considering the design of the Cytosense and the analysis conditions, we assume that for non-spherical particles, the particle longer axis is vertically oriented perpendicularly to the laser beam. The velocity of the particle suspension is governed by the sheath flow rate, factory set at about 2.2 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Particles flow one by one, through a 488 nm focused laser beam. The Cytosense measures the signal scattered by the particles in the forward and sideward direction. The fluorescence emitted by the photosynthetic pigments in algal cells is detected at three different spectral bandwidths. The resulting signatures are displayed as red (chlorophyll-*a* related), orange (phycoerythrin related) and yellow fluorescence intensities respectively, which assist in determining the pigment type and content of each particle. The Cytosense instrument uses PIN photodiodes to detect the forward scatter (FSC) and photomultiplier tubes to detect the right angle side scatter and fluorescence signals. The collection solid angle of the forward scatter detectors starts at ca. 2° , going up to ca. 15° . The sideward scattered light, together with the fluorescence emission, is collected at 90° relative to the laser beam (with a solid angle between 45° and 135°). Digital data acquisition is initiated when the particle enters into the laser beam and is terminated when the particle is no longer detected. The data recording is done at a frequency of 4MHz. Data recording was triggered by the SSC signal (15 mV). This trigger permitted to remove a part of the instrumental electronical noise and the signals from the smallest particles (such as debris, heterotrophic bacteria).

The proprietary CytoUSB software (CytoBuoy b.v., NL) was used to drive the instrument and collect the data. The proprietary Cytoclus software (CytoBuoy b.v., NL) was used to manually analyze the data collected by the Cytosense (Dubelaar and Jonker, 2000). It enables the display and clustering of data points representing particles (cells) having similar optical properties, constituted by their forward and sideward scattering, and their fluorescence intensities. The clustering may use up to ten simple mathematical signal descriptors for each available detector signal (for example, length, height, centre of gravity, asymmetry, number of humps...). The various clusters are defined manually by drawing regions in correlated bivariate scatter plots. This combines objective factors from the cytograms and subjective considerations linked to the expertise of the observer. Moreover, an image-in-flow device, mounted in the Cytosense, takes pictures of the cells within a predefined region of interest.

6.3.3 Ancillary measurements

Every day, between one and two samples per batch were collected and filtered through GF/F filters pre-combusted at 450°C (Whatman, diameter 25 mm, nominal pore size 0.7 microns). The samples were dedicated to quantify, every day, the particulate absorption coefficient and the non-algal particles absorption coefficient (a_p and a_{nap} , respectively) and, every two days, the concentrations of chlorophyll-*a* (Chl-*a*). After liquid nitrogen deep freezing, samples dedicated to Chl-*a* a_p and a_{nap} were stored at -80°C until analysis. The a_p and a_{nap} coefficients were quantified by spectrophotometry following the Tassan and Ferrari (1995, 2002) protocols. Chl-*a* was measured by fluorimetry (Lorenzen, 1966). In the laboratory, chlorophyll-*a* was subsequently extracted by grinding the filters in 4 ml of 90% acetone. Then, 4ml of 90% acetone were added and samples were stored in the dark at 4°C overnight. This was followed by centrifugation (for 15 minutes at 3,000 revolutions per min), and Chl-*a* was quantified in the supernatant by a Turner Designs fluorimeter. The fluorescence values were converted into Chl-*a* concentration using a standard Chl-*a* solution (*Anacystis nidulans*, Sigma).

A measure of a_p was made from 400 to 750 nm at a 1 nm bandwidth on a Shimadzu UV 2450 spectrophotometer equipped with an integrating sphere. Then, on the same filter, after a pigment extraction using NaClO 1% active chloride, another measurement was realized to obtain a_{nap} . The pathlength amplification was corrected following the Tassan and Ferrari (2002) instructions. Phytoplankton absorption (a_{phy}) was then obtained by subtracting of a_{nap} from a_p .

6.3.4 Scanning Electron Microscope (SEM)

For both species, four samples were dedicated to SEM analysis at days 5, 11, 13 and 15 for THAL and days 5, 11 and 15 for CHLAM (to encompass different population growth stage). Samples were pre-treated immediately after collection by fixing them in lugol/glutaraldehyde 2.5% solution. For CHLAM, approximately 4 mL of culture were filtered through polycarbonate membrane (Millipore, 0.4 μm) covered with polylysine solution. The filter obtained was then immediately put in a bath of 70% alcohol. Then the sample was dehydrated through graded alcohol series up to 100% ethanol (Merck PA); subsequently, the filter was immersed in HMDS (Hexamethyl disilazane, Molekula) for 1/2 hour (twice). After, removing the excess of HMDS, sample was evaporated overnight under a fume hood. For THAL, approximately 1 mL of culture was filtered through polycarbonate membrane (Millipore, 0.4 μm). Subsequently, the filter was immersed in HCL 37% (Merck, PA) at room temperature during 24h. Then the acid solution was filtered and rinsed with MilliQ-water. Filters were then dried for 24 hours under a laminar flow hood.

Finally, all samples were mounted on aluminum stubs (Agar Scientific) with double sticky carbon tabs (Agar Scientific) and sputter coated under Argon flow with Au/Pd Polaron SC 7620 during 90s. Afterward the specimens were examined with a Scanning Electron Microscope (SEM LEO 438VP, accelerating voltage of 15 keV with a beam current of 10 pA)

6.3.5 Methodology

The methodology developed by Duforêt-Gaurier et al. (2015) was used to derive, from the Cytosense, the forward (σ_{FSC}), sideward (σ_{SSC}) and backward (σ_{bb}) cross sections (μm^2). First, the weighting functions for the forward and sideward detectors, were calculated to convert numerical counts into cross sections (μm^2). Noted that, very recently the weighting functions has been slightly modified for a better consideration of the optical system (Duforêt-Gaurier *et al.*, 2016, personal communication). Then, for each particle, the σ_{SSC} was converted into σ_{bb} using the theoretical relationship from Duforêt-Gaurier et al. (2015) and slightly modified by Moutier et al. (2016) :

$$\sigma_{\text{bb}}(488) = 10^{-0.6} \times \sigma_{\text{SSC}}(488)^{1.09} \quad (R^2 = 0.9) \quad (6.1)$$

The latter was established from the theoretical database including 590,000 simulations from the ScattnLay code (Yang, 2003, Peña and Pal, 2009). This database includes homogeneous, two and three layered spheres to represent the optical properties of a large diversity of phytoplankton cells (see details in Duforêt-Gaurier et al. (2015) and Moutier et al. (2016)).

6.3.6 Algorithm

In this study, two radiative transfer codes (the ScattnLay; Yang (2003), Peña and Pal (2009)) and the Generalized Multiparticle Mie-solution (GMM; Xu and Gustafson (2001)) code were used for computing the volume scattering function (VSF) of homogeneous spheres, layered spheres and aggregates. Theses codes are available in free access. The forward and sideward signals were obtained by integrating the VSF over 2° - 15° and 45° - 135° , respectively. Radiative transfer computations were carried out considering the wavelength of the incident radiation equal to 488 nm and the refractive index of water equal to 1.334 (Morel and Bricaud, 1986).

First, the ScattnLay code was used to simulate the optical properties of two and three layered sphere models. The two layered sphere models are composed of an inner layer, the cytoplasm (cyt) and, an outer layer, the chloroplast (chl). For the three layered sphere models, the silica wall (Si) was considered. An exhaustive review of the internal structure of phytoplankton cells was performed by Bernard et al. (2009). We used this review to define the relevant refractive indices and the relative proportions of the different layers. The relative volumes of the silica wall (V_{Si}) were measured from SEM micrographs (see section 6.4.3). To analyze the influence of the evolution of the silica wall thickness, we chose the 4th and the 13th days of the experiment. The relative proportions are : 70%_{cyt}-30%_{chl}, 80%_{cyt}-20%_{chl}, 80%_{cyt}-18.625%_{chl}-1.375%_{Si} and 80%_{cyt}-18.18%_{chl}-1.82%_{Si}. The description and the code inputs were detailed in Moutier et al. (2016). Briefly, the complex refractive indices of the cytoplasm ($m(\text{cyt})$) and the silica wall ($m(\text{Si})$) were respectively fixed to : $1.02 + i2.0739 \times 10^{-4}$ and $1.07 + i0.0001$. The complex refractive index of the chloroplast was calculated according to the Gladstone and Dale formula (Aas, 1996) :

$$\sum_j m_j \nu_j = m \quad , \quad (6.2)$$

where m_j and ν_j are the complex refractive index and the relative volume of the j -th layer, and m is the complex equivalent refractive index ($m = m_r + im_i$). For each model, simulations were performed for a cell diameter between 1 to 40 μm (0.166 μm increment). It represents about 1,000 study cases.

The Generalized Multiparticle Mie-solution code (GMM; Xu and Gustafson (2001)) was used to simulate the light interaction with aggregates. Computations were performed for 5 different cell clusters (Fig. 6.1). They were composed of 2, 3, 5 and 9 spheres corresponding to the most frequently encountered configurations as observed by SEM. For each sphere composing the clusters, the diameter is of 4 μm and the refractive index is of $m = 1.05 + i0.01$.

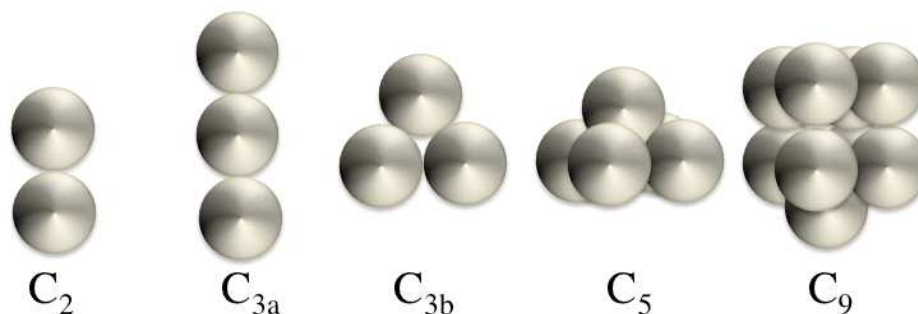


FIGURE 6.1 – Geometry of the simulated aggregates. C stands for clusters, the number indicates the number of spheres and the letter in small cap stands for the various configurations.

6.4 Results

6.4.1 Flow cytometry analyses

Every morning, the Cytosense carried out single particle (cell) analyses for the four batches, during 20 days. From each Cytosense analysis, living phytoplankton cells were identified (see section 6.3.2). A distinction was also made between clusters corresponding to living cells of THAL and clusters corresponding to living cells of CHLAM to detect any possible contamination during the whole experiment. The forward (FSC) and sideward scatter signals (SSC) were converted into forward (σ_{FSC}) and sideward (σ_{SSC}) scattering cross sections according to the Duforêt-Gaurier *et al.*, 2015’s methodology (see section 6.3.5). In addition, the Cytosense provided an estimation of the particle longer axis thanks to the pulse shapes recorded by the instrument. In the following, the longer axis is equal to the diameter (Moutier *et al.*, 2016). For CHLAM and THAL, about one per cent of the data corresponded to particles with a diameter between 40 and 100 μm . These values were quite high as compared with diameters measured from optical or SEM microscopy and also with diameters referenced in the literature for the two species (Whitmire *et al.*, 2010, Vaillancourt *et al.*, 2004, Stramski and Mobley, 1997). Outliers were excluded by a cut-off value applied at the last percentile ($q = 0.99$) to obtain a population representative of each species. Then, for each cluster, we calculated the median value for the σ_{FSC} , σ_{SSC} and cell diameter named $\tilde{\sigma}_{\text{FSC}}$, $\tilde{\sigma}_{\text{SSC}}$ and \tilde{D} , respectively. The median value was preferred to the

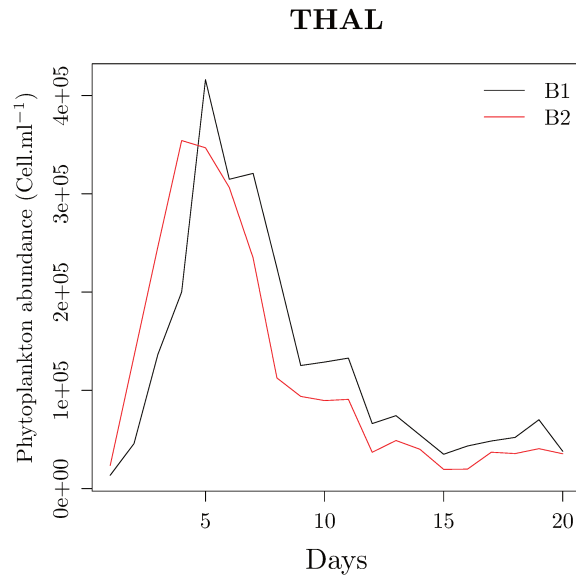


FIGURE 6.2 – Abundance of phytoplanktonic cells over time of experiment for B1 (black line) and B2 (red line).

mean value as the probability density functions (PDF) of cross sections did not follow a Gaussian distribution. The median values are close to the PDF maximum, whereas mean values are much higher. For each measurement, forward, sideward and backward efficiency factor \tilde{Q} has been calculated as following (Morel and Bricaud, 1986) :

$$\tilde{Q}_{\text{FSC/SSC/b}_b} = \frac{4\tilde{\sigma}_{\text{FSC/SSC/b}_b}}{\pi\tilde{D}^2}. \quad (6.3)$$

6.4.2 Abundance

The Figures 6.2 and 6.3 show the abundance of living phytoplankton cells for THAL and CHLAM, respectively. For THAL (B1 and B2), the exponential phase is characterized by an increase of living-phytoplankton cells from day 1 to 5. The end of the exponential phase is probably caused by a nutrient limitation. The senescence phase (day 6 to day 12) begins with the decrease of living-phytoplankton cells. Then, the abundance of phytoplankton cells remains relatively constant from day 13 to day 20. For CHLAM (B3 and B4), the exponential phase is from the day 1 to 9. As THAL, the end of the exponential phase is probably due to a nutrient limitation. During the stationary phase (from day 10 to 15), the phytoplankton abundance remains rather constant. Contrary to THAL,

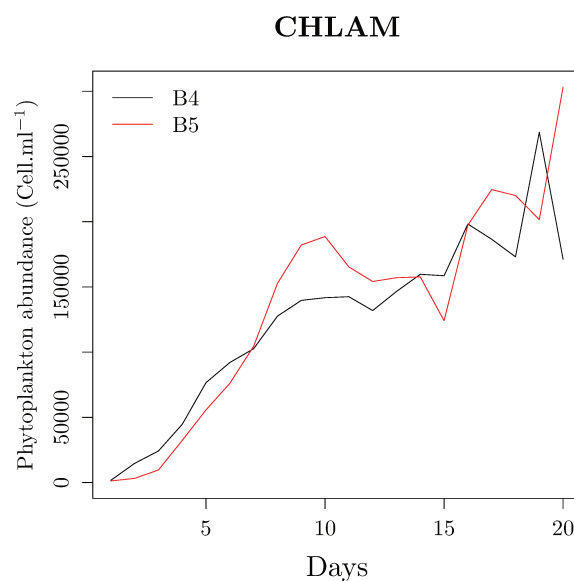


FIGURE 6.3 – Abundance of phytoplanktonic cells over time of experiment for B4 (black line) and B5 (red line).

there is no senescent phase. Indeed, from the day 16 to 20, the phytoplankton abundance increases. The increases in phytoplankton cells can be due to a dislocation of some aggregates or the nutrient remineralization due to the action of bacterial activity. Through bacterial lysis, organic matter and nutrients are released in the medium available for heterotrophic prokaryotes and phytoplankton growth (Azam et al., 1983, Bratbak et al., 1994, Wilhelm and Suttle, 1999, Fuhrman, 1999).

6.4.3 Morphology of the phytoplankton species

THAL is a marine centric diatom and stands for particles with a silica wall. Images obtained from Scanning Electron Microscope (SEM), for days 5, 11, 13 and 17, showed that the shape of single cells was cylindrical with a mean surface-equivalent diameter (D_e) between 5 and 7 μm . Noted that from day 9 to the end of the experiment, aggregates were observed by SEM images and Cytosense analyses. These aggregates appeared as chains and were identified from cytogram analysis. Indeed, each single cell forming aggregate is displayed as a "hump" the pulse shape profile of the entire particle (aggregate) recorded by the Cytosense. On the basis of the cytograms and particle optical profiles, a particle length of 13 μm is considered as the size limit between single and aggregate cells. From

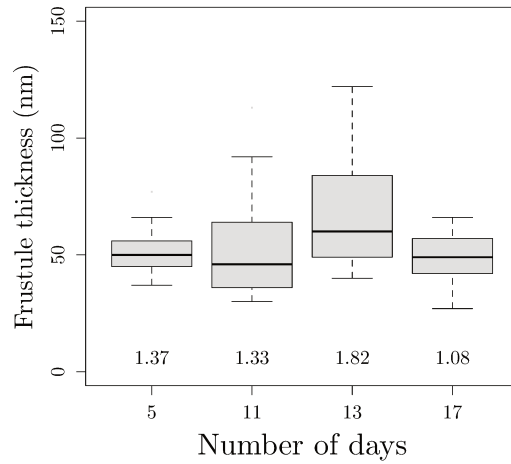


FIGURE 6.4 – Boxplot of the frustule thickness for the 5th, 11th, 13th and 17th day of the experiment. The numbers under the boxplot represents the average proportion (%) of the frustule with respect to the cell diameter.

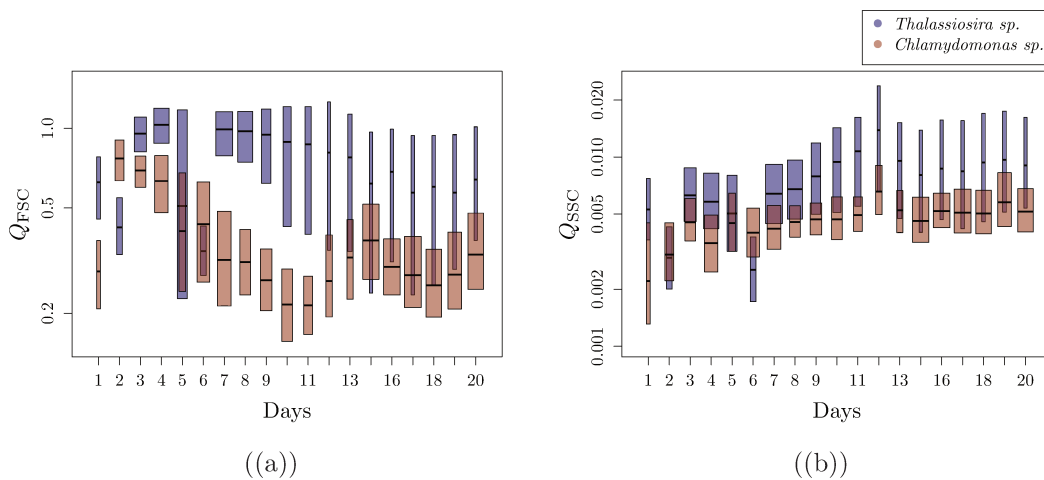


FIGURE 6.5 – Temporal course of the (a) forward and (b) sideward efficiencies (log-linear scale) of THAL (blue box) and CHLAM (red box). The box width is proportional to the square-roots of the sample size.

day 1 to 9, between 4 and 15% of the cells were identified as aggregates, while between 20% and 40% of the cells were identified as aggregates for the rest of the experiment. Figure 6.4 displays the variations of the frustule thickness as observed for day 5, 11, 13, and 17. CHLAM is a flagellate green algae which, contrary to THAL, does not have a silica wall. SEM images showed that the morphology of the CHLAM cells in culture can appear as a small single ovoid with a flagellum, an aggregate appearing as a group of cells, or a Zygospor. Zygospor are the CHLAM sexual stage cells. They result from the fusion

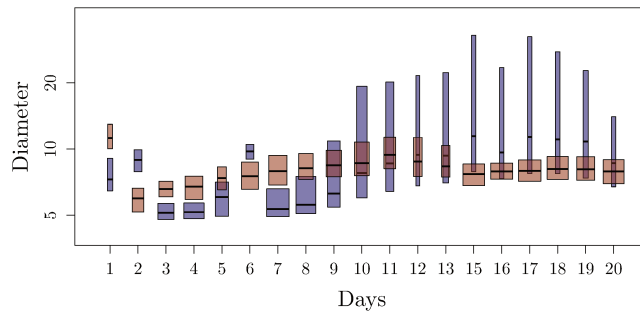


FIGURE 6.6 – Same as Fig. 6.5 but for the diameter.

of two gametes. Their shape is spherical and are composed of a thick outer wall. From SEM micrographs, we observed in average about 23% of aggregates, 20% of Zygospores and 57% of single cells throughout the whole experiment. How cells are arranged to form the aggregate are not evidenced on cytograms. Contrary to THAL where the cells are connected one after the other. Thus, the identification of each single sphere, and so of aggregates, from the recorded particle (aggregate) profiles was not possible. During the experiment, the mean D_e was between 2 and 34 μm

6.4.4 The optical properties of species

The temporal course

As the study is dedicated to the impact of cell heterogeneity on the scattering signal, the efficiency factor is presented instead of the cross section because it is less influenced by the cell size. Indeed, the efficiency factor depends on the cell size relative to the wavelength, the particle shape and the distribution of the complex refractive index inside the particle (Mishchenko, 2000). In contrast, the effect of cell size on the cross section is twofold : directly by the geometrical cross section (Eq. (6.3)) and by the efficiency factor (Stramski and Reynolds, 1993, Bohren and Huffman, 1983). It is worth noticing that the present study was focused on living-phytoplankton cells. The forward (Q_{FSC}) and sideward (Q_{SSC}) efficiencies were calculated, for each cell, according to Eq. (6.3) using the cell diameter as provided by the Cytosense. As for the cross section, the median values

(\tilde{Q}_{FSC} and \tilde{Q}_{SSC}) were calculated for each day of the experiment. The mean values of \tilde{Q}_{FSC} and \tilde{Q}_{SSC} were computed over the time period of the experiment with their associated coefficients of variation (%CV = $100 \times \text{standard deviation}/\text{mean}$). For both THAL and CHLAM, the mean values of \tilde{Q}_{FSC} and \tilde{Q}_{SSC} and their respective temporal courses were rather similar between the duplicates. Consequently, results are only presented for B1 and B4. For THAL, $\langle \tilde{Q}_{\text{FSC}} \rangle$ was equal to 7.3×10^{-1} with CV of 28% and $\langle \tilde{Q}_{\text{SSC}} \rangle$ was of 7.7×10^{-3} (CV = 36%) over the whole experiment time period. For CHLAM, $\langle \tilde{Q}_{\text{FSC}} \rangle$ was around 0.36 (CV = 43%) and $\langle \tilde{Q}_{\text{SSC}} \rangle$ was about 4.5×10^{-3} (CV = 21%). Diameter variations were observed over the course of the experiment. For B1, the diameter \tilde{D} varied between 5.14 and 11.45 μm with $\langle \tilde{D} \rangle = 8.29 \mu\text{m}$ (CV = 26%). Concerning B4, \tilde{D} varied between 5.97 and 11.23 μm with $\langle \tilde{D} \rangle$ of 7.97 μm (CV = 13%) (Fig. 6.6). The discrepancies between the size estimated by the cytometer or observed by SEM microscopy (section 6.4.3) were already discussed in Moutier et al. (2016). Over the whole experiment, the forward and sideward scattering efficiencies were, respectively, about 2.2 and 1.6 times higher for THAL than for CHLAM. The temporal course of \tilde{Q}_{FSC} and \tilde{Q}_{SSC} was different between the two species. For THAL, no specific trend was observed for \tilde{Q}_{FSC} from day 1 to day 7. Then, \tilde{Q}_{FSC} decreased from day 7 to day 15 and remained relatively constant from day 15 to the end of the experiment. For CHLAM, \tilde{Q}_{FSC} decreased from day 2 to day 11 and from day 15 to day 18; it increased from day 11 to day 15 and from day 18 to day 20. The time variations of \tilde{Q}_{SSC} for THAL and CHLAM were quite similar. No trend was observed from days 1 to 6. Then, the values increased from days 6 to 12. A decrease was observed from days 12 to 15 followed by a slight increase until the end of the experiment. For THAL, the variability of the scattering efficiencies increased with time as indicated by the length of the boxplots.

Principal Component Analysis

A Principal Component Analysis (PCA; R software 3.2.2) was used to compare the repartitions of the two species as a function of the forward and sideward efficiencies and Chl-*a* concentration per living cell ($\text{Chl-}a.\text{cell}_{\text{liv}}^{-1}$; $\text{mg}.\text{m}^{-3}$), the phytoplanktonic absorption

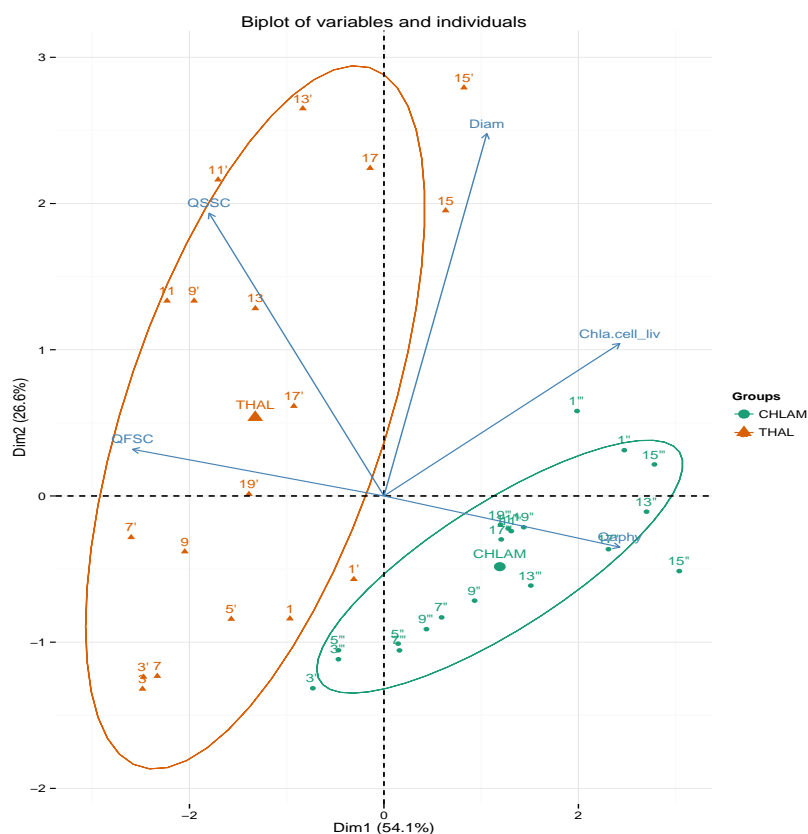


FIGURE 6.7 – Principal component analysis (PCA) performed on the dataset. Projection of the observations (colored points) for all the available dates and the variables (arrows) on the two first principal components (80.7 % of the total variance).

efficiency factor ($Q_{a_{\text{phy}}}$) and the cell diameter (Fig. 6.7). This analysis was carried out to identify which variables influence the scattering of phytoplankton cells. Figure 6.7 displays only data with coincident cytometric, a_{phy} and Chl- a measurements.

The variance of our data is explained at 80.7 % with the first two first principal components (axes). The first principal component explains 54.1% of the variance, whereas the second one explains 26.6% only. The forward efficiency (29.3%) Chl- a .cell $_{\text{liv}}^{-1}$ (25.8%) and $Q_{a_{\text{phy}}}$ (25.81%) contributed positively to axis 1 with a \cos^2 of 0.8, 0.7 and 0.7 respectively. The the diameter (56.9%) and the sideward efficiency (33.4%) contributed positively to axis 2 with a \cos^2 of 0.7 and 0.4 respectively. The second axis opposes the THAL group (orange dots) to the CHLAM group (green upward-pointing triangles). CHLAM was characterized by lower scattering efficiencies and higher Chl- a contents per cell. The Chl- a .cell $_{\text{liv}}^{-1}$ for CHLAM was in average 4.8 times higher than for THAL. The mean Chl- a .cell $_{\text{liv}}^{-1}$ for THAL and CHLAM were, respectively, of 3.5×10^{-9} (CV = 108%) and of

6.8×10^{-9} (CV = 50%). THAL data are more scattered than CHLAM data. It is due to the high variability in $\text{Chl-}a.\text{cell}_{\text{iv}}^{-1}$ but also in \tilde{Q}_{SSC} , \tilde{Q}_{FSC} and \tilde{D} . The variability and the differences between THAL and CHLAM may be explained by morphological and intracellular differences : (i) the higher structural complexity of diatoms (presence of a frustule and vacuole(s)); (ii) the aggregates, and (iii) the size difference. In the following paragraphs, we will examine if these hypothesis are consistent with ancillary measurements and the theoretical computations of radiative transfer codes.

Influence of the $\text{Chl-}a.\text{cell}_{\text{iv}}^{-1}$ and the cell structure on Q_{FSC} and Q_{SSC} .

Our *in vitro* measurements indicate that the $\text{Chl-}a.\text{cell}_{\text{iv}}^{-1}$ is smaller for THAL. The lower Chl-*a* concentration of diatoms is mainly due to their specific cellular structure. Pigment concentration is influenced by the presence of the vacuole which restricts the chloroplasts to a thin layer (Hitchcock (1982) and reference therein). Janssen et al. (2001) and Rosen and Lowe (1984) showed that a reduction of the relative volume of the chloroplast (V_{Chl}) is induced by an increase of the relative volume of the vacuole. This is consistent with Bernard et al. (2009), who referenced a mean V_{Chl} of 17.1% for diatoms, whereas they referenced a V_{Chl} of 52% for Chlorophytes. A smaller V_{Chl} may also induce more densely packed pigments where the chlorophyll molecules shade each other and the probability for a photon to be caught decreases. The consequence of this package effect is that Q_a decreases with an increase of the pigment density (Wilhelm et al., 2014). The mean $Q_{a_{\text{phy}}}$, calculated over the whole experiment, was of 0.43 (CV = 63%, n = 37) for THAL, whereas it was of 1.09 (CV = 56%, n = 38) for CHLAM. This is consistent with Mas et al. (2008) who found a higher package effect for diatoms. A lower $\text{Chl-}a.\text{cell}_{\text{iv}}^{-1}$ and the package effect induce a smaller imaginary refractive index, which is consistent with Stramski (1999). From simulations of the optical properties of multi-layered spheres, Bernard et al. (2009) showed that the impact of the imaginary refractive index of the chloroplast is weak on the total and backward scattering efficiencies. In this work, similar observations were done on the forward and sideward efficiencies (results not shown). If the pigments are more densely packed, the chloroplast is denser, its refringence and thus its

TABLE 6.1 – Complex refractive index of the chloroplast and the volume equivalent complex refractive index for the 70%_{cyt}-30%_{chl} and the 80%_{cyt}-20%_{chl} models.

		70% _{cyt} -30% _{chl}	80% _{cyt} -20% _{chl}
Chl ¹	$m_r(\text{chl})$	1.0867	1.12
	$m_i(\text{chl})$	0.0333	0.0499
EVS ²	m_r	1.04	1.04
	m_i	0.01	0.01

¹ Chloroplast

² Equivalent volume sphere

real refractive index is higher (Aas, 1996). Bernard et al. (2009) highlighted that a higher real refractive index for the chloroplast leads to a higher total and backward efficiency. As Bernard *et al.*, 2009's observations deals with the total and backward scattering, they cannot be directly used to explain the variations of the forward and sideward efficiencies. So, additional radiative transfer computations were conducted. Two-layered sphere models were considered : 70%_{cyt}-30%_{chl} and 80%_{cyt}-20%_{chl}. Figure 6.8 displays the Q_{FSC} and the Q_{SSC} against the cell diameter. For Q_{FSC} , similar values are observed regardless to the model or the $m_r(\text{chl})$. At the opposite, Q_{SSC} values vary with the considered model. Q_{SSC} values increase of 58 % when the $m_r(\text{chl})$ increase from 1.09 (70%_{cyt}-30%_{chl}) to 1.12 (80%_{cyt}-20%_{chl}). Same observations were done for other volume equivalent refractive indices (results not shown). Thus, as concluded by Bernard et al. (2009), as far as backscattering is concerned, the real refractive index of the chloroplast $m_r(\text{chl})$ is a key parameter controlling the Q_{SSC} . To summarize, variations of $V(\text{chl})$, which induce variations of $m_r(\text{chl})$, can contribute to the inter- and intra-species variations of Q_{SSC} observed during the experiment. However, they do not explain Q_{FSC} differences as no change is observed from all the simulated study cases.

Influence of aggregates

For CHLAM, the occurrence of aggregates was identified over the whole experiment, whereas for THAL, the aggregates were detected only during the senescence phase. Boss

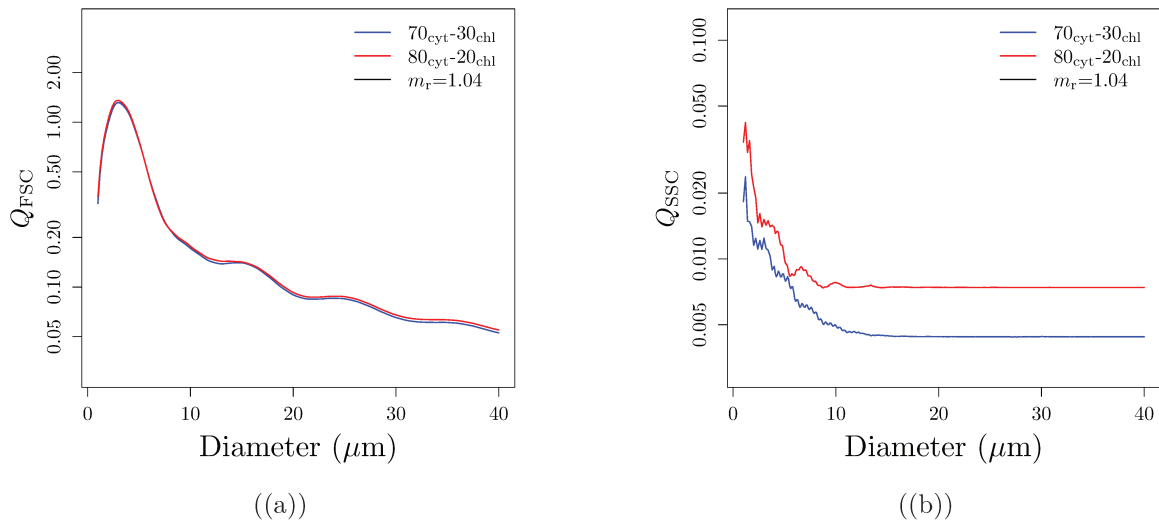


FIGURE 6.8 – Forward (a) and sideward (b) efficiencies against cell diameter for the two models : 70%_{cyt}-30%_{chl} (blue lines) and 80%_{cyt}-20%_{chl} (red lines), for a volume equivalent complex refractive index (m) equal to : $1.04 + i0.01$.

et al. (2009) showed an impact of aggregates on light attenuation and Hatcher et al. (2001) on the backscattering coefficient. Moutier et al. (2016) showed that both forward and sideward cross sections of aggregates, composed of homogeneous spheres, were lower than the cross sections computed for their surface equivalent homogeneous spheres (SEHS). In this study, radiative transfer computations were carried out to study the impact of aggregates on scattering efficiencies. Figure 6.9 displays Q_{FSC} and Q_{SSC} for five various aggregates composed of homogeneous spheres (Fig. 6.1). Aggregates composed of multi-layered spheres are not simulated as, to the best of our knowledge, no radiative transfer code, in free access, are available to simulate optical properties of such complex particles.

Concerning Q_{FSC} , aggregates C_{3b} and C_5 display higher values than their SEHS, while aggregates C_2 , C_{3a} and C_9 display lower values than their SEHS. In average, aggregates are 0.9 times smaller than SEHS. Moreover, we observe that Q_{FSC} is greatly impacted by the configuration of the aggregate and by its diameter (Sullivan et al., 2013). Concerning Q_{SSC} , values for aggregates are always smaller than for SEHS. Values for aggregates are, in average, 0.6 times smaller than SEHS. We note that Q_{SSC} seems less sensible to the size and the type of aggregate than Q_{FSC} . Indeed, the coefficient of variation

is of 47% for Q_{FSC} and 33% for Q_{SSC} . From these observations, we deduce that Q_{FSC} and Q_{SSC} of an aggregate composed of multi-layered spheres should be lower than the efficiencies of its surface-equivalent multi-layered sphere. It results that the aggregate formation could partly explain the lower efficiencies of CHLAM. However, for THAL, as an aggregate formation occurred from day 9, Q_{SSC} may decrease from this date due to aggregate formation. We note that, as the type of aggregate (i.e, various arrangements) does not seem to impact Q_{SSC} , it can not explain the intra-species variations. Q_{FSC} and Q_{SSC} differences between surface equivalent multi-layered or homogeneous spheres and aggregates are explained by two reasons. Firstly, the packaging involves that the scattering pattern is the result of a coherent interaction between the scattered wave emanating from each individual cell (Boss et al., 2009). Therefore, constructive and destructive interference may occur and impact the scattering (Mishchenko et al., 2002). Secondly, the porosity (the void fraction) of an aggregate increases with its size. It results that the geometrical cross section, and thus the size, are higher for an aggregate than for a sphere of same density (Boss et al., 2009). This could explain the lower efficiency for aggregate as compared to their SEHS. Indeed, Bernard et al. (2009) showed a decrease of the scattering efficiency with the cell size.

Impact of the thickness of the frustule

Variations of the thickness of the frustule were observed from SEM micrographs realized on days 5, 11, 13 and 17 of the experiment (Fig. 6.4). The proportion of the thickness of the silica wall ranged within 1.09% and 1.82% of the total cell volume. Radiative transfer computations showed that variations of the thickness frustule affected mainly the sideward scattering (Moutier et al., 2016). From days 5 to 13, the proportion of the thickness of the frustule increased from 1.37% to 1.82%. In the following, we will study the potential link between the frustule thickness and \tilde{Q}_{SSC} .

Radiative transfer simulations were performed with the ScattnLay code. They were focused on the analysis of the impact of an increase of the thickness of the silica wall on the scattering intensity. For this purpose, we simulated the optical properties of three-

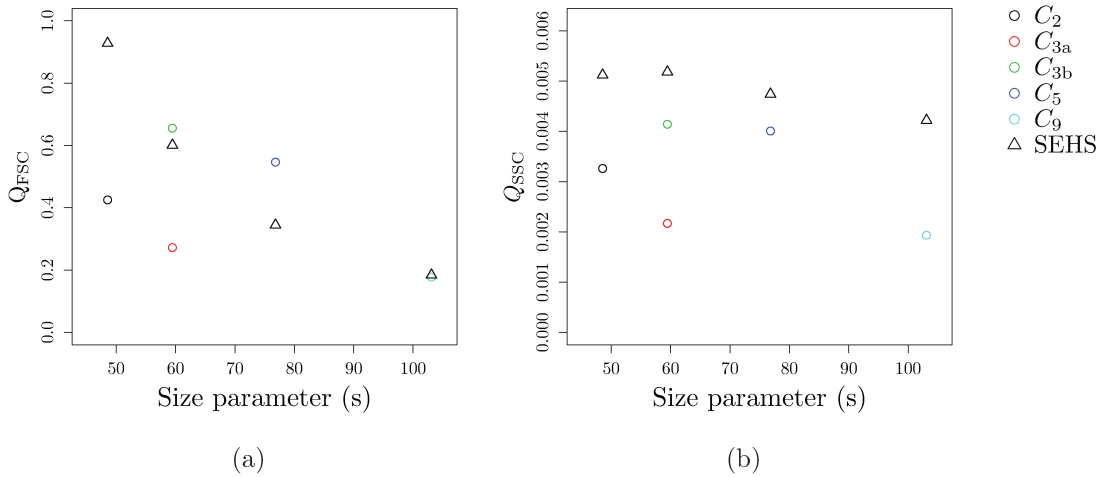


FIGURE 6.9 – (a) The forward and (b) sideward efficiencies for aggregates (empty circle) and their surface equivalent homogeneous sphere (SEHS; empty triangle) as a function of the size parameter (s).

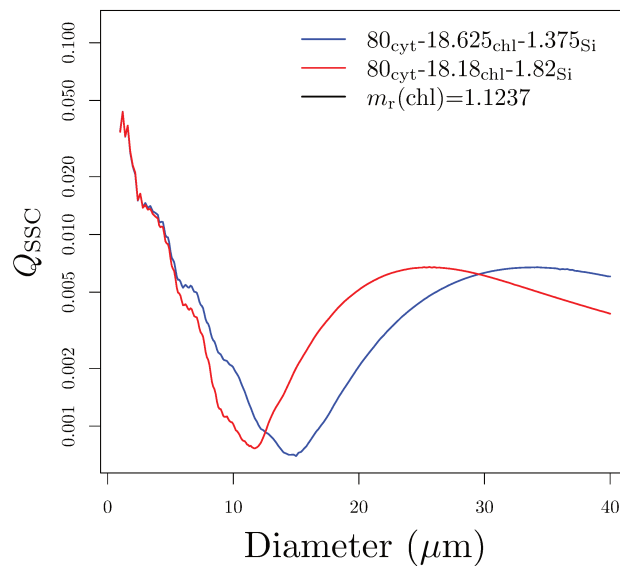


FIGURE 6.10 – The sideward efficiency against the diameter for two models : $80\%_{\text{cyt}}-18.625\%_{\text{chl}}-1.375\%_{\text{Si}}$ (blue lines) and $80\%_{\text{cyt}}-18.18\%_{\text{chl}}-1.82\%_{\text{Si}}$ (red lines) and for a complex refractive index of the chloroplast ($m(\text{chl})$) of : $1.1237 + i0.0520$.

layered sphere models. The relative volume of the frustule was 1.375% and 1.82% as measured from SEM. As the relative volumes of the cytoplasm and chloroplast cannot be measured by SEM, we considered a mean V_{cyt} of 80% and V_{chl} is calculated as the remaining volume. It results that the relative volumes of cytoplasm/chloroplast/silica

TABLE 6.2 – Complex refractive index of the chloroplast and the volume equivalent complex refractive index for the $80\%_{\text{cyt}}-18.625\%_{\text{chl}}-1.375\%_{\text{Si}}$ and the $80\%_{\text{cyt}}-18.18\%_{\text{chl}}-1.82\%_{\text{Si}}$ models.

		$80\%_{\text{cyt}}-18.625\%_{\text{chl}}-1.375\%_{\text{Si}}$	$80\%_{\text{cyt}}-18.18\%_{\text{chl}}-1.82\%_{\text{Si}}$
Chl ¹	$m_r(\text{chl})$	1.1237	1.1237
	$m_i(\text{chl})$	0.0520	0.0520
EVS ²	m_r	1.04	1.0398
	m_i	0.01	0.01

¹ Chloroplast

² Equivalent volume sphere

wall were $80\%_{\text{cyt}}-18.63\%_{\text{chl}}-1.37\%_{\text{Si}}$ and $80\%_{\text{cyt}}-18.2\%_{\text{chl}}-1.8\%_{\text{Si}}$. Figure 6.10 displays Q_{SSC} against the cell diameter considering a complex refractive index of the chloroplast layer ($m(\text{chl})$) of : $1.1237 + i0.0520$. The corresponding volume equivalent complex refractive indices are given in Table 6.2 for the two models. The silica wall may impact the sideward efficiency in two ways. First, due to some reflection on its outside surface, the silica wall reduced the penetration of light inside the cell and thus reduced the number of photons to be scattered. Second, the light inside the cell undergoes total reflection onto the inside surface of the silica wall, increasing the chance for a photon to be absorbed by the pigments (Osborne and Geider, 1989). This can explain why the behavior of Q_{SSC} against the diameter differs from the one observed for two-layered spheres (Fig. 6.8). Concerning the three-layered sphere models (Fig. 6.10), Q_{SSC} values are in the same order of magnitude whatever the thickness of the silica wall is. Other radiative transfer computations were carried out considering other $m(\text{chl})$ values but they gave similar results. We concluded that the temporal course of Q_{SSC} could not be explained by the variations of the silica wall thickness.

6.4.5 Optical properties as a function of the growth phase

In section 6.4.2, three growth phases were identified for each species. For THAL, the three phases corresponded to an exponential phase (day 1 to 5), a senescent phase (day

6 to 12) and a stationary phase (day 13 to 20). For CHLAM, the Figure 6.3 displays an exponential phase (day 1 to 9), a stationary phase (day 10 to 15) and a phase characterized by a succession of increase and decrease in the abundance of living phytoplankton cells (day 16 to 20). The different phases are named 1, 2 and 3 for THAL and A, B and C for CHLAM. The table 6.3 presents the \tilde{Q}_{FSC} , \tilde{Q}_{SSC} , \tilde{Q}_{bb} , $\tilde{Q}_{a_{phy}}$, \tilde{D} and the $\text{Chl-}a.\text{cell}_{liv}^{-1}$ averaged over each phase of THAL and CHLAM.

Concerning the inter-species variations, the scattering efficiencies were always lower for CHLAM than for THAL, whatever the phase. This was due to the higher absorption of CHLAM, which it is linked to the higher $\langle \text{Chl-}a.\text{cell}_{liv}^{-1} \rangle$ content. Indeed, the table 6.3 shows that $\langle \text{Chl-}a.\text{cell}_{liv}^{-1} \rangle$ and $\langle \tilde{Q}_{a_{phy}} \rangle$ were always greater for CHLAM than for THAL, whatever the phase. Furthermore, as discussed in the section 6.4.4, the lower scattering efficiencies of CHLAM can be explained by a lower refractive index due to smaller V_{chl} , which induced lower pigments densities. The section 6.4.4 showed that aggregate formation can contribute also to lower scattering efficiencies.

For THAL and CHLAM, the intra-species variations of $\langle \tilde{Q}_{FSC} \rangle$ are negatively correlated with the cell diameter but this effect can be greatly counterbalanced by the absorption efficiency cells and/or aggregation. For THAL between the phase 1-2 and for CHLAM between the phase A-B, the $\langle \tilde{Q}_{a_{phy}} \rangle$ increases with the increase of $\langle \text{Chl-}a.\text{cell}_{liv}^{-1} \rangle$ but it did not reduce the sideward efficiencies. It shows that as demonstrated in the section 6.4.4, the evolution of $\langle \tilde{Q}_{SSC} \rangle$ and thus $\langle \tilde{Q}_{bb} \rangle$ were mainly explained by the increase of the refractive index of the chloroplast layer due to higher pigment densities induced by the increase of $\langle \text{Chl-}a.\text{cell}_{liv}^{-1} \rangle$. For CHLAM, we considered that no significant changes occurs between the phase B a C as all the parameters remains relatively constant. For THAL, the efficiencies decreased between the phase 2 to 3. These variations were probably due to a combined effect of : a higher $\langle \tilde{Q}_{a_{phy}} \rangle$, a higher proportion of aggregated cells and an increase of the cell diameters. First, during the phase 2 $\langle \tilde{Q}_{a_{phy}} \rangle$ was 1.57 times higher than \tilde{Q} during the phase 3. Second, aggregates represented, in average, 23.6% of the total number of phytoplankton cells during the phase 2 while they represented about 39.7% of the total number of phytoplankton cells

TABLE 6.3 – The \tilde{Q}_{FSC} , \tilde{Q}_{SSC} , \tilde{Q}_{bb} , \tilde{Q}_{aphy} , \tilde{D} and $\text{Chl-}a.\text{cell}_{\text{liv}}^{-1}$ values, averaged over the different population growth stages of THAL and CHLAM with their associated coefficients of variation (%).

		Phases		
		1	2	3
THAL	$\langle \tilde{Q}_{\text{FSC}} \rangle$	7.29×10^{-1} (37)	8.09×10^{-1} (21)	6.97×10^{-1} (17)
	$\langle \tilde{Q}_{\text{SSC}} \rangle$	5.51×10^{-3} (25)	9.05×10^{-3} (34)	8.16×10^{-3} (14)
	$\langle \tilde{Q}_{\text{bb}} \rangle$	1.18×10^{-3} (24)	2.15×10^{-3} (39)	2.02×10^{-3} (16)
	$\langle \tilde{Q}_{\text{aphy}} \rangle$	3×10^{-1} (54)	3.59×10^{-1} (43)	5.65×10^{-1} (62)
	$\langle \tilde{D} \rangle$ (μm)	6.45 (25)	8.38 (26)	10.06 (22)
	$\langle \text{Chl-}a.\text{cell}_{\text{liv}}^{-1} \rangle$ (mg.m^{-3})	5.79×10^{-10} (90)	1.77×10^{-9} (53)	7.4×10^{-9} (46)
		Phases		
		A	B	C
CHLAM	$\langle \tilde{Q}_{\text{FSC}} \rangle$	4.70×10^{-1} (36)	2.72×10^{-1} (19)	2.82×10^{-1} (08)
	$\langle \tilde{Q}_{\text{SSC}} \rangle$	3.9×10^{-3} (16)	5.08×10^{-3} (15)	5.13×10^{-3} (05)
	$\langle \tilde{Q}_{\text{bb}} \rangle$	8.42×10^{-4} (17)	1.14×10^{-3} (17)	1.15×10^{-3} (05)
	$\langle \tilde{Q}_{\text{aphy}} \rangle$	7.46×10^{-1} (48)	1.26 (45)	1.52 (46)
	$\langle \tilde{D} \rangle$ (μm)	7.69 (20)	8.34 (05)	8.15 (02)
	$\langle \text{Chl-}a.\text{cell}_{\text{liv}}^{-1} \rangle$ (mg.m^{-3})	4.53×10^{-9} (56)	9.82×10^{-9} (27)	8.14×10^{-9} (13)

during the phase 3. This increase of the number of aggregate could reduce the sideward efficiencies (see section 6.4.4). Finally, as showed in the Figures 6.8 and 6.10, an increase of the cell diameters may lead to a decrease of the efficiencies.

6.5 Summary and remarks

In many studies, laboratory measurements of phytoplankton scattering properties were realized, exclusively, during the exponential growth phase to avoid the presence of detritus as phytoplankton scattering is derived from measurements of the bulk scattering and the particle size distribution. The present study shows that the use of analytical flow cytometry allows to avoid this issue and to analyze the evolution of the scattering properties of phytoplankton over the various phases of a culture. The temporal course of Q_{FSC} and

Q_{SSC} were analyzed during the entire life-cycle of two phytoplankton species : the diatom *Thalassiosira pseudonana* (THAL) and the green algae *Chlamydomonas concordia* (CHLAM). Over the whole experiment, the forward and sideward efficiencies of THAL were in average 2.2 and 1.6 times higher than for CHLAM, respectively. We also observed intra-species variations of the forward, sideward and thus, backward efficiencies which significantly differ according to the population growth stage of the considered species. Such an observation would obviously needs to be re-examined from scattering measurements performed over a larger number of phytoplankton species. Nevertheless, it tends to show that restricting the laboratory measurements to the exponential growth phase, to avoid the presence of detritus, and then assign a mean scattering efficiency by species will be inaccurate. Indeed, a better approach will be to consider, for a given species, different values for the cross section or the efficiency factor according to its population growth stage. It is challenging to link quantitatively the cell characteristics with the inter- and intra-species variations using radiative transfer codes. Indeed, it is difficult to define rigorously, for each cell, the input parameters to inverse the recorded signal. The configurations of aggregates, the thickness of a silica wall (in diatoms), the occurrence and size of gas vacuole(s), the size and shape of the chloroplast and the cytoplasm and their respective complex refractive index, are measurable from different techniques (e.g SEM, transmission electron microscopy, phase contrast), which require sometimes complex, expensive and time-consuming analyses. Moreover, to our knowledge, no code exists in free access to perform a simulation considering all of the cell characteristics together. This is the reason why the radiative transfer codes were used in this study just to identify which variable(s) drive(s) the scattering and not to accurately inverse the recorded signals. The forward efficiency is impacted by aggregation and, as expected, by the cell size as the forward scattering is influenced by the diffraction. The silica wall of diatoms is *a priori* not at the origin of the higher sideward efficiencies observed for THAL, as theoretical simulations showed that the presence of the frustule does not significantly increase the sideward scattering. Nevertheless, the presence of a silica wall changes the behavior of the sideward efficiency against the diameter. The intra- and inter-species variations of

the sideward efficiencies seem mainly due to the changes of the real refractive index of the chloroplast. As the chloroplast real refractive index is the key parameter, a simplistic two-layered model (cytoplasm-chloroplast) seems particularly appropriate to represent the phytoplankton cells. Note that, Bernard et al. (2009) obtained the same conclusions as they designated the 80-20 model as the most appropriate model to reproduce *in situ* measurements of the remote-sensing reflectance during a phytoplankton bloom. The next step will consist in deriving the scattering cross sections and efficiencies factors of living phytoplankton cells in coastal and open waters. Indeed, it will be interesting to investigate if inter-species variations will be easily identified for the different competitive phytoplankton species coexisting in the natural environment. In addition, it will be interesting to study if significant intra-species variations will be observed in natural waters, for example, during the different phase of a phytoplankton bloom. The present study was focused on the individual scattering properties of living phytoplankton cells. In the future, we plan to analyze also the detritic compartment from the Cytosense. For this purpose, the method of dye exclusion will be considered as it allows to make a distinction between living and non-living cells. The cell membrane of dead cells is permeable to the SYTOX green whereas, membrane living cells are not ([58,59]). It results that the detritic compartment could be identified using the fluorescence induced by the green fluorescent SYTOX Green (maximal emission at around 530 nm). A prior examination of the impact of the fluorescent dye on the sideward signal is mandatory. If the dye does not influence the signal scattered by the detrital particle, the scattering cross sections of the detritus will be derived from the Cytosense measurements according to the Duforêt-Gaurier et al. (2015) methodology. In this case, the idea will be to characterize, in open waters, the backscattering cross section of all the sub-populations (detritus, living phytoplankton cells and heterotrophic procaryotes) to study their influence on the backscattering coefficient. To quantify the abundance of the heterotrophic procaryotes, it will be envisaged to use a more recent Cytosense version with higher sensitivity performances (the trigger level of 16 mV on side scatter might be low enough to detect certain submicron particles or larger bacteria) or a dedicated cytometer to measure the bacterial abundance. Then, the bacterial backscatte-

ring cross section could be simulated from the bacterial abundance using Mie theory and the backscattering signal could be estimated by adding the bacterial contribution to the contribution of phytoplankton cells and detrital particles. The rebuilt of the backscattering coefficient will allow to study the relative contributions of the phytoplankton and detritus directly from in situ measurements without considering assumptions of the particle shape or internal structure as done in previous study. Many studies tried to making budgets for the backscattered light using theoretical models without success (Stramski and Kiefer, 1991, Morel and Ahn, 1991). Indeed, more light was backscattered from open ocean than could be taken into account from models. As the closure of the backscattering coefficient was not obtained, the presence of non-living particles, that could not be physically discriminated from other oceanic particles, was suggested as the likely component at the origin of the "missing backscattering". It is now recognized that the missing part can also be explained by an underestimation of the backscattering efficiencies of phytoplankton cells in models based on homogeneous spheres. Therefore, direct measurements from flow cytometry allow to avoid this issue and highlight the role of phytoplankton cells in the backscattered light. Indeed, the phytoplanktonic compartment can play a significant role in b_{bp} . For instance, Martinez-Vicente et al. (2012) showed that, even in the case where bacteria have the highest contribution to b_{bp} , variations in b_{bp} can be due to the phytoplanktonic compartment. Such study highlighted the importance to completely understand each compartment for a better understanding of the b_{bp} variations.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the support from the French Space Agency (CNES) through the TROPHY project (CNES/TOSCA program) and the PHYTOCOT project (CNES/TOSCA program). The authors thank Dr. Felipe Artigas, Dr. Bricaud Annick and Dr. Natacha Guiselin for their precious advice. Thanks to Arnaud Cauvin and Michel Laréal for their technical help.

Utilisation de la cytométrie pour une meilleure compréhension de la relation POC vs. b_{bp}

7.1 Introduction

La mesure de paramètres biogéochimiques clés tels que la concentration en carbone organique particulaire ([POC]; $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$) est essentielle afin de comprendre et de suivre l'évolution spatio-temporelle du cycle du carbone. Bien qu'il soit important d'estimer le stock en POC, les mesures effectuées sont rares à cause du coût élevé des analyses et du manque de méthodes rapides. Suite à l'avancée technologique dans l'instrumentation optique, des modèles bio-optiques ont été établis afin d'utiliser des mesures d'IOPs comme proxy de paramètres biogéochimiques tels que le POC (Loisel and Morel, 1998, Stramski et al., 1999, Claustre et al., 1999, Loisel et al., 2001, Balch et al., 2001, Stramska and Stramski, 2005, Gardner et al., 2006, Stramski et al., 2008, Balch et al., 2010). Utiliser une mesure optique permet d'effectuer des mesures rapides avec une résolution spatio-temporelle beaucoup plus élevée qu'avec des méthodes d'échantillonnage traditionnelles et d'analyses en laboratoire. En effet, les instruments optiques peuvent être déployés sur une grande variété de plates-formes à des échelles spatio temporelles élevées (e.g., flotteurs profileurs Bio-Argo). Ainsi, depuis deux décennies, le coefficient d'atténuation et le coefficient de rétrodiffusion ont été utilisés comme un proxy du POC. De plus, il est possible d'obtenir le coefficient de rétrodiffusion à partir de la réflectance marine. Ainsi, à partir de

mesures satellitaires, le POC peut être estimé à l'échelle globale. Les relations POC vs. b_{bp} ont été étudiées à travers différents jeu de données *in situ* acquis dans différentes régions du globe (e.g., Stramski et al. (1999), Loisel et al. (2001), Balch et al. (2001), Stramski et al. (2008), Cetinić et al. (2012)). Cependant, les relations établies diffèrent les unes des autres et la variabilité autour de chacune d'entre elles peut être importante. Notons que ces relations ont été développées soit à partir d'un jeu limité de données ($N \leq 71$ pour les études de Stramski et al. (1999), Loisel et al. (2001), Balch et al. (2001), Stramski et al. (2008)), soit avec une gamme restreinte en POC (Cetinić et al. (2012)). Par exemple, lors de l'étude de Stramski et al. (1999), la concentration en POC varie entre ~ 20 à ~ 820 mg.m^{-3} mais n'inclut que 57 valeurs alors que lors de l'étude de Cetinić et al. (2012), le nombre d'échantillons est de 321 pour des concentrations en POC n'excédant pas 350 mg.m^{-3}

Afin d'illustrer ces propos, nous avons récolté différentes mesures de POC et de b_{bp} , disponibles en libre accès, à partir des missions AMT (Atlantique), Boum (Mer méditerranéenne orientale et occidentale), Biosope (Pacifique Sud) et Melville (océan Austral) (Fig. 7.1). Notons que, pour les missions AMT, les prélèvements effectués pour les mesures de POC ne sont pas réalisées en même temps que les mesures de b_{bp} . Pour un prélèvement effectué 5 min avant ou après la mesure de b_{bp} , nous observons des différences en latitude et en longitude. Nous avons donc décidé de retenir seulement les prélèvements effectués 5 min avant ou après la mesure de b_{bp} qui ont des différences spatiales inférieures à 100 m. Sur l'ensemble des prélèvements effectués lors des campagnes AMT ($N=880$), 60 mesures ont été retenues. Pour l'ensemble des missions, la concentration en POC variait entre 9,6 et 1169 mg.m^{-3} et le b_{bp} variait entre 0,0001 et 0,02 m^{-1} . La figure 7.1 met clairement en évidence la variabilité autour de la relation entre le POC et le b_{bp} (R^2 de 0,38). Par exemple, pour une valeur faible de b_{bp} égale à 0,0006 m^{-1} , la concentration en POC varie entre 17 et 69 mg.m^{-3} . De même, pour une valeur forte de b_{bp} égale à 0,001 m^{-1} , la concentration en POC varie entre 21 et 81 mg.m^{-3} . Cette observation soulève une question : dans quelle mesure la variabilité autour de la relation POC vs. b_{bp} est induite par le fait que les mesures ne coïncident pas parfaitement dans l'espace et le temps, et également

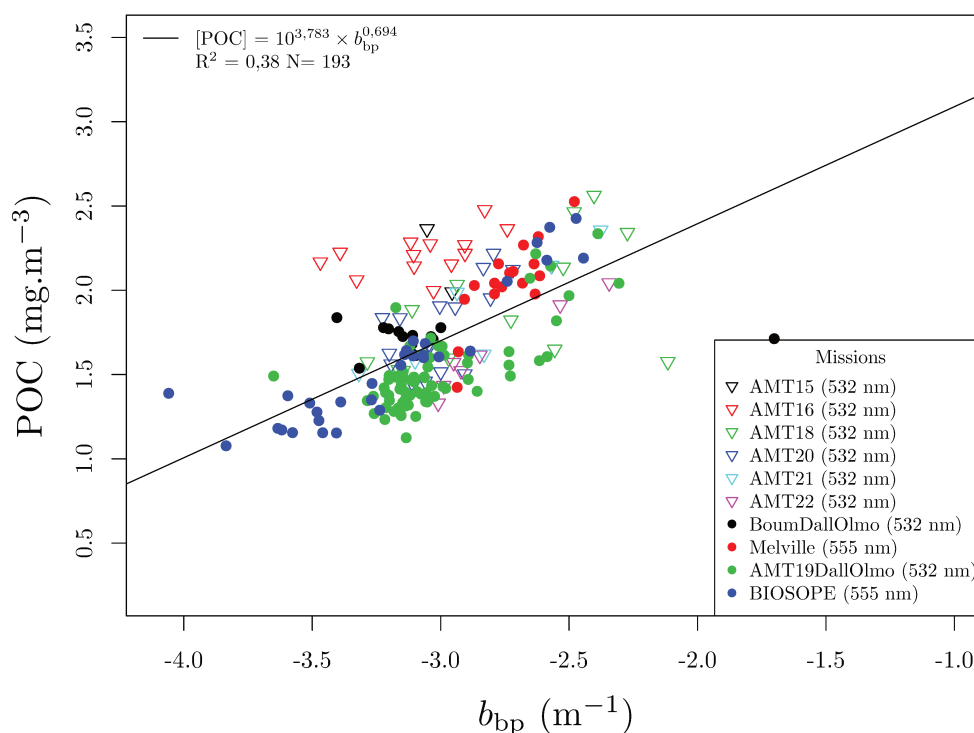


FIGURE 7.1 – Concentration en carbone organique particulaire (POC) en fonction du coefficient de rétrodiffusion (b_{bp}) à partir de données recueillies lors de différentes missions.

par les différences dans la méthodologie d'analyse, d'échantillonnage, d'instrumentation, ou bien par la nature des particules composant le milieu (Cetinić et al., 2012). En effet, le phytoplancton lui-même (variation morphologique et/ou intra-cellulaire) mais aussi le cortège particulaire associé (e.g., bactéries hétérotrophes, détritiques, particules inorganiques, etc) peuvent impacter la concentration en POC et/ou le b_{bp} . Pour tenir compte de la variabilité des particules composant le milieu, une nouvelle approche a été développée par Reynolds et al. (2016) visant à analyser la relation POC vs. b_{bp} en fonction de la composition particulaire des masses d'eau. À partir de données récoltées dans le sud de la mer de Beaufort, dans la rivière Mackenzie et dans la mer de Chukchi, les auteurs ont identifié trois types d'eau : organique ($POC \geq 25\%$ de la matière en suspension), mixte (POC entre 6% et 25 % de la matière en suspension) et minérale ($POC \leq 6\%$ de la matière en suspension). En établissant une relation spécifique POC vs. b_{bp} pour chaque type d'eau,

la variabilité autour de la relation moyenne diminue. Alors que le coefficient de corrélation était de 0,6 sur l'ensemble des données (N=274), il varie entre 0,75 et 0,92 en scindant les données en fonction du type d'eau. L'une des conclusions de cette étude est que le b_{bp} peut être utilisé comme un proxy du POC si la proportion des différents types de particules composant le milieu reste stable. Cependant, les incertitudes deviennent importantes lorsque la masse d'eau analysée est composée d'un mélange de diverses particules dont les proportions varient. Une connaissance préalable de la composition de l'assemblage, couplée à des relations spécifiques, permettrait une meilleure estimation du POC.

Une autre approche possible est d'analyser la variabilité du b_{bp} en fonction du type de particules. Pour ce faire, Martinez-Vicente et al. (2012) ont utilisé la cytométrie afin d'obtenir la concentration en particules de différents compartiments (bactéries hétérotrophes, *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, phytoplancton picoeucaryotes, nanophytoplancton, cryptophytes et coccolithophores), et de reconstruire le coefficient de rétrodiffusion. La reconstruction a été faite en multipliant les abondances mesurées par cytométrie par les tailles et les efficacités de rétrodiffusion référencées dans la littérature pour chaque compartiment. La reconstruction permet d'intégrer à la fois l'impact de l'abondance et l'impact de la section efficace de rétrodiffusion de chaque compartiment sur le coefficient de rétrodiffusion total. Cette étude a mis en évidence une forte contribution du compartiment bactérien au b_{bp} , mais aussi le rôle prépondérant du phytoplancton dans la variabilité du b_{bp} . Il est important de souligner que l'utilisation d'une même section efficace de rétrodiffusion donnée pour un compartiment ne permet pas d'intégrer la variabilité optique de chaque compartiment. Ici, nous proposons d'utiliser deux cytomètres : le FACSCalibur pour le compartiment bactérien et le Cytosense pour les cellules phytoplanctoniques et les cellules en dégénérescence. Contrairement à Martinez-Vicente et al. (2012), nous allons effectuer une estimation de la section efficace de rétrodiffusion par le biais du Cytosense. Cette mesure permettra d'intégrer la variabilité optique du compartiment phytoplanctonique et des cellules en dégénérescence. Ainsi, à partir des données récoltées lors de l'expérience en microcosme, la relation POC vs. b_{bp} a été analysée pour THAL et CHLAM au cours de différentes phases de croissance. Tout d'abord, les relations entre l'abondance de chaque

compartiment et le b_{bp} ont été analysées. De plus, une reconstruction du coefficient de rétrodiffusion a été effectuée à partir de mesures cytométriques et de simulations de diffusion simple. Dans un premier temps, la validité de cette reconstruction a été vérifiée en comparant les valeurs modélisées avec les valeurs mesurées par un ECO-BB9. Dans un deuxième temps, la reconstruction a été utilisée afin de déterminer l'impact de chaque compartiment dans la variabilité du b_{bp} en fonction des phases de croissance. Enfin, l'origine des différentes relations POC vs. b_{bp} observées pour chaque espèce a été investiguée.

7.2 Abondance des différents compartiments

Les figures 7.2 et 7.3 présentent respectivement l'abondance des bactéries hétérotrophes, des cellules phytoplanctoniques et des cellules en dégénérescence pour THAL et CHLAM. Pour THAL (Fig. 7.2(a) et 7.2(b)), la phase exponentielle est caractérisée par une augmentation du nombre de cellules phytoplanctoniques des jours 1 à 5. La fin de phase exponentielle est probablement causée par une limitation en nutriments. La phase de sénescence (jours 6 à 12) commence avec la diminution de l'abondance en cellules phytoplanctoniques et l'augmentation du nombre de cellules dégénérées. Le pic d'abondance des cellules dégénérées survient après le pic d'abondance des cellules phytoplanctoniques. L'abondance des cellules de phytoplancton reste relativement constante entre les jours 13 et 20. Ensuite, des jours 15 à 20, l'abondance des cellules dégénérées augmente pour B2 (Fig. 7.2(b)), alors qu'elle reste assez stable pour B1 (Fig. 7.2(a)). Comme les cellules de phytoplancton excrètent du carbone organique dissout (DOC), l'augmentation de la biomasse de phytoplancton induit une augmentation de la concentration en DOC. Ainsi, comme le DOC maintient le métabolisme des micro-organismes ,e.g., les bactéries hétérotrophes (Cole et al., 1982), cela peut expliquer l'augmentation de l'abondance bactérienne observée entre les jours 2 à 11 pour B1 et B2. Pendant la phase de sénescence, l'abondance du phytoplancton est plus faible ce qui induit que la teneur en DOC libérée diminue. Cependant, au cours de cette phase, les processus biologiques comme la sénescence, la dégradation du POC *via* une hydrolyse exo-enzymatique par les bactéries hétérotrophes, et

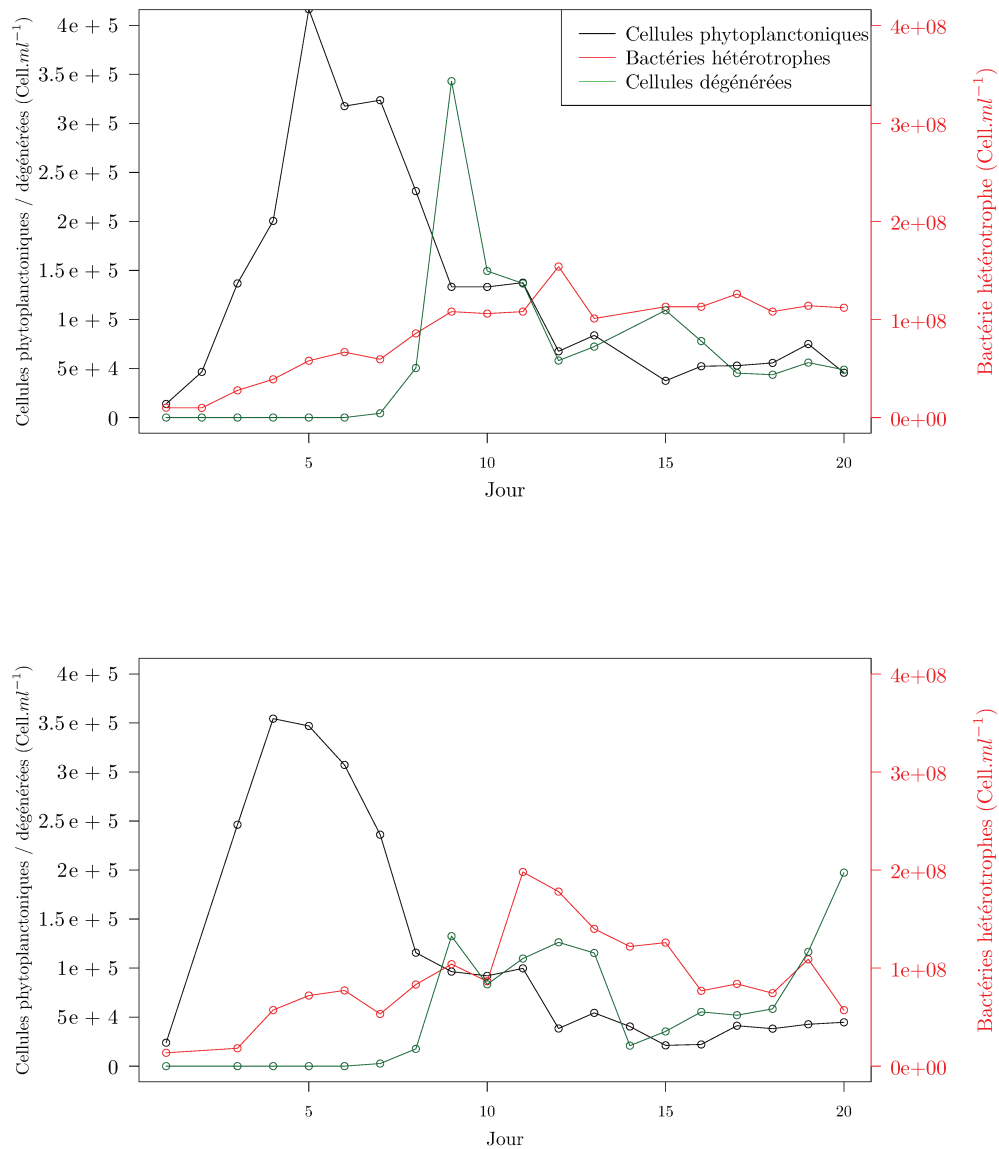


FIGURE 7.2 – Abondance des bactéries hétérotrophes (en rouge), des cellules phytoplanctoniques (en noir) et des cellules en dégradation (en vert) tout au long de l'expérience pour les bacs a) B1 et b) B2 de THAL.

la lyse cellulaire due aux infections virales (Azam et al., 1983, 1992, Agustí and Duarte, 2013, Smith et al., 1995) peuvent être à l'origine d'une augmentation en DOC. Le rôle de la lyse virale sur le cycle bactérien est contradictoire. Elle peut soutenir le métabolisme des bactéries par une augmentation de la concentration en DOC suite à une libération du contenu cellulaire, elle peut aussi provoquer la mort des bactéries (Fuhrman and Noble, 1995, Fuhrman, 1999). L'équilibre entre ces processus biologiques peut impliquer une aug-

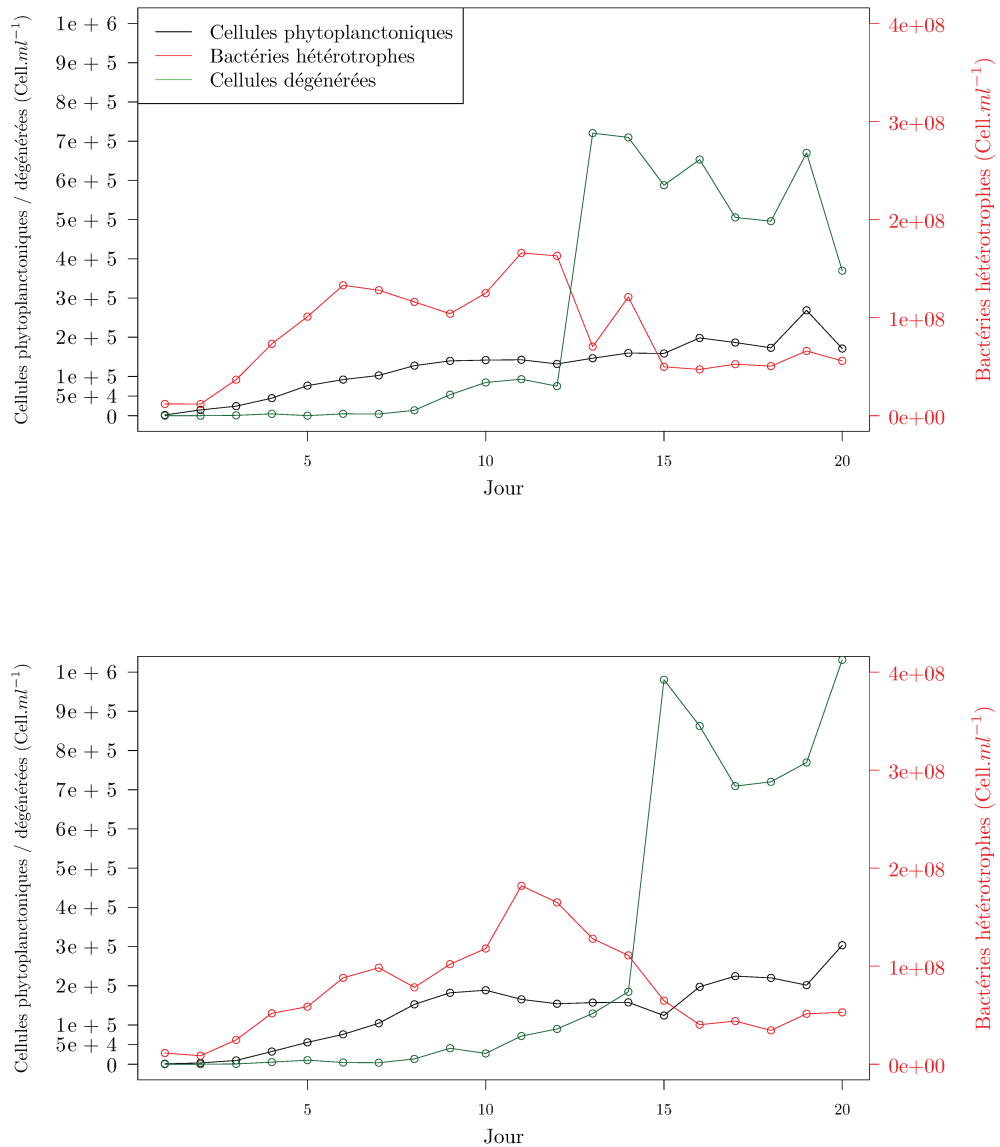


FIGURE 7.3 – Abondance des bactéries hétérotrophes (en rouge), des cellules phytoplanctoniques (en noir) et des cellules en dégénérescence (en vert) tout au long de l’expérience pour les bacs a) B4 et b) B5 de CHLAM.

mentation ou une diminution du compartiment bactérien. Cela explique peut être que, du jour 12 à 20, l’abondance des bactéries reste relativement constante pour B1, alors qu’elle diminue légèrement pour B2.

Pour CHLAM (Fig. 7.3(a) et 7.3(b)), la phase exponentielle se déroule entre le jour 1 et le jour 9. Comme pour THAL, la fin de la phase exponentielle est probablement due à une

limitation en nutriments. Au cours de la phase stationnaire (du jour 10 à 15), l'abondance du phytoplancton reste assez constante et l'abondance des cellules dégénérées augmente. Contrairement à THAL, il n'y a pas de phase de sénescence. En effet, du 16^{ème} au 20^{ème} jour, l'abondance du phytoplancton augmente tandis que l'abondance de cellules dégénérées est constante. L'augmentation du nombre de cellules phytoplanctoniques peut être due à une dislocation de certains agrégats ou à la reminéralisation des éléments nutritifs sous l'action de l'activité bactérienne. Grâce à la lyse bactérienne, la matière organique et les éléments nutritifs sont libérés dans le milieu et deviennent disponibles pour les procaryotes hétérotrophes et les cellules phytoplanctoniques (Azam et al., 1983, Bratbak et al., 1994, Wilhelm and Suttle, 1999, Fuhrman, 1999). Du 13^{ème} au 20^{ème} jour, pour B4 (Fig. 7.3(a)) et du 15^{ème} au 20^{ème} jour pour B5 (Fig. 7.3(b)), la concentration des cellules dégénérées est supérieure à la concentration maximale dans les cellules de phytoplancton observées au cours de l'expérience. Ce phénomène peut être expliqué par une dislocation de certains agrégats en dégénérescence. Comme pour THAL, sans doute suite à une augmentation de la concentration en DOC, l'abondance bactérienne des bacs B4 et B5 augmente du jour 2 à 11. Du 12^{ème} à 20^{ème} jour, l'abondance en bactéries diminue. Cette diminution d'abondance est probablement due à une forte mortalité causée par une lyse virale (Fuhrman and Noble, 1995, Fuhrman, 1999).

7.3 Relations POC vs. $b_{b_{BB9}}$

La figure 7.4 présente, pour THAL (en noir) et CHLAM (en orange), les relations entre la concentration en POC et le coefficient de rétrodiffusion mesuré par un ECO-BB9 (WetLabs) à 488 nm ($b_{b_{BB9}}$). Une distinction est faite entre les mesures effectuées en phase exponentielle (triangles pleins) et celles réalisées hors phase exponentielle (cercles vides). Sur l'ensemble de l'expérience, une relation linéaire positive a pu être identifiée pour THAL ($R^2 = 0,9$; $N = 21$) et CHLAM ($R^2 = 0,8$; $N = 20$). Notons que la pente de CHLAM est 1,6 fois plus élevée que celle de THAL. Il est important de souligner que la variabilité autour des relations est nettement plus importante en dehors de la phase

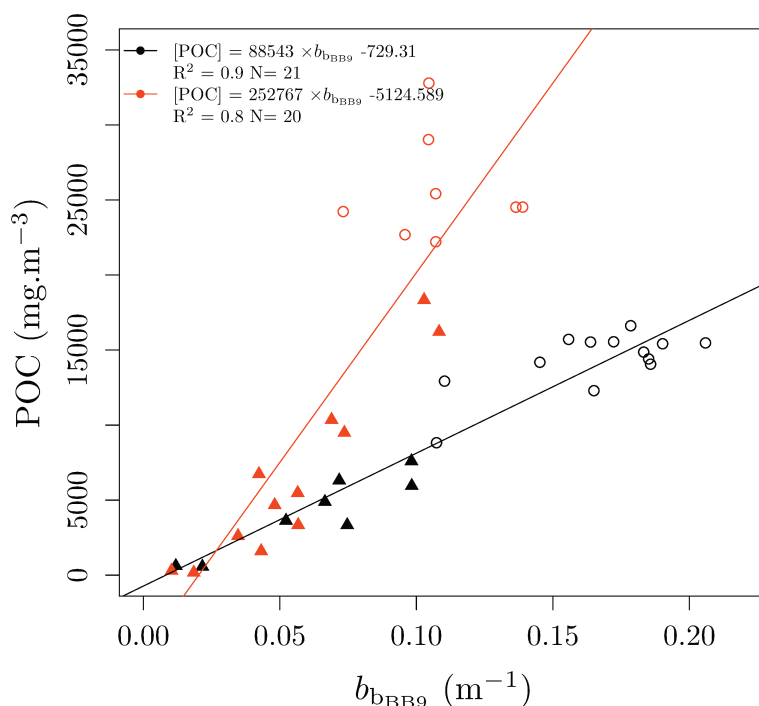


FIGURE 7.4 – Relations entre la concentration en POC et le coefficient de rétrodiffusion mesuré ($b_{b_{BB9}}$) pour THAL (points en noir) et CHLAM (points en orange). Les triangles pleins sont pour les valeurs obtenues durant la phase exponentielle et les cercles vides sont pour les valeurs obtenues en dehors de la phase exponentielle.

exponentielle. Si nous considérons uniquement les données récoltées en dehors de la phase exponentielle, le coefficient de corrélation diminue, il est de 0,49 pour THAL et de 0,0 pour CHLAM. Notons que durant cette période une variation du $b_{b_{BB9}}$ et du POC est observée. En effet, pour THAL et CHLAM, le $b_{b_{BB9}}$ varie, respectivement d'un facteur 1,91 et 1,89 alors que le POC varie, respectivement, d'un facteur 1,88 et 1,47. Cette première observation met en évidence l'importance de considérer la phase de croissance lors d'analyses de relations POC vs. b_{bp} .

Les différences entre les relations pour THAL et CHLAM peuvent être dues au phytoplancton lui-même (concentration en cellules phytoplanctoniques différentes suivant les bacs ou différences morphologiques et intra-cellulaires suivant les espèces considérées) ou dues au cortège particulaire accompagnant le phytoplancton (e.g., concentration en bactéries hétérotrophes, détritrus, cellules en dégénérescence). En effet, l'efficacité de rétrodiffusion et le

contenu en carbone par cellule varient selon les espèces phytoplanctoniques mais aussi selon la phase de croissance de la population considérée. Par exemple, comme l'ont expliqué Cetinić et al. (2012), la pente plus faible observée pour les diatomées (THAL) peut être due à leur diffusion plus importantes (section 6.4.4) ou bien à leur rapport carbone/volume plus faible (Menden-Deuer and Lessard, 2000). Une autre hypothèse, pouvant expliquer la différenciation de pente entre les deux espèces, est que la contribution des bactéries et/ou des particules non algales (détritus) au coefficient de rétrodiffusion était différente entre les bacs de THAL et de CHLAM. En effet, comme le montre les figures 7.2 et 7.3, le cortège bactérien et le nombre de cellules en dégénérescence évoluent différemment pour chaque espèce durant l'expérience.

Le coefficient de rétrodiffusion étant, au premier ordre, fonction de l'abondance, la variabilité du b_{bBB9} est analysée, dans un premier temps, en fonction de l'abondance des différents compartiments.

7.4 Relations BB9 vs. Abondance

La table 7.1 présente les coefficients de corrélation (R^2) entre le b_{bBB9} et l'abondance des différents compartiments calculés sur toute la durée de l'expérience (colonne labellisée "toute" dans la table 7.1), sur la phase exponentielle (colonne labellisée "Expo") et sur le reste de l'expérience (colonne labellisée "Hors Expo"). Pour rappel, la phase exponentielle concerne les jours 1 à 5 pour THAL et 1 à 9 pour CHLAM. Nous avons considéré seulement deux phases (exponentielle et non exponentielle) pour avoir un nombre suffisant de mesures *in situ* pour les analyses statistiques. Notons que dans la suite, l'abondance totale désigne la somme entre l'abondance bactérienne, phytoplanctonique et celle des cellules en dégénérescence.

Durant la phase exponentielle, nous observons une relation linéaire entre l'abondance totale et le b_{bBB9} pour THAL ($R^2 = 0,73$) et CHLAM ($R^2 = 0,63$). Par ailleurs, si nous considérons les compartiments particuliers séparément, des relations linéaires d'autant plus fortes ($R^2 \sim 0,85$) relie l'abondance phytoplanctonique et le b_{bBB9} pour THAL et

CHLAM. Ainsi, l'abondance phytoplanctonique, qui représentent moins de 3 % de l'abondance totale, est un excellent prédicteur du $b_{b_{BB9}}$ durant la phase exponentielle. Ce résultat est en concordance avec celui obtenu par Martinez-Vicente et al. (2012) qui ont observé que, sur les mesures de la campagne ECOMAR, 70% de la variabilité du b_{bp} pouvaient être expliqués par l'abondance phytoplanctonique. Cependant, que se soit en dehors de la phase exponentielle ou sur l'ensemble de l'expérience, nous observons de faibles coefficients de corrélations entre l'abondance totale et le $b_{b_{BB9}}$. Cette observation est surprenante dans la mesure où le coefficient de rétrodiffusion est dépendant, au premier ordre, de l'abondance (Eq. (2.9)). Il est important de souligner que, sur l'ensemble de l'expérience, si nous considérons les différents compartiments particulaires séparément, l'abondance bactérienne est le meilleur prédicteur du $b_{b_{BB9}}$ ($R^2=0,57$) pour THAL. Ce n'est pas le cas pour CHLAM, malgré la forte abondance bactérienne qui représente, en moyenne 99% de l'abondance totale, l'abondance phytoplanctonique est le meilleur prédicteur du $b_{b_{BB9}}$ ($R^2=0,42$). Cependant, les coefficients de corrélation restent relativement faibles. Ce faible lien entre l'abondance et le $b_{b_{BB9}}$ peut être dû : i) à un effet de diffusion multiple ii) à la non prise en compte de l'abondance détritique dans l'abondance totale, iii) à une formation d'agrégats, iv) à des variations de la section efficace de rétrodiffusion ou v) à un changement de concentration des différents compartiments de l'assemblage particulaire. Premièrement, un effet de diffusion multiple induit une variation du coefficient de rétrodiffusion sans impacter la concentration en particules. Cette variation engendre une perte de linéarité entre l'abondance et le coefficient de rétrodiffusion. Deuxièmement, le signal de diffusion de quelques petites particules non fluorescentes (comme des débris, des virus) peut être faible. Il en résulte que la mesure de telles particules peut être incluse dans le bruit instrumental du Cytosense (Thyssen et al., 2014). Par conséquent, ces particules qui participent au POC ne sont pas prises en compte dans le calcul de l'abondance totale. Ainsi, ce biais peut être à l'origine des faibles coefficients de corrélation obtenus entre l'abondance totale et le $b_{b_{BB9}}$. Troisièmement, lors d'une agrégation, les particules deviennent plus grosses, ce qui induit une variation du coefficient de rétrodiffusion. De plus, cette agrégation aura tendance à diminuer l'abondance totale en particules (Flory et al., 2004) sans variation

TABLE 7.1 – Coefficients de corrélation (R^2) entre coefficient de rétrodiffusion mesuré ($b_{b_{BB9}}$) et l’abondance des compartiments calculés sur les différentes phases de l’expérience. La RSE représente l’erreur type relative (%) et N le nombre de jours.

Compartiment		Phases					
		Toute		Expo		Hors Expo	
		R^2 (RSE)	N	R^2 (RSE)	N	R^2	N
THAL	Tous	0,54 (0,04)	37	0,73 (0,02)	10	0,09 (0,03)	27
	Bactérien	0,57 (0,04)	38	0,73 (0,02)	10	0,1 (0,03)	28
	Phytoplanctonique	0,18 (0,05)	37	0,84 (0,01)	9	0,7 (0,02)	28
	Cellules en dégénérescence	0	26	∅	∅	0	26
CHLAM	Toute	0,34 (0,03)	38	0,63 (0,02)	18	0,26 (0,02)	20
	Bactérien	0,33 (0,03)	38	0,63 (0,02)	18	0,26 (0,02)	20
	Phytoplanctonique	0,42 (0,03)	38	0,86 (0,01)	18	0,28 (0,02)	20
	Cellules en dégénérescence	0,06 (0,03)	33	0,67	13	0,14 (0,03)	20

de la concentration en POC. Quatrièmement, comme le met en évidence l’Eq. (2.9), le coefficient de rétrodiffusion des différents compartiments composant le milieu varie aussi en fonction de leur section efficace de rétrodiffusion. La section efficace de rétrodiffusion peut varier suite à un changement morphologique ou intra-cellulaire. Ainsi, pour une même concentration en particules, le coefficient de rétrodiffusion changera. Le coefficient de rétrodiffusion total étant la somme des coefficients de rétrodiffusion de chaque compartiment ayant chacun des propriétés de rétrodiffusion spécifiques, si l’un d’eux augmente indépendamment des autres (suite à une variation de l’abondance du compartiment), la linéarité entre l’abondance totale et le coefficient de rétrodiffusion peut être rompue.

L’étape suivante consiste à effectuer une reconstruction du coefficient de rétrodiffusion bulk à partir des mesures cytométriques sur les différents compartiments (bactéries hétérotrophes, cellules phytoplanctoniques et cellules en dégénérescence). Cette reconstruction permettra d’analyser à la fois l’impact de l’abondance et de la section efficace de rétrodiffusion des différents composants sur le coefficient de rétrodiffusion bulk.

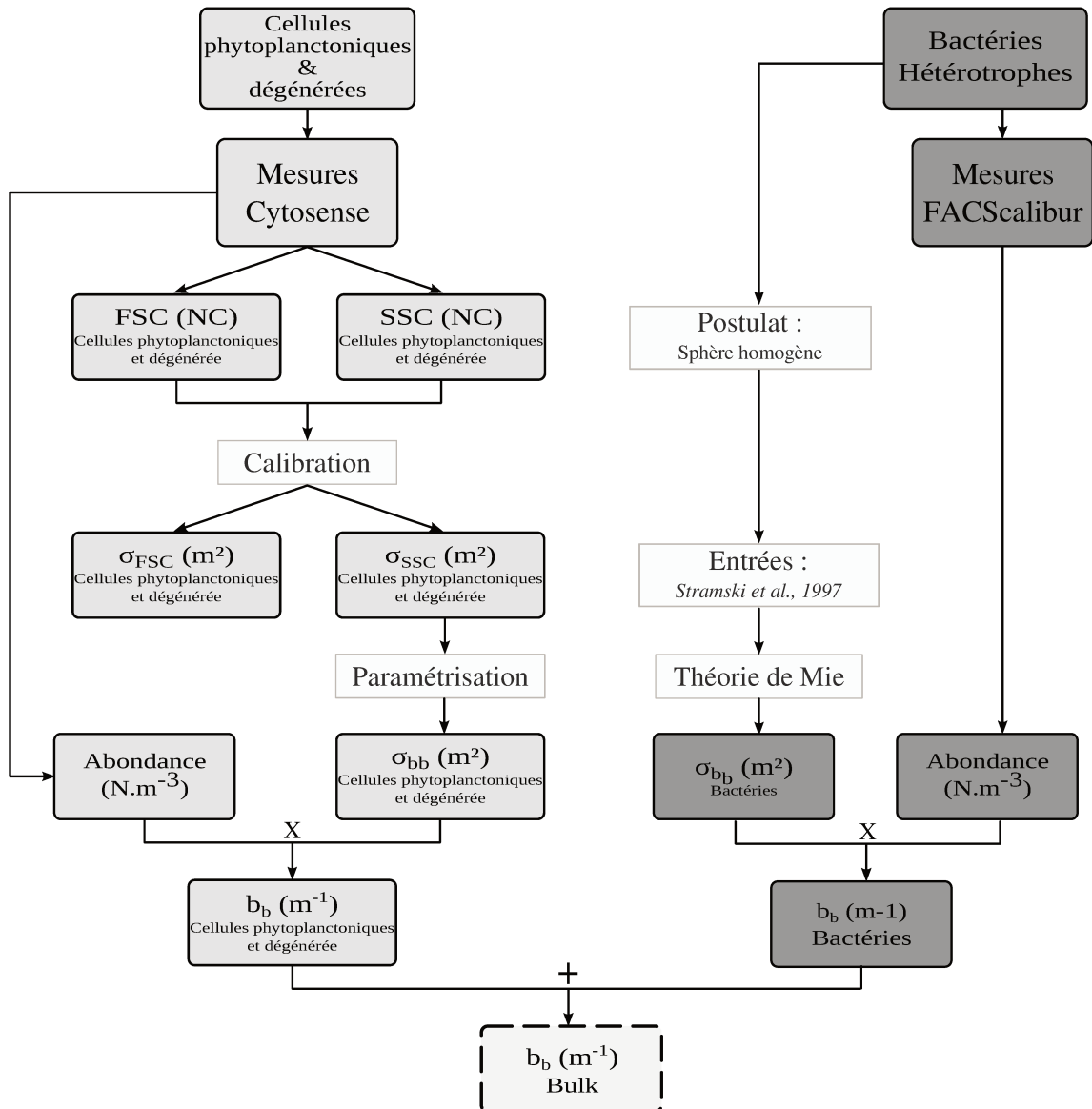


FIGURE 7.5 – Flowchart montrant les étapes de reconstruction du coefficient de rétrodiffusion à partir des mesures cytométriques.

7.5 Reconstruction du coefficient de rétrodiffusion à partir de mesures cytométriques

Une reconstruction du coefficient de rétrodiffusion totale a été réalisée. La section efficace de rétrodiffusion des bactéries hétérotrophes, ($\sigma_{b_b}(\text{bact})$), a été simulée à 488 nm avec la théorie de Mie puis multipliée par l'abondance bactérienne (mesurée par le FACScalibur) pour calculer le b_b du compartiment bactérien ($b_b(\text{bact})$). Pour les calculs de Mie, les bactéries hétérotrophes sont considérées comme des particules sphériques avec un

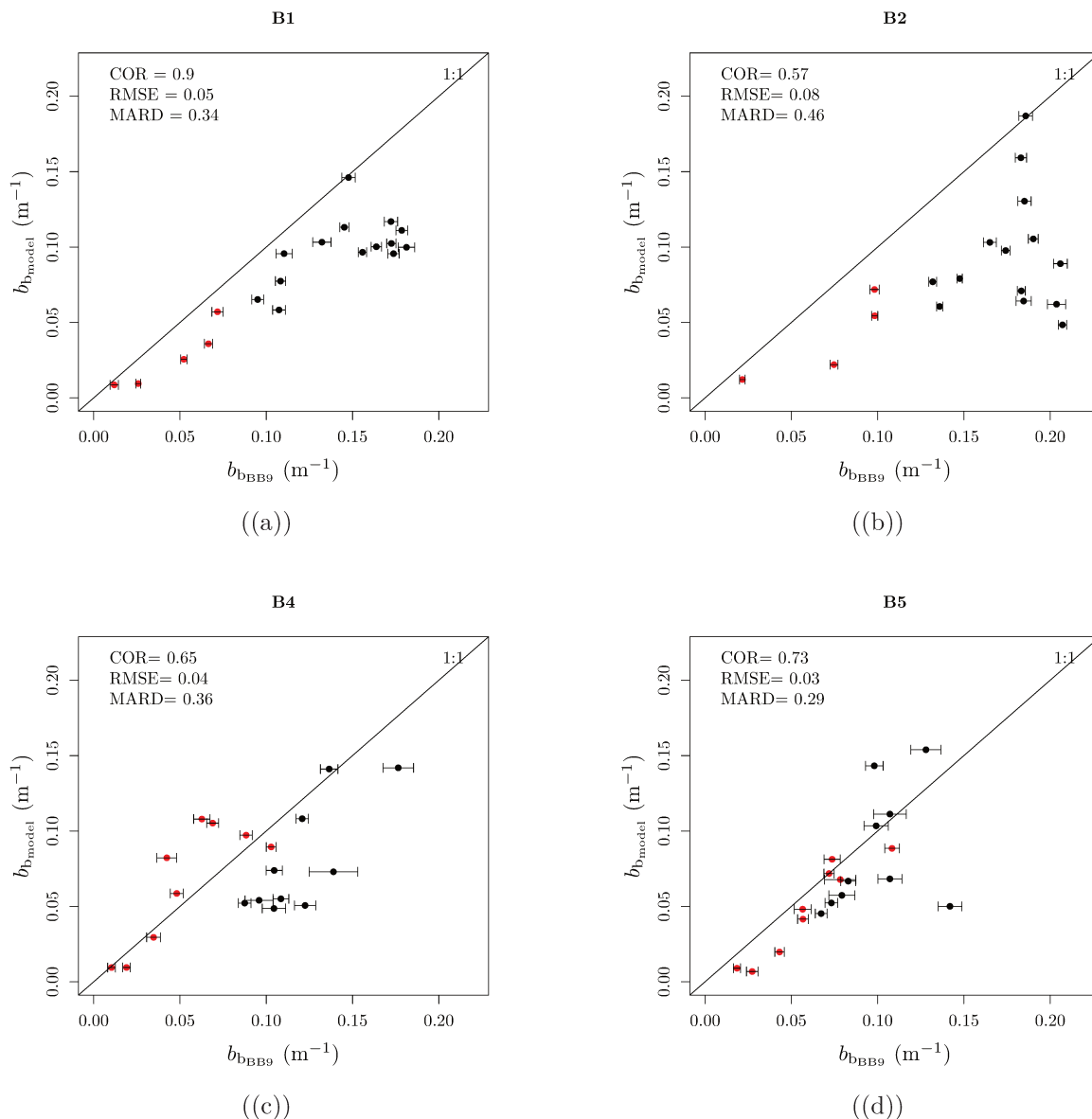


FIGURE 7.6 – Coefficient de rétrodiffusion mesuré avec l’ECO-BB9 ($b_{b_{\text{BB9}}}$) en fonction du coefficient de rétrodiffusion modélisé ($b_{b_{\text{model}}}$) pour les bacs de THAL (B1 et B2) et CHLAM (B4 et B5). Les points en rouge correspondent aux valeurs mesurées et modélisées durant la phase exponentielle. La ligne noire est la droite 1 :1. Les barres d’erreurs représente la déviation standard autour de la moyenne des mesures ECO-BB9.

indice de réfraction de $1,04 + i0,0001$. La distribution en taille des particules (PSD) est une fonction gamma à deux paramètres avec respectivement un rayon et une variance effective de $0,265 \mu\text{m}$ et $0,13$ (Stramski and Kiefer, 1991). La valeur calculée de $\sigma_{b_b}(\text{bact})$ est de $7,8264 \times 10^{-16} \text{ m}^2$. Le coefficient de rétrodiffusion du phytoplancton ($b_b(\text{phyto})$) et des cellules en dégénérescence ($b_b(\text{dege})$) a été calculé en multipliant $\tilde{\sigma}_{b_b}(\text{phyto})$ ou $\tilde{\sigma}_{b_b}(\text{dege})$, obtenue à partir de la mesure Cytosense, par leur abondance respective ($N(\text{phyto})$ ou

$N(\text{dege})$). Le coefficient de rétrodiffusion total modélisé, nommé b_{bmodel} , est obtenu en ajoutant $b_{\text{b}}(\text{bact})$, $b_{\text{b}}(\text{phyto})$ et $b_{\text{b}}(\text{dege})$ (Fig. 7.5).

La figure 7.6 compare le coefficient de rétrodiffusion (b_{bp}) obtenu à partir de l'ECO-BB9 à 488 nm (nommé b_{bBB9}) avec celui modélisé (nommé b_{bmodel}). Le coefficient de rétrodiffusion modélisé est reconstruit à partir des mesures Cytosense et FACSCalibur pour chaque jour de l'expérience. Afin de comparer les valeurs mesurées (b_{bBB9}) et modélisées (b_{bmodel}), l'erreur quadratique moyenne (RMSE) et la différence relative moyenne absolue (MARD) ont été utilisées comme indicateurs statistiques :

$$RMSE = \left[\frac{1}{N_m} \sum_{i=1}^N (P_i - M_i)^2 \right]^{1/2}, \quad (7.1)$$

$$MARD = \frac{1}{N_m} \sum_{i=1}^N \frac{|P_i - M_i|}{M_i}, \quad (7.2)$$

avec, N_m est le nombre de mesures dans le jeu de données, M_i et P_i sont, respectivement, les valeurs mesurées (b_{bBB9}) et prédites (b_{bmodel}). Pour THAL et CHLAM, la RMSE, la MARD et le coefficient de corrélation (COR) ont été calculés pour deux valeurs de $\chi_p(124^\circ)$ (Table 7.2). Pour rappel, le facteur $\chi_p(124^\circ)$ est utilisé pour relier la valeur mesurée de $\beta(124^\circ)$ au coefficient de rétrodiffusion (b_{bBB9}) (Eq. (3.4)). Ainsi, l'estimation de b_{bBB9} est dépendante de la valeur du $\chi_p(124^\circ)$ utilisée. Dans le cadre de notre expérience, il semble que les résultats sont similaires pour les deux valeurs de $\chi_p(124^\circ)$ testée. En effet, le COR, la RMSE et la MARD sont comparables pour un $\chi_p(124^\circ)$ de 0,9 (Sullivan et al., 2005) et un $\chi_p(124^\circ)$ de 1,076 (Sullivan et al., 2013). En considérant un $\chi_p(124^\circ)$ de 0,9 la COR, la RMSE et la MARD étaient, en moyenne, respectivement, de 0,74 ; 0,07 et 0,40 pour THAL, et de 0,69 ; 0,04 et 0,33 pour CHLAM (Table 7.2).

Pour les deux espèces, les écarts entre le b_{bmodel} et le b_{bBB9} peuvent être expliqués par (i) des événements de diffusions multiples, (ii) la non prise en compte de petites particules (e.g., détrit), (iii) des erreurs sur les estimations de $b_{\text{b}}(\text{bact})$, $b_{\text{b}}(\text{phyto})$ et $b_{\text{b}}(\text{dege})$ et

(iii) des incertitudes sur les mesures ECO-BB9.

Premièrement, selon Piskozub and McKee (2011), la diffusion multiple tend à augmenter la rétrodiffusion, et donc le b_{BB9} . Le $b_{b_{model}}$ n'est pas impacté par la diffusion multiple, ce qui peut induire des valeurs plus basses par rapport aux mesures de b_{BB9} . Deuxièmement, comme explicité dans la section 7.4, le signal de diffusion de quelques petites particules non fluorescentes (comme des détritiques, des virus) peut être faible et inclus dans le bruit instrumental du Cytosense (Thyssen et al., 2014). Par conséquent, de telles particules ne sont pas détectées et leur contribution au $b_{b_{model}}$ n'est pas comptabilisée. En considérant une valeur de $\sigma_{b_b(488)(det)}$ de $2,9046 \times 10^{-18} \text{ m}^2$ (Stramski et al., 2001), en moyenne, une abondance de $1,37 \times 10^{16}$ particules par mètre cube est nécessaire afin d'obtenir une reconstruction complète du b_{BB9} pour B1 (unique cas où nous avons une sous-estimation globale). Cette abondance est élevée par rapport à la valeur supposée par Stramski et al. (2001) qui était de $8,25 \times 10^{13}$. Troisièmement, le coefficient de rétrodiffusion des cellules phytoplanctoniques est obtenu en convertissant le σ_{SSC} en σ_{b_b} (Eq. (4.14)) (section 4.5). Les deux espèces étant structurellement différentes (présence d'une paroi de silice pour THAL), il pourrait être plus adéquat d'utiliser une paramétrisation spécifique à l'espèce (Table 4.8). Ainsi, afin d'étudier l'impact de l'Eq. (4.14) sur les écarts, les paramétrisations développées à partir de simulations considérant uniquement le modèle $80\%_{cyt}-20\%_{chl}$ et le modèle $80\%_{cyt}-18,625\%_{chl}-1,375\%_{Si}$ avec un $m(Si)$ de $1,07 + i0,0001$ ont été testées. Notons que le modèle à trois couches a uniquement été testé pour THAL. Les résultats ont montré que le $b_b(\text{phyto})$ estimé peut varier jusqu'à un facteur 1,75 lorsque la paramétrisation change. Cependant, ce n'est pas suffisant pour réduire significativement les écarts entre b_{BB9} et $b_{b_{model}}$. Par exemple, pour THAL, lorsque la paramétrisation basée sur le modèle $80\%_{cyt}-18,625\%_{chl}-1,375\%_{Si}$ est utilisée, le COR, la RMSE et la MARD changent uniquement pour B2. Ils deviennent, respectivement, 0,57, 0,08 et 0,45. Le faible impact de la paramétrisation est dû à la faible contribution du $b_b(\text{phyto})$ au $b_{b_{model}}$. Le $b_b(\text{bact})$ est considérablement influencé par l'indice de réfraction réel. Stramski and Kiefer (1991) recommandent un indice de réfraction réel pour les bactéries entre 1,04 et 1,07. À cause de la forte contribution de $b_b(\text{bact})$ due à son abondance élevée, une variation de $\sigma_{b_b}(\text{bact})$,

TABLE 7.2 – Valeurs du coefficient de corrélation (COR), de l’erreur quadratique moyenne (RMSE) et de la différence relative moyenne absolue (MARD) entre le $b_{b_{\text{model}}}$ et le $b_{b_{\text{BB9}}}$ qui est calculé à partir de l’Eq. (3.4) en utilisant un $\chi_p(124^\circ)$ de 0,9 et 1,076.

		$\chi_p(124^\circ) = 0,9$			$\chi_p(124^\circ) = 1,076$		
		COR	RMSE	MARD	COR	RMSE	MARD
THAL	B1	0,9	0,05	0,34	0,9	0,07	0,45
	B2	0,57	0,08	0,46	0,57	0,11	0,55
CHLAM	B4	0,65	0,04	0,36	0,65	0,05	0,39
	B5	0,73	0,03	0,29	0,73	0,04	0,35

impacte grandement le $b_{b_{\text{model}}}$. C’est pourquoi la sous-estimation globale de $b_{b_{\text{model}}}$ pour THAL peut être réduite en modulant m_r . Nous avons simulé $\sigma_{b_b}(\text{bact})$ pour des valeurs de m_r allant de 1,04 à 1,07. Les plus petites différences entre $b_{b_{\text{model}}}$ et $b_{b_{\text{BB9}}}$ sont obtenues avec un indice de réfraction de 1,05. Lorsqu’un m_r de 1,05 est utilisé à la place de 1,04, $\sigma_{b_b}(\text{bact})$ augmente et vaut $1.26 \times 10^{-15} \text{ m}^2$. Ainsi, le COR, la RMSE et la MARD deviennent, respectivement, 0,91, 0,02 et 0,17 pour B1, et 0,59, 0,06 et 0,29 pour B2. Enfin, nous avons écarté l’hypothèse d’un écart causé par des incertitudes de mesures de l’ECO BB9. En effet, les écarts entre $b_{b_{\text{BB9}}}$ et $b_{b_{\text{model}}}$ semblent trop élevés pour être en partie imputable à une incertitude sur la mesure ECO-BB9. Lors d’une comparaison entre ECO-BB à 462 nm (WET Labs, Inc.) et un Hydrosat (HOBI Labs, Inc.) à 470 nm (longueurs d’onde les plus proches entre les deux capteurs), Twardowski et al. (2007) ont trouvé une concordance d’environ 4 % entre les deux instruments. Un écart sur la mesure ECO-BB9 de -4 % modifie que très faiblement les résultats statistiques. Par exemple, le COR, la RMSE et la MARD deviennent, respectivement, 0,9, 0,04 et 0,32 pour B1, et 0,64, 0,08 et 0,46 pour B2.

7.6 Contribution des différents compartiments au $b_{b_{\text{model}}}$

La figure 7.7 montre la contribution de $b_b(\text{bact})$, $b_b(\text{phyto})$ et $b_b(\text{dege})$ au $b_{b_{\text{model}}}$ pour chaque jour de l’expérience. La contribution moyenne, calculée sur les bacs B1-B2 et B4-B5, de $b_b(\text{bact})$, $b_b(\text{phyto})$ et $b_b(\text{dege})$ au $b_{b_{\text{model}}}$, varie entre 84%-88%, 10%-16% et

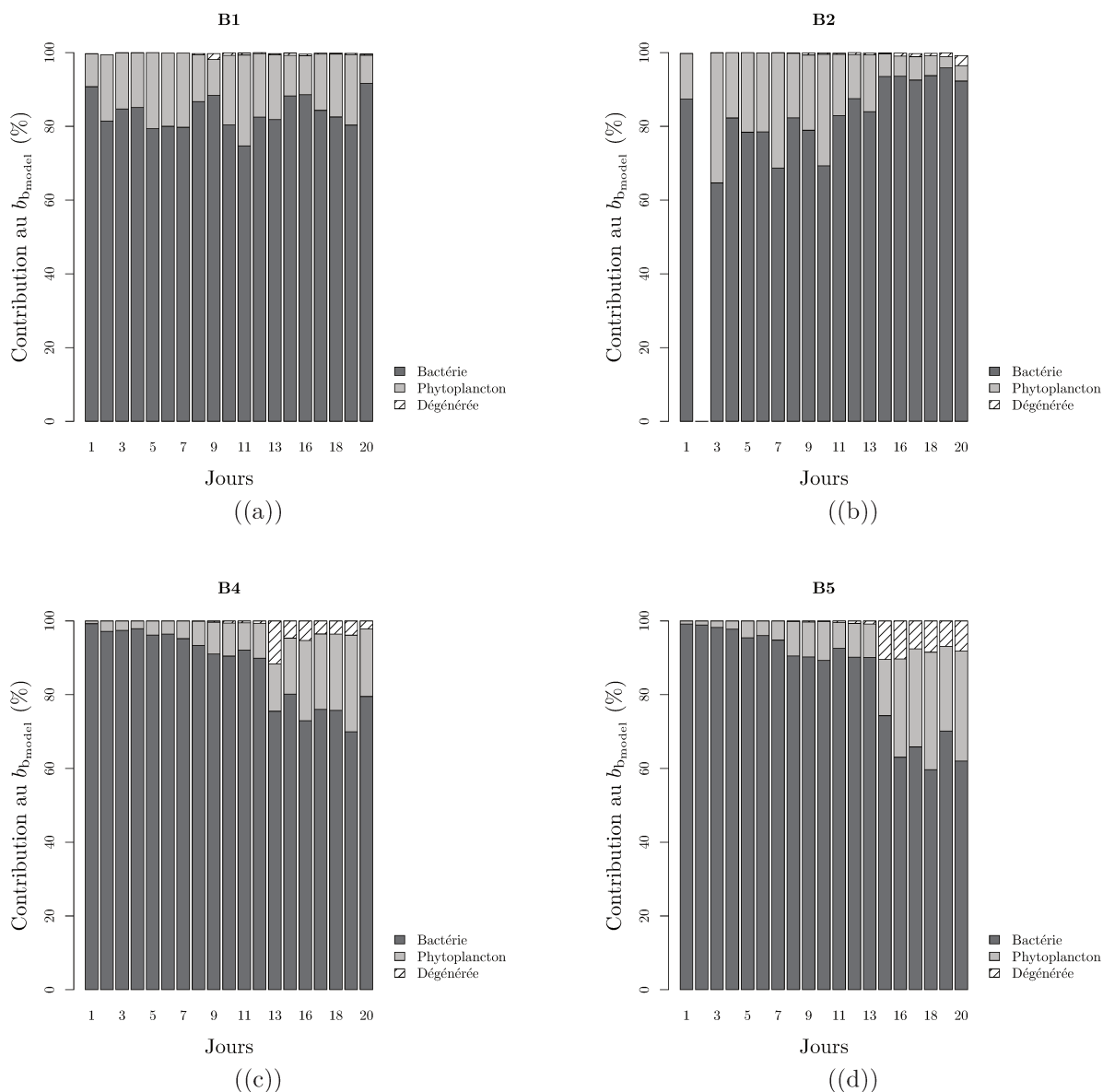


FIGURE 7.7 – Contribution (%) des bactéries hétérotrophes (zone noire), des cellules phytoplanctoniques (zone grise) et dégénérées (zone hachurée) au coefficient de rétro-diffusion modélisé ($b_{b_{\text{modél}}}$) pour les bacs de THAL (B1 et B2) et CHLAM (B4 et B5).

0,5%-3%. Il est important de souligner que, pour certains jours de l'expérience, la contribution du $b_b(\text{phyto})$ et $b_b(\text{dege})$ au $b_{b_{\text{modél}}}$ peut aller jusque $\approx 35\%$ (e.g., B2-J3;) et $\approx 10\%$ (e.g., B4-J13; B5-J15) alors que l'abondance en cellules phytoplanctoniques et dégénérées ne représente, respectivement, pas plus de 1,3 % et 2 % de l'abondance totale.

Notons que, sur l'ensemble de l'expérience, la contribution des bactéries est assez élevée par rapport aux études précédentes (Martinez-Vicente et al., 2012, Dupouy et al., 2003). Rappelons que, contrairement à notre étude, Martinez-Vicente et al. (2012) utilisaient des

valeurs de tailles et de Q_{b_b} constantes, issues de la littérature (voir la liste de références dans Martinez-Vicente et al. (2012)), pour chaque type de particule. Ainsi, la valeur σ_{b_b} était obtenue à partir de l'Eq. (1.15). Ils ont effectué des mesures *in-situ* avec deux cytomètres de flux (Beckton Dickinson FACSort et FACScan) afin de quantifier l'abondance des cellules de phytoplancton et des bactéries. Ils ont montré que $b_b(\text{bact})$ contribuait, en moyenne, à hauteur de 56 % au b_b total. Dupouy et al. (2003) ont utilisé une approche similaire en utilisant un cytomètre en flux FACScan pour quantifier l'abondance phytoplanctonique. Les bactéries étaient énumérées et analysées par cytométrie en flux avec un Coulter EPICS 753. Cependant, contrairement à Martinez-Vicente et al. (2012), les sections efficaces de rétrodiffusion provenaient de simulations basées sur la théorie de Mie. Les résultats ont montré que $b_b(\text{bact})$ représentait 73% de la rétrodiffusion en incluant la rétrodiffusion des bactéries, *Synechococcus*, *Prochlorococcus*, *Thalassiosira pseudonana* et *Dunaliella tertiolecta* pour les nanoeucaryotes.

Nous avons recalculé les différentes contributions en exploitant uniquement les abondances phytoplanctoniques et bactériennes estimées par les deux cytomètres. Les abondances ont été multipliées par des valeurs d'efficacité de rétrodiffusion et de taille mesurée par Vaillancourt et al. (2004) afin d'obtenir le coefficient de rétrodiffusion des bactéries et des cellules phytoplanctoniques.

Pour les deux bacs de THAL, nous avons obtenu une contribution moyenne du $b_b(\text{bact})$ de 83%. Ainsi, la forte proportion en bactéries observée durant l'expérience n'était pas due à une différence de méthode. Malheureusement, comme aucune valeur d'efficacité de rétrodiffusion n'a été trouvée dans la littérature pour CHLAM, l'exercice de comparaison a été seulement réalisé pour THAL.

La table 7.3 présente les coefficients de corrélation obtenus entre $b_{b_{model}}$, $b_b(\text{bact})$, $b_b(\text{phyto})$, $b_b(\text{dege})$ et le $b_{b_{BB9}}$ calculés sur l'ensemble de l'expérience, pour la phase exponentielle et hors exponentielle. Pour THAL et CHLAM, nous observons que les résultats sont similaires à ceux observés dans la section 7.4. En effet, durant la phase exponentielle, de forts coefficients de corrélation sont obtenus entre le $b_{b_{model}}$ et le $b_{b_{BB9}}$ pour THAL ($R^2 = 0,76$) et CHLAM ($R^2 = 0,67$). De plus, si l'on considère les compartiments indépendamment

TABLE 7.3 – Coefficients de corrélation (R^2) entre le coefficient de rétrodiffusion mesuré ($b_{b_{BB9}}$) et ceux modélisés pour l'ensemble des compartiments ($b_{b_{model}}$), pour les bactéries hétérotrophes ($b_b(\text{bact})$), pour les cellules phytoplanctoniques ($b_b(\text{phyto})$) et pour les cellules en dégénérescence ($b_b(\text{dege})$). La RSE représente l'erreur type relative (%) et N le nombre de jours.

		Phases					
		Toute		Expo		Hors Expo	
		R^2 (RSE)	N	R^2 (RSE)	N	R^2 (RSE)	N
THAL	$b_{b_{model}}$	0,53 (0,04)	38	0,76 (0,02)	10	0,05 (0,03)	28
	$b_b(\text{bact})$	0,57 (0,03)	38	0,73 (0,02)	10	0,1 (0,03)	28
	$b_b(\text{phyto})$	0,12 (0,05)	37	0,81 (0,01)	9	0,04 (0,03)	28
	$b_b(\text{dege})$	0,03	26	∅	∅	0,03 (0,03)	26
CHLAM	$b_{b_{model}}$	0,45 (0,03)	38	0,67 (0,02)	18	0,26 (0,02)	20
	$b_b(\text{bact})$	0,33 (0,03)	38	0,63 (0,02)	18	0,26 (0,02)	20
	$b_b(\text{phyto})$	0,49 (0,03)	38	0,86 (0,01)	18	0,07 (0,03)	20
	$b_b(\text{dege})$	0,11 (0,03)	33	0,76 (0,01)	13	∅	20

en phase exponentielle, des relations linéaires fortes relient le $b_b(\text{phyto})$ au $b_{b_{BB9}}$ pour THAL ($R^2 = 0,81$) et CHLAM ($R^2 = 0,86$). Ainsi, en phase exponentielle, le $b_b(\text{phyto})$ est une valeur prédictive du $b_{b_{BB9}}$. Cependant, hors phase exponentielle les coefficients de corrélation sont beaucoup plus faibles. En effet, comme cela a été détaillé dans la section précédente : des événements de diffusions multiples et la non prise en compte de quelques petites particules (e.g., détritrus) peuvent expliquer ces résultats.

Nous soulignons que, sur l'ensemble de l'expérience, le $b_b(\text{bact})$ est le meilleur prédicteur du $b_{b_{BB9}}$ pour THAL ($R^2 = 0,57$). Cependant, pour CHLAM, malgré la forte contribution du compartiment bactérien, la relation la plus forte est obtenue entre le $b_b(\text{phyto})$ et $b_{b_{BB9}}$ ($R^2 = 0,49$). Il n'est pas surprenant d'obtenir de meilleurs coefficients de corrélation entre $b_{b_{BB9}}$ et le $b_b(\text{bact})$ pour THAL. En effet l'abondance bactérienne est prédominante. Cependant, pour CHLAM, il semble que la section efficace de rétrodiffusion des cellules phytoplanctoniques joue un rôle prédominant dans la mesure où l'abondance phytoplanctonique représente, en moyenne, $\sim 0,2\%$ de l'abondance totale pour CHLAM.

TABLE 7.4 – Coefficients de corrélation (R^2) entre la concentration en POC et le coefficient de rétrodiffusion mesuré ($b_{b_{BB9}}$), modélisés pour l'ensemble des compartiments ($b_{b_{model}}$), pour les bactéries hétérotrophes ($b_b(\text{bact})$), pour les cellules phytoplanctoniques ($b_b(\text{phyto})$) et pour les cellules en dégénérescence ($b_b(\text{dege})$). La RSE représente l'erreur type relative (%) et N le nombre de jours.

		Phases					
		Toute		Expo		Hors Expo	
	POC	R^2 (RSE)	N	R^2 (RSE)	N	R^2 (RSE)	N
THAL	$b_{b_{BB9}}$	0,9 (1726)	21	0,85 (1088)	8	0,49 (1519)	13
	$b_{b_{model}}$	0,7 (2989)	21	0,94 (704)	8	0,09 (2019)	13
	$b_b(\text{bact})$	0,8 (2768)	21	0,92 (788)	8	0,1 (2019)	28
	$b_b(\text{phyto})$	0,3 (4773)	21	0,86 (1043)	8	0	13
	$b_b(\text{dege})$	0,03 (2116)	26	∅	∅	0	13
CHLAM	$b_{b_{BB9}}$	0,8 (5438)	20	0,89 (2077)	12	0 (3818)	8
	$b_{b_{model}}$	0,3 (9391)	20	0,73 (3216)	12	0,06 (3700)	8
	$b_b(\text{bact})$	0,1 (10330)	20	0,69 (3477)	12	0,1 (3650)	8
	$b_b(\text{phyto})$	0,9 (3959)	20	0,97 (1015)	12	0,29 (3221)	8
	$b_b(\text{dege})$	0,38 (8313)	17	0,82 (2707)	9	0	8

7.7 Analyse des relations POC vs. $b_{b_{bp}}$

Ayant étudié l'origine des variations du coefficient de rétrodiffusion à différents stades de croissance, il est maintenant possible d'étudier l'origine des variations dans les relations entre la concentration en POC et le coefficient de rétrodiffusion. La table 7.4 présente, selon différentes périodes, le coefficient de corrélation entre le POC et $b_{b_{model}}$, $b_b(\text{bact})$, $b_b(\text{phyto})$, $b_b(\text{dege})$ et $b_{b_{BB9}}$. Si nous considérons seulement la phase exponentielle, des relations linéaires fortes lient le POC au $b_{b_{model}}$ et au $b_{b_{BB9}}$ (Table 7.4) pour THAL ($R^2 = 0,94$) et CHLAM ($R^2 = 0,73$). Les meilleurs prédicteurs du POC sont, respectivement, le $b_b(\text{bact})$ pour THAL ($R^2 = 0,92$) et le $b_b(\text{phyto})$ pour CHLAM ($R^2 = 0,97$). Cette tendance est aussi observée sur l'ensemble de l'expérience. Ainsi, pour THAL, les bactéries seraient la source dominante de POC, et pour CHLAM, soit le phytoplancton est la source dominante de POC, soit la quantité de particules non algales covarie avec l'abondance phytoplanctonique. Les relations POC vs. b_b semblent donc expliquées par deux

assemblages différents pour THAL et CHLAM. Cette observation pourrait expliquer la pente plus élevée observée pour CHLAM dans la figure 7.4. Les contenus en POC.cell⁻¹ et les propriétés optiques des cellules phytoplanctoniques sont différents de celles des bactéries hétérotrophes. Ainsi, ces différences optiques et biogéochimiques pourraient être à l'origine des variations de pentes observées entre THAL et CHLAM. Par exemple, le POC.cell⁻¹, plus important pour des cellules phytoplanctoniques que pour les bactéries (Menden-Deuer and Lessard, 2000), pourrait être à l'origine de la plus forte pente observée pour les bacs de CHLAM.

Cependant, en dehors de cette phase, il n'existe plus de relations entre la concentration en POC et le coefficient de rétrodiffusion mesuré ou modélisé pour THAL et CHLAM. Durant cette période, nous observons une forte variation du $b_{b_{\text{model}}}$ par rapport au POC. Pour THAL et CHLAM, le $b_{b_{\text{model}}}$ varie, respectivement, jusqu'à un facteur 3,2 et 2,9 alors que le POC varie, respectivement, d'un facteur 1,88 et 1,47. Concernant THAL, comme explicité dans la section 7.4, aucune abondance d'un compartiment spécifique ne semble capable d'expliquer les variations du coefficient de rétrodiffusion. Ainsi, la variation du coefficient de rétrodiffusion peut être due à un effet de diffusion multiple, à une formation d'agrégats, à des variations de la section efficace de rétrodiffusion ou à un changement de concentration des différents compartiments de l'assemblage particulière. Concernant CHLAM, la perte de linéarité semble principalement due à une chute du coefficient de rétrodiffusion. Le $b_{b_{\text{model}}}$ est, en moyenne, égal à 0,84 et 0,57 m^{-1} respectivement durant la phase exponentielle et hors exponentielle. Comme le montre la figure 7.3, une telle diminution est liée à la chute de l'abondance bactérienne. En effet, le $b_b(\text{bact})$ contribue, en moyenne, à 96 % et 79% du $b_{b_{\text{model}}}$ respectivement durant la phase exponentielle et hors phase exponentielle (Fig. 7.7). Ainsi, le coefficient de rétrodiffusion diminue alors que la concentration en POC, qui est principalement d'origine phytoplanctonique, continue à augmenter.

7.8 Conclusions et perspectives

La relation entre la concentration en POC et le coefficient de rétrodiffusion a été analysée pour THAL et CHLAM au cours de différentes phases de croissance. Différentes relations linéaires ont pu être établies pour chaque espèce. Afin d'étudier l'origine des différentes relations, une analyse du coefficient de rétrodiffusion a été effectuée. Nous soulignons l'importance de considérer la phase de croissance lors de l'analyse du coefficient de rétrodiffusion. En effet, des relations linéaires fortes entre l'abondance et le $b_{b_{BB9}}$ ont seulement pu être établies lors de la phase exponentielle. En dehors de cette phase, aucune corrélation n'a pu être identifiée entre l'abondance et le $b_{b_{BB9}}$. Ces faibles coefficients de corrélation pouvaient être dus à un effet de diffusion multiple, à la non prise en compte de l'abondance détritique, à une formation d'agrégats, à des variations de la section efficace de rétrodiffusion (suite à une modification morphologique et/ou intracellulaire) ou à un changement de concentration des différents compartiments de l'assemblage particulière. Le coefficient de rétrodiffusion a été reconstruit en couplant les données de deux cytomètres en flux (Cytosense et FACSCalibur) avec des simulations de diffusion simple. Le coefficient de rétrodiffusion modélisé ($b_{b_{model}}$) a été comparée avec le $b_{b_{BB9}}$. La MARD moyenne pour les 2 bacs de THAL et CHLAM était, respectivement, de 0,4 et 0,33. La reconstruction du b_{bp} a permis de mettre en évidence la forte contribution du compartiment bactérien au $b_{b_{model}}$ (contribution moyenne d'environ 86%). Sur l'ensemble de l'expérience, malgré l'importante contribution du compartiment bactérien, un plus fort coefficient de corrélation a été observé entre le $b_b(\text{phyto})$ et le $b_{b_{model}}$ pour CHLAM. Par ailleurs, lors de la phase exponentielle, une relation linéaire forte a pu être établie entre le $b_b(\text{phyto})$ et le $b_{b_{model}}$ pour les deux espèces ($\sim 0,84$). Ces observations mettent clairement en évidence l'importance de la section efficace de rétrodiffusion des cellules phytoplanctoniques qui représentent pourtant moins de 3 % de l'abondance totale. Cependant, les faibles coefficients de corrélation entre le coefficient de rétrodiffusion modélisé et celui mesuré, obtenus sur le reste de l'expérience, montrent les limites de notre modèle. Hors phase exponen-

tielle, outre, de potentiels événements de diffusions multiples, ne pas prendre en compte les particules détritiques dans le modèle et ne considérer qu'une valeur de section efficace de rétrodiffusion pour les bactéries peuvent constituer une limitation. En effet, compte tenu de la forte contribution du $b_b(\text{bact})$, une estimation plus précise de la section efficace de rétrodiffusion des bactéries est indispensable pour une reconstruction précise du b_{bp} . Pour ce faire, nous pourrions effectuer une calibration du FACSCalibur afin d'obtenir la section efficace de côté de la même manière qu'elle est obtenue avec le Cytosense. Il faudrait ensuite utiliser, comme pour les cellules phytoplanctoniques, une relation théorique pour convertir le σ_{SSC} en σ_{bb} . Ainsi, une paramétrisation pourrait être utilisée afin d'éviter toute supposition concernant la section efficace de rétrodiffusion des bactéries.

Enfin, suite à l'analyse du coefficient de rétrodiffusion, la relation POC vs. $b_{b_{\text{model}}}$ a été analysée. Les résultats ont montré que la relation linéaire entre le POC et le $b_{b_{\text{model}}}$ s'établissait uniquement en phase exponentielle. Des résultats similaires sont observés entre le POC et le $b_{b_{BB9}}$. Durant cette phase, il a été mis en évidence, que le POC était principalement d'origine bactérienne pour THAL. Cependant, pour CHLAM, soit le POC était principalement d'origine phytoplanctonique, soit la quantité de particules non algales covariait avec l'abondance en phytoplancton. Ainsi, la différence de pente entre les bacs de THAL et de CHLAM semble être due aux différences de propriétés optiques et/ou de contenu en POC entre les cellules bactériennes et les cellules phytoplanctoniques. La variabilité observée autour de la relation établie pour THAL pourrait être due à un effet de diffusion multiple, à une formation d'agrégats, à une variation des sections efficaces de rétrodiffusion ou bien à une variation de la concentration des différents compartiments. Concernant CHLAM, la perte de linéarité entre la phase exponentielle et hors exponentielle semble principalement due à une chute de l'abondance bactérienne. Ainsi, la variabilité autour de la relation, hors phase exponentielle, serait principalement due à une variation de la concentration des différents compartiments.

Il paraît évident qu'une seule relation ne pourra jamais représenter toute la variabilité observée dans le milieu marin. De plus, la non linéarité entre le POC et le $b_{b_{BB9}}$, en dehors de la phase exponentielle, met en évidence que la variabilité autour des relations POC

vs. b_{bp} peut varier selon la phase de croissance analysée. Dans des études futures, nous conseillons, tout comme Reynolds et al. (2016), d'effectuer une classification préalable du type d'eau à analyser. Cette classification permettra d'intégrer des variations potentielles de l'assemblage à analyser. Dans ce contexte, le cytomètre pourrait être utilisé afin d'effectuer une classification optique des différents types d'eau.

Avant toute chose, il est important d'analyser les détritiques de façon à obtenir des informations sur ce compartiment (abondance et idéalement la section efficace de diffusion de côté). Pour ce faire, la méthode de "l'exclusion par colorant" est appropriée car elle permet de faire une distinction entre les cellules vivantes et non vivantes. La membrane cellulaire des cellules mortes est perméable au SYTOX vert alors que la membrane des cellules vivantes ne l'est pas (Veldhuis et al. (1997, 2001)). Il en résulte que le compartiment détritique pourrait être identifié en utilisant la fluorescence induite par le SYTOX vert (émission maximale à environ 530 nm). Cependant, un examen préalable de l'impact du colorant fluorescent sur le signal latéral est indispensable. Si le colorant injecté n'a qu'une influence négligeable sur la diffusion des particules, la section efficace de rétrodiffusion pourra être obtenue à partir des mesures Cytosense comme pour le phytoplancton. Si non, le Cytosense sera utilisé pour quantifier uniquement l'abondance de détritiques. Ensuite, le coefficient de rétrodiffusion des détritiques sera estimé en multipliant l'abondance des détritiques par la valeur de $\sigma_{bb}(\text{det})$ référencée par Stramski et al. (2001).

QUATRIÈME PARTIE

Conclusions et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'impact de la morphologie et de l'hétérogénéité des cellules phytoplanctoniques sur le signal rétrodiffusé ne fait, à l'heure actuelle, plus aucun doute. Cependant, l'influence des variations morphologiques et intra-cellulaires sur la rétrodiffusion, selon les espèces et au sein même d'une espèce au cours des différentes phases de croissance ou bien selon les conditions environnementales (e.g. la luminance, la température, etc), est difficilement observable et quantifiable par le biais de mesures "bulk". En effet, ces mesures étant impactées par l'ensemble des constituants optiquement significatifs, l'analyse spécifique d'un compartiment particulière (e.g. phytoplanctonique) est difficile. Le Cytosense est un instrument optique qui a spécialement été conçu pour analyser individuellement les particules de type phytoplanctonique. Ainsi, les mesures effectuées par le Cytosense sur les particules individuelles apparaissent comme un moyen d'aller au-delà de l'information totale ("bulk") et d'analyser les propriétés de diffusion du compartiment phytoplanctonique.

Dans la première partie de cette étude, la méthode de Duforêt-Gaurier et al. (2015) a été appliquée, pour la première fois, sur deux cultures de phytoplancton morphologiquement différentes : *Thalassiosira pseudonana* et *Chlamydomonas concordia*. Ainsi, à partir des mesures Cytosense, nous avons estimé les sections efficaces et les efficacités de diffusion avant, de côté et de rétrodiffusion des deux espèces. Dans un premier temps, il était primordial de vérifier la validité de la paramétrisation pour des particules non sphériques avec une orientation fixe. Pour rappel, le signal diffusé par ce type de particules peut être impacté par la polarisation. Par le biais de simulations de diffusion simple, il a été montré que seul le signal diffusé par les particules ne possédant pas de plan de symétrie est affecté par la polarisation. Cependant, la paramétrisation reste valide dans la mesure

où l'impact de la polarisation ne dépasse pas la variabilité autour de la paramétrisation globale. Dans un deuxième temps, comme aucune valeur *in situ* n'est référencée pour les particules individuelles, les estimations des sections efficaces avant et de côté ont été comparées avec des simulations de diffusion simple considérant les particules comme des sphères composées de une, deux ou trois couches. En moyenne, plus de 92 % des estimations du Cytosense sont englobées par les valeurs simulées. La présence d'agrégats ou bien une légère sous-estimation de la méthode peut expliquer la partie non retrouvée par les simulations. Enfin, pour *Thalassiosira pseudonana*, il a été montré que les estimations des sections efficaces et des efficacités de rétrodiffusion étaient du même ordre de grandeur que les valeurs déduites de mesures "bulk" référencées par Vaillancourt et al. (2004).

Le temps consacré à la prise en main des différents codes de diffusion simple utilisés durant cette thèse a été conséquent. Il est important de noter que les codes T-Matrix et GMM, permettant de simuler les propriétés optiques des particules non sphériques (cylindres, sphéroïdes et agrégats) en orientation fixe, n'ont que rarement été utilisés dans le cadre de l'optique marine. Définir l'orientation des particules par rapport au repère du laboratoire a demandé une caractérisation précise du problème physique (e.g. direction d'incidence, orientation de l'axe de symétrie des particules, etc). En effet, les conventions utilisées dans les différents codes ne sont pas toujours clairement définies dans les publications. Par ailleurs, le choix des modèles et des indices de réfraction complexes à utiliser afin de considérer, au mieux, la structure et les propriétés optiques des cellules phytoplanctoniques a demandé un travail bibliographique important.

L'efficacité étant le ratio de la section efficace avec la section géométrique de la particule, une estimation précise de taille est primordiale. À l'avenir, afin d'estimer plus précisément les efficacités de diffusion (égales au rapport entre la section efficace et la section géométrique), il serait possible d'améliorer l'estimation de la taille effectuée par le Cytosense en utilisant la méthode de Dugenne et al. (2014). En effet, Dugenne et al. (2014) ont montré, pour des particules plus larges que celles analysées, durant cette thèse, une corrélation entre le signal diffusé de côté mesuré par le Cytosense et le biovolume des

cellules. Lors de cette étude, les images fournies par le cytomètre ont été utilisées afin d'estimer le biovolume qui peut être relié aux diamètres des cellules. Une amélioration de l'estimation de la taille permettrait de réduire les biais observés dans l'estimation de la taille pour les particules les plus excentriques (chapitre 5) et ainsi, d'estimer plus précisément les efficacités de diffusion.

Dans la continuité de cette première étude, la méthode de Duforêt-Gaurier et al. (2015) a été utilisée afin d'analyser les propriétés optiques des cellules phytoplanctoniques, causée par des variations morphologiques et intracellulaire (e.g. épaisseur de la paroi de silice de *Thalassiosira pseudonana*), au cours de différentes phases de croissance (exponentielle, stationnaire et de sénescence). Ce travail a fait l'objet du chapitre 6. Les efficacités de diffusion avant et de côté ont été analysées pour *Thalassiosira pseudonana* et *Chlamydomonas concordia* durant les 20 jours d'expérience. En moyenne, les efficacités de diffusion avant et de côté de *Thalassiosira pseudonana* étaient, respectivement 2,2 et 1,6 fois plus importantes que les efficacités de *Chlamydomonas concordia*. Pour les deux espèces, nous avons observé une variation des efficacités de diffusion avant, de côté et de rétrodiffusion selon les phases de croissance. Ainsi, lors d'analyses des propriétés de diffusion d'une espèce, il est primordial d'identifier et de spécifier la phase de croissance. En effet, les résultats obtenus lors d'une phase de croissance spécifique ne peuvent pas être généralisés. Cette conclusion met en évidence l'avantage d'utiliser les mesures Cytosense par rapport aux mesures totales. En effet, le Cytosense permet d'analyser les propriétés optiques de diffusion d'une espèce phytoplanctonique donnée au cours de différentes phases de croissance. L'efficacité de diffusion avant est impactée par l'agrégation de particules et par la taille des particules. La plus forte efficacité de diffusion de côté observée pour *Thalassiosira pseudonana* ne semble pas être due à la présence d'une paroi de silice. En effet, les simulations théoriques ont montré que la paroi de silice n'augmente pas significativement l'efficacité de côté. Cependant, la présence d'une paroi modifie l'allure de la courbe qui décrit l'efficacité en fonction du diamètre. Les variations intra- et inter-espèces de l'efficacité de diffusion de côté semblent principalement dues à une variation de l'indice réel de réfraction du chloroplaste. L'indice de réfraction réel du chloroplaste étant un paramètre

clé, un modèle à deux couches (cytoplasme-chloroplaste) semble approprié pour représenter les cellules phytoplanctoniques. Des conclusions similaires avaient été obtenues par Bernard et al. (2009). À l'avenir, il serait donc plus judicieux d'utiliser un modèle à deux couches (80%_{cyt}-20%_{chl}) plutôt que la théorie de Mie pour simuler les propriétés optiques des cellules phytoplanctoniques.

L'une des perspectives de ce travail de thèse serait d'étendre l'utilisation du Cytosense en analysant la diffusion individuelle des particules d'un autre compartiment (e.g. compartiment détritique). Comme expliqué dans le chapitre 7, afin d'analyser les cellules détritiques, la méthode de "l'exclusion par colorant" est appropriée car elle permet de faire une distinction entre les cellules organiques vivantes et non vivantes. La membrane cellulaire des cellules mortes est perméable au SYTOX vert alors que la membrane des cellules vivantes ne l'est pas (Veldhuis et al. (1997, 2001)). Il en résulte que le compartiment détritique pourrait être identifié en utilisant la fluorescence induite par le SYTOX vert (émission maximale à environ 530 nm). Cependant, un examen préalable de l'impact du colorant fluorescent sur le signal de côté est indispensable. Si l'influence du colorant sur la diffusion des particules est négligeable, la section efficace de rétrodiffusion pourrait être obtenue à partir des mesures Cytosense comme pour le phytoplancton.

Une autre perspective serait d'obtenir les sections efficaces et les efficacités de diffusion avant, de côté et de rétrodiffusion des cellules phytoplanctoniques en milieu naturel. En effet, il serait intéressant de savoir si les variations inter-espèces sont facilement identifiables pour différentes espèces de phytoplancton coexistant dans l'environnement naturel. En outre, il serait intéressant d'étudier si d'importantes variations intra-espèces peuvent être observées dans les eaux naturelles, par exemple, au cours des différentes phases d'une floraison de phytoplancton ou durant un stress nutritif qui est susceptible d'avoir un impact sur la structure des cellules (e.g. volume relatif du chloroplaste Rosen and Lowe (1984)).

Dans la dernière partie de cette thèse, nous nous sommes attachés à analyser la relation qui existe entre le coefficient de rétrodiffusion ($b_b(\lambda)$) et la concentration en carbone

organique particulaire ([POC]) au cours de différentes phases de croissance. Pour *Thalassiosira pseudonana* et *Chlamydomonas concordia*, deux relations différentes ont pu être établies entre le [POC] et le coefficient de rétrodiffusion mesuré, par un ECO-BB9, à 488 nm (b_{BB9}). Afin d'étudier l'origine des variations, le coefficient de rétrodiffusion a été analysé. Dans un premier temps, les relations entre le b_{BB9} et l'abondance de chaque compartiment (bactéries hétérotrophes, cellules phytoplanctoniques et cellules en dégénérescence) ont été analysées sur l'ensemble de l'expérience, durant la phase exponentielle et hors phase exponentielle. Des relations linéaires fortes ont été obtenues entre l'abondance phytoplanctonique, qui représente moins de 3 % de l'abondance totale, et le b_{BB9} durant la phase exponentielle. Hors phase exponentielle, les coefficients de corrélation sont beaucoup plus faibles. Ces faibles corrélations pouvaient être dues à un effet de diffusion multiple, à la non prise en compte de l'abondance détritique, à une formation d'agrégats, à des variations de la section efficace de rétrodiffusion ou à un changement de la concentration relative des différents compartiments. Dans un deuxième temps, une reconstruction du coefficient de rétrodiffusion (b_{model}), prenant en compte les cellules phytoplanctoniques, les cellules en dégénérescence et les bactéries hétérotrophes, a été effectuée en couplant les données de deux cytomètres en flux (Cytosense et FACSCalibur) avec des simulations de diffusion simple. Cette reconstruction permet d'intégrer à la fois l'impact de l'abondance et l'impact de la section efficace de rétrodiffusion sur le coefficient de rétrodiffusion total. Le compartiment bactérien est apparu comme le plus gros contributeur au b_{model} avec une contribution moyenne comprise entre 84% et 88%. Suite à l'analyse des relations entre le POC et le coefficient de rétrodiffusion modélisé, sur l'ensemble de l'expérience et durant la phase exponentielle, la relation établie pour *Thalassiosira pseudonana* semble principalement expliquée par le compartiment bactérien, alors que la relation pour *Chlamydomonas concordia* semble expliquée par le compartiment phytoplanctonique. Cette dernière observation met en évidence que, pour *Chlamydomonas concordia*, soit le POC était principalement d'origine phytoplanctonique, soit la quantité de particules non algales covariait avec l'abondance en phytoplancton. Ainsi, la différence de pente entre la relation établie pour THAL et CHLAM pourrait être due aux différences de propriétés

optiques et du contenu en POC entre les cellules phytoplanctoniques et les bactéries. Il est important de noter que, hors phase exponentielle, aucune relation a pu être établie entre le POC et le coefficient de rétrodiffusion modélisé de chaque compartiment, le $b_{b_{\text{model}}}$ ou le $b_{b_{\text{BB9}}}$. Pour CHLAM, les variations peuvent être expliquées par une chute de l'abondance bactérienne qui induit une baisse du coefficient de rétrodiffusion alors que le POC continue de varier avec le compartiment phytoplanctonique. Concernant THAL, un effet de diffusion multiple, la formation d'agrégats ou un changement de concentration des différents compartiments peuvent expliquer les variations. Ces résultats mettent en évidence, tout comme Reynolds et al. (2016), qu'il serait intéressant de développer, en milieu naturel, des algorithmes en fonction du type d'eau. Reynolds et al. (2016) ont opté pour une classification dépendante de la proportion en POC par rapport à la concentration en matières en suspension, mais d'autres classifications sont possibles. Le Cytosense pourrait être utilisé afin d'effectuer des classifications optiques selon le type d'eau. McFarland et al. (2015) ont différencié 4 communautés de particules en se basant sur la distribution en taille et la diffusion mesurée par le Cytosense. De plus, en utilisant le Cytosense, il a été possible d'identifier le type de particules présent dans chaque communauté. Ce type de classification pourrait être utilisé afin d'analyser l'origine de la variabilité autour des relations moyennes des modèles bio-optiques.

Bibliographie

Bibliographie

- Aas, E. (1996). Refractive index of phytoplankton derived from its metabolite composition. Journal of Plankton Research, 18(12) :2223–2249.
- Ackleson, S. G. and Robins, D. B. (1990). Flow cytometric determinations of north sea phytoplankton optical properties. Netherlands Journal of Sea Research, 25(1) :11–18.
- Ackleson, S. G. and Spinrad, R. W. (1988). Size and refractive index of individual marine particulates : a flow cytometric approach. Applied Optics, 27(7) :1270–1277.
- Ackleson, S. G., Spinrad, R. W., Yentsch, C. M., Brown, J., and Korjef-Bellows, W. (1988). Phytoplankton optical properties : flow cytometric examinations of dilution-induced effects. Applied optics, 27(7) :1262–1269.
- Agustí, S. and Duarte, C. M. (2013). Phytoplankton lysis predicts dissolved organic carbon release in marine plankton communities. Biogeosciences, 10(3) :1259–1264.
- Ahn, Y.-H., Bricaud, A., and Morel, A. (1992). Light backscattering efficiency and related properties of some phytoplankters. Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers, 39(11-12) :1835–1855.
- Andersson, P. O., Gillbro, T., Ferguson, L., and Cogdell, R. J. (1991). Absorption spectral shifts of carotenoids related to medium polarizability. Photochemistry And Photobiology, 54(3) :353–360.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. C., Meyer-Reil, L. A., and Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. Marine Ecology Progress Series, 10(3) :257–264.

-
- Azam, F., Smith, D. C., and Carlucci, A. F. (1992). Bacterial transformation and transport of organic matter in the Southern California Bight. Progress in Oceanography, 30(1-4) :151–166.
- Babin, M., Morel, A., Fournier-Sicre, V., Fell, F., and Stramski, D. (2003a). Light scattering properties of marine particles in coastal and open ocean waters as related to the particle mass concentration. Limnology and Oceanography, 48(2) :843–859.
- Babin, M., Stramski, D., Ferrari, G. M., Claustre, H., Bricaud, A., Obolensky, G., and Hoepffner, N. (2003b). Variations in the light absorption coefficients of phytoplankton, nonalgal particles, and dissolved organic matter in coastal waters around europe. Journal of Geophysical Research : Oceans, 108(C7).
- Balch, W., Bowler, B., Drapeau, D., Poulton, A., and Holligan, P. (2010). Biominerals and the vertical flux of particulate organic carbon from the surface ocean. Geophysical Research Letters, 37(22) :1–6.
- Balch, W. M., Drapeau, D. T., Fritz, J. J., Bowler, B. C., and Nolan, J. (2001). Optical backscattering in the arabian seacontinuous underway measurements of particulate inorganic and organic carbon. Deep Sea Research Part I : Oceanographic Research Papers, 48(11) :2423–2452.
- Bernard, S., Probyn, T. A., and Quirantes, A. (2009). Simulating the optical properties of phytoplankton cells using a two-layered spherical geometry. Biogeosciences Discussions, 6(1) :1497–1563.
- Blasco, D., Packard, T., and Garfield, P. C. (1982). Size dependence of growth rate, respiratory electron transport system activity, and chemical composition in marine diatoms in the laboratory1. Journal of Phycology, 18(1) :58–63.
- Bohren, C. F. and Huffman, D. R. (1983). Absorption and scattering of light by small particles. Wiley New York.

-
- Boss, E. and Pegau, W. S. (2001). Relationship of light scattering at an angle in the backward direction to the backscattering coefficient. Applied Optics, 40(30) :5503–5507.
- Boss, E., Slade, W., and Hill, P. (2009). Effect of particulate aggregation in aquatic environments on the beam attenuation and its utility as a proxy for particulate mass. Optics Express, 17(11) :9408–9420.
- Bratbak, G., Thingstad, F., and Heldal, M. (1994). Viruses and the microbial loop. Microbial Ecology, 28(2) :209–221.
- Breneman, E. J. (1981). Light trap of high-performance and simple construction. Applied optics, 20(7) :1118–1119.
- Bricaud, A., Bédhomme, A.-L., and Morel, A. (1988). Optical properties of diverse phytoplanktonic species : experimental results and theoretical interpretation. Journal of Plankton Research, 10(5) :851–873.
- Bricaud, A., Claustre, H., Ras, J., and Oubelkheir, K. (2004). Natural variability of phytoplanktonic absorption in oceanic waters : Influence of the size structure of algal populations. Journal of Geophysical Research : Oceans, 109(C11).
- Bricaud, A. and Morel, A. (1986). Light attenuation and scattering by phytoplanktonic cells : a theoretical modeling. Applied Optics, 25(4) :571–580.
- Bricaud, A., Morel, A., Babin, M., Allali, K., and Claustre, H. (1998). Variations of light absorption by suspended particles with chlorophyll a concentration in oceanic(case 1) waters : Analysis and implications for bio-optical models. Journal of Geophysical Research, 103(C13) :31033–31044.
- Bricaud, A., Morel, A., and Prieur, L. (1983). Optical Efficiency Factors of Some Phytoplankters. Limnology and Oceanography, 28(5) :816–832.

-
- Bricaud, A. and Stramski, D. (1990). Spectral absorption coefficients of living phytoplankton and nonalgal biogenous matter : A comparison between the peru upwelling area and the sargasso sea. Limnology and oceanography, 35(3) :562–582.
- Bricaud, A., Zaneveld, J. R. V., and Kitchen, J. C. (1992). Backscattering efficiency of coccolithophorids : use of a three-layered sphere model. Proc. SPIE, 1750 :27–33.
- Brunsting, A. and Mullaney, P. F. (1974). Differential light scattering from spherical mammalian cells. Biophysical journal, 14(6) :439–463.
- Bryant, F. D., Seiber, B., and Latimer, P. (1969). Absolute optical cross sections of cells and chloroplasts. Archives of biochemistry and biophysics, 135 :97–108.
- Caffarri, S., Croce, R., Breton, J., and Bassi, R. (2001). The Major Antenna Complex of Photosystem II Has a Xanthophyll Binding Site Not Involved in Light Harvesting. Journal of Biological Chemistry, 276(38) :35924–35933.
- Carder, K. L., Tomlinson, R. D., and Bardsley, C. F. (1972). A technique for the estimation of indices of refraction of marine phytoplankters. Limnology and Oceanography, 17(6) :833–839.
- Cetinić, I., Perry, M. J., Briggs, N. T., Kallin, E., D’Asaro, E. A., and Lee, C. M. (2012). Particulate organic carbon and inherent optical properties during 2008 north atlantic bloom experiment. Journal of Geophysical Research : Oceans, 117(C6).
- Charney, E. and Brackett, F. (1961). The spectral dependence of scattering from a spherical alga and its implications for the state of organization of the light-accepting pigments. Archives of biochemistry and biophysics, 92 :1–12.
- Chen, G., Yang, P., Kattawar, G. W., and Mishchenko, M. I. (2006). Scattering phase functions of horizontally oriented hexagonal ice crystals. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 100(1-3) :91–102.

-
- Cinque, G., Croce, R., Holzwarth, A., and Bassi, R. (2000). Energy transfer among cp29 chlorophylls : calculated förster rates and experimental transient absorption at room temperature. Biophysical journal, 79(4) :1706–1717.
- Ciotti, A. M., Lewis, M. R., and Cullen, J. J. (2002). Assessment of the relationships between dominant cell size in natural phytoplankton communities and the spectral shape of the absorption coefficient. Limnology and Oceanography, 47(2) :404–417.
- Claustre, H., Morel, A., Babin, M., Cailliau, C., Marie, D., Marty, J.-C., Tailliez, D., and Vaultot, D. (1999). Variability in particle attenuation and chlorophyll fluorescence in the tropical pacific : Scales, patterns, and biogeochemical implications. Journal of Geophysical Research : Oceans, 104(C2) :3401–3422.
- Clavano, W., Boss, E., and Karp-Boss, L. (2007). Inherent optical properties of non-spherical marine-like particles from theory to observation. Oceanography and Marine Biology, 45 :1–38.
- Cole, J. J., Likens, G. E., and Strayer, D. L. (1982). Photosynthetically produced dissolved organic carbon : An important carbon source for planktonic bacteria. Limnology and Oceanography, 27(6) :1080–1090.
- Cunningham, A. and Buonaccorsi, G. A. (1992). Narrow-angle forward light scattering from individual algal cells : implications for size and shape discrimination in flow cytometry. 14(2) :223–234.
- Dall’Olmo, G., Boss, E., Behrenfeld, M. J., and Westberry, T. K. (2012). Particulate optical scattering coefficients along an Atlantic Meridional Transect. Opt. Express, 20(19) :21532–21551.
- Dall’Olmo, G., Westberry, T., Behrenfeld, M., Boss, E., and Slade, W. (2009). Significant contribution of large particles to optical backscattering in the open ocean. Biogeosciences, 6(6) :947–967.

-
- Dolman, V. L. (1989). Meerhoff mie program user guide. Internal Report Astronomy Dept.
- Dubelaar, G. B., Visser, J. W., and Donze, M. (1987). Anomalous behaviour of forward and perpendicular light scattering of a cyanobacterium owing to intracellular gas vacuoles. Cytometry, 8(4) :405–412.
- Dubelaar, G. B. J. and Jonker, R. R. (2000). Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. Scientia Marina, 64(2) :135–156.
- Duforêt-Gaurier, L., Moutier, W., Guiselin, N., Thyssen, M., Dubelaar, G., Mériaux, X., Courcot, L., Dessailly, D., and Loisel, H. (2015). Determination of backscattering cross section of individual particles from cytometric measurements : a new methodology. Optics express, 23(24) :31510–31533.
- Dugenne, M., Thyssen, M., Nerini, D., Mante, C., Poggiale, J.-C., Garcia, N., Garcia, F., and 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 :1–14.
- Dupouy, C., Loisel, H., Neveux, J., Brown, S. L., Moulin, C., Blanchot, J., Le Bouteiller, A., and Landry, M. R. (2003). Microbial absorption and backscattering coefficients from in situ and polder satellite data during an el nino–southern oscillation cold phase in the equatorial pacific (180). Journal of Geophysical Research : Oceans, 108(C12).
- Duyens, L. (1956). The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions. Biochimica et Biophysica Acta, 19 :1–12.
- Edmonds, A. R. (1957). Angular Momentum in Quantum Mechanics.
- Engel, A. (2000). The role of transparent exopolymer particles (TEP) in the increase in apparent particle stickiness (α) during the decline of a diatom bloom. Journal of Plankton Research, 22(3) :485–497.

-
- Engel, A. (2004). Distribution of transparent exopolymer particles (TEP) in the northeast Atlantic Ocean and their potential significance for aggregation processes. Deep-Sea Research Part I : Oceanographic Research Papers, 51(1) :83–92.
- Flory, E. N., Hill, P. S., Milligan, T. G., and Grant, J. (2004). The relationship between flocculation area and backscatter during a spring phytoplankton bloom. Deep-Sea Research Part I : Oceanographic Research Papers, 51(2) :213–223.
- Fuhrman, J. A. (1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. Nature, 399(6736) :541–548.
- Fuhrman, J. A. and Noble, R. T. (1995). Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. Limnology and Oceanography, 40(7) :1236–1242.
- Gardner, W., Mishonov, A., and Richardson, M. (2006). Global poC concentrations from in-situ and satellite data. Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography, 53(5) :718–740.
- Geider, R. and Osborne, B. (1987). Light absorption by a marine diatom : experimental observations and theoretical calculations of the package effect in a small thalassiosira species. Marine Biology, 96(2) :299–308.
- Gilev, K. V., Yurkin, M. A., Chernyshova, E. S., Strokotov, D. I., Chernyshev, A. V., and Maltsev, V. P. (2016). Mature red blood cells : from optical model to inverse light-scattering problem. Biomedical Optics Express, 7(4) :1305–1310.
- Gordon, H. R. (2006). Backscattering of light from disklike particles : is fine-scale structure or gross morphology more important ? Applied optics, 45(27) :7166–7173.
- Gordon, H. R. and Du, T. (2001). Light scattering by nonspherical particles : Application to coccoliths detached from *Emiliania huxleyi*. Limnology and Oceanography, 46(6) :1438–1454.

-
- Green, R. E., Sosik, H. M., and Olson, R. J. (2003a). Contributions of phytoplankton and other particles to inherent optical properties in New England continental shelf waters. Limnology and Oceanography, 48(6) :2377–2391.
- Green, R. E., Sosik, H. M., Olson, R. J., and DuRand, M. D. (2003b). Flow cytometric determination of size and complex refractive index for marine particles : comparison with independent and bulk estimates. Applied optics, 42(3) :526–41.
- Grossman, A., Manodori, A., and Snyder, D. (1990). Light-harvesting proteins of diatoms : Their relationship to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants and their mode of transport into plastids. MGG Molecular & General Genetics, 224(1) :91–100.
- Gruszecki, W. I., Grudzinski, W., Banaszek-Glos, A., Matula, M., Kernen, P., Krupa, Z., and Siewiesiuk, J. (1999). Xanthophyll pigments in light-harvesting complex ii in monomolecular layers : localisation, energy transfer and orientation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1412(2) :173–183.
- Hatcher, A., Hill, P., and Grant, J. (2001). Optical backscatter of marine flocs. Journal of Sea Research, 46(1) :1–12.
- Haupt, W. and Sheuerlein, R. (1990). Chloroplast movement. Plant, Cell & Environment, 13(7) :595–614.
- Hitchcock, G. L. (1982). A comparative study of the size dependent organic composition of marine diatoms and dinoflagellates. J. Plank. Res., 4(2) :363–377.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C. J., Holmes, R. W., and Strickland, J. D. (1965). Fluorometric determination of chlorophyll. Journal du Conseil, 30(1) :3–15.
- Janssen, M., Bathke, L., Marquardt, J., Krumbein, W. E., and Rhiel, E. (2001). Changes in the photosynthetic apparatus of diatoms in response to low and high light intensities. International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology, 4(1) :27–33.

-
- Kiefer, D. A., Olson, R. J., and Wilson, W. H. (1979). Reflectance spectroscopy of marine phytoplankton. Part 1. Optical properties as related to age and growth rate. Limnology and Oceanography, 24(4) :664–672.
- Kitchen, J. C. and Zaneveld, J. R. V. (1992). A three-layered sphere model of the optical properties of phytoplankton. Limnology and Oceanography, 37(8) :1680–1690.
- Kleima, F. J., Hofmann, E., Gobets, B., van Stokkum, I. H., van Grondelle, R., Diederichs, K., and van Amerongen, H. (2000). Förster excitation energy transfer in peridinin-chlorophyll-a-protein. Biophysical journal, 78(1) :344–353.
- Knap, A., Michaels, A., Close, A., Ducklow, H., and Dickson A. (1996). Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements. IOC SCOR Rpt. 19, (19) :1–210.
- Kostadinov, T. S., Siegel, D. A., and Maritorena, S. (2009). Retrieval of the particle size distribution from satellite ocean color observations. Journal of Geophysical Research : Oceans, 114(9) :1–22.
- Lee, R. E. (2008). Phycology. Cambridge University Press.
- Li, W. K. (1995). Composition of ultraphytoplankton in the central north Atlantic. Marine Ecology Progress Series, 122(1-3) :1–8.
- Loisel, H., Bose, E., Stramski, D., Oubelkheir, K., and Deschamps, P. (2001). Seasonal variability of the backscattering coefficient in the mediterranean sea based on satellite seawifs imagery. Geophysical Research Letters, 28(22) :4203–4206.
- Loisel, H. and Morel, A. (1998). Light scattering and chlorophyll concentration in case 1 waters : A reexamination. Limnology and Oceanography, 43(5) :847–858.
- Loisel, H., Nicolas, J.-M., Sciandra, A., Stramski, D., and Poteau, A. (2006). Spectral dependency of optical backscattering by marine particles from satellite remote sensing of the global ocean. Journal of Geophysical Research : Oceans, 111(C9).

-
- Lorenzen, C. J. (1966). A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *13*(2) :223–227.
- Mackowski, D. and Mishchenko, M. (2011). A multiple sphere T-matrix Fortran code for use on parallel computer clusters. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, *112*(13) :2182–2192.
- Maltsev, V. P. (2000). Scanning flow cytometry for individual particle analysis. *Review of Scientific Instruments*, *71*(1) :243–255.
- Marie, D., Simon, N., Guillou, L., Partensky, F., and Vaulot, D. (2000). Dna/rna analysis of phytoplankton by flow cytometry. *Current protocols in cytometry*.
- Martinez-Vicente, V., Tilstone, G. H., Sathyendranath, S., Miller, P. I., and Groom, S. B. (2012). Contributions of phytoplankton and bacteria to the optical backscattering coefficient over the mid-atlantic ridge. *Marine Ecology Progress Series*, *445* :37–51.
- Mas, S., Roy, S., Blouin, F., Mostajir, B., Therriault, J. C., Nozais, C., and Demers, S. (2008). Diel variations in optical properties of *Imantonia rotunda* (Haptophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) exposed to different irradiance levels. *Journal of Phycology*, *44*(3) :551–563.
- Matthews, M. and Bernard, S. (2013). Using a two-layered sphere model to investigate the impact of gas vacuoles on the inherent optical properties of *m. aeruginosa*. *Biogeosci. Discuss*, *10*(6) :10531–10579.
- McFarland, M. N., Rines, J., Sullivan, J., and Donaghay, P. (2015). Impact of phytoplankton size and physiology on particulate optical properties determined with scanning flow cytometry. *Marine Ecology Progress Series*, *531* :43–61.
- Menden-Deuer, S. and Lessard, E. J. (2000). Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and Oceanography*, *45*(3) :569–579.

-
- Mercado, J. M., Jiménez, C., Niell, F. X., and Figueroa, F. L. (1996). Comparaison of methods for measuring light absorption by algae and their application to the estimation of the package effect. Scientia Marina, 60(1) :39–45.
- Meyer, R. A. (1979). Light scattering from biological cells : dependence of backscatter radiation on membrane thickness and refractive index. Applied optics, 18(5) :585–588.
- Meyer, R. A. and Brunsting, A. (1975). Light scattering from nucleated biological cells. Biophysical journal, 15(3) :191–203.
- Mishchenko, M. I. (2000). Calculation of the amplitude matrix for a nonspherical particle in a fixed orientation. Applied Optics, 39(6) :1026–1031.
- Mishchenko, M. I. (2002). Vector radiative transfer equation for arbitrarily shaped and arbitrarily oriented particles : a microphysical derivation from statistical electromagnetics. Applied optics, 41(33) :7114–7134.
- Mishchenko, M. I. and Travis, L. D. (1998). Capabilities and limitations of a current fortran implementation of the t-matrix method for randomly oriented, rotationally symmetric scatterers. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 60(3) :309–324.
- Mishchenko, M. I., Travis, L. D., and Lacis, A. A. (2002). Scattering, absorption, and emission of light by small particles. Cambridge university press.
- Mishchenko, M. I., Travis, L. D., and Mackowski, D. W. (1996). T-matrix computations of light scattering by nonspherical particles : a review. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 55(5) :535–575.
- Mitchell, B. G., K. M. W. J. and Stramska, M. (2003). Determination of spectral absorption coefficients of particles, dissolved material and phytoplankton for discrete water samples. Ocean Optics Protocol for Satellite Ocean Color Sensor Validation, Volume IV : Chapter 4 : A Determination of Spectral Absorption Co- efficients of Particles, dissolved material and phytoplankton for discrete water sample, NASA, TM-2003, 3.

-
- Mobley, C. D. (1994). Light and water : radiative transfer in natural waters. Academic press.
- Morel, A. (1974). Optical properties of pure water and pure sea water. Optical aspects of oceanography, 1 :1–24.
- Morel, A. (2001). BIO-OPTICAL MODELS. Academic Press, pages 317–326.
- Morel, A. and Ahn, Y.-H. (1991). Optics of heterotrophic nanoflagellates and ciliates : A tentative assessment of their scattering role in oceanic waters compared to those of bacterial and algal cells. Journal of Marine Research, 49(1) :177–202.
- Morel, A. and Bricaud, A. (1981). Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton. Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers, 28(11) :1375–1393.
- Morel, A. and Bricaud, A. (1986). Inherent optical properties of algal cells including picoplankton : theoretical and experimental results. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci, 214 :521–559.
- Morel, A., Claustre, H., Antoine, D., and Gentili, B. (2007). Natural variability of bio-optical properties in case 1 waters : attenuation and reflectance within the visible and near-uv spectral domains, as observed in south pacific and mediterranean waters. Biogeosciences Discussions, 4(4) :2147–2178.
- Morel, A. and Gentili, B. (1991). Diffuse reflectance of oceanic waters : its dependence on Sun angle as influenced by the molecular scattering contribution. Applied optics, 30(30) :4427–4438.
- Moutier, W., Duforêt-Gaurier, L., Thyssen, M., Loisel, H., Mériaux, X., Courcot, L., Dessailly, D., and Alvain, S. (2016). Scattering of individual particles from cytometry : tests on phytoplankton cultures. Opt. Express, 24(21) :309–313.
- Mueller, J. (1973). The influence of phytoplankton on ocean color spectra.

-
- Nayar, S. and Chou, L. (2003). Relative efficiencies of different filters in retaining phytoplankton for pigment and productivity studies. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 58(2) :241–248.
- Nelson, N. B., Prezelin, B., and Bidigare, R. (1993). Phytoplankton light absorption and the package effect in california coastal waters. Marine Ecology Progress Series, 94(3) :217–227.
- Neukermans, G., Loisel, H., Mériaux, X., Astoreca, R., and McKee, D. (2012). In situ variability of mass-specific beam attenuation and backscattering of marine particles with respect to particle size, density, and composition. Limnology and Oceanography, 57(1) :124–144.
- Osborne, B. a. and Geider, R. J. (1989). Problems in the assessment of the package effect in five small phytoplankters. Marine Biology, 100(2) :151–159.
- Osborne, B. A. and Raven, J. A. (1986). Growth light level and photon absorption by cells of *Chlamydomonas reinhardtii* , *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae , Volvocales), *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae , Chlorococcales) and *Euglena viridis* (Euglenophyceae , Euglenales). British Phycological Journal, 21(3) :303–313.
- Pailotin, G., Leibl, W., Gapiński, J., Breton, J., and Dobek, a. (1998). Light gradients in spherical photosynthetic vesicles. Biophysical journal, 75(1) :124–133.
- Peña, O. and Pal, U. (2009). Scattering of electromagnetic radiation by a multilayered sphere. Computer Physics Communications, 180(11) :2348–2354.
- Pegau, W. S., Gray, D., and Zaneveld, J. R. V. (1997). Absorption and attenuation of visible and near-infrared light in water : dependence on temperature and salinity. Appl. Opt., 36(24) :6035–6046.
- Pegau, W. S. and Zaneveld, J. R. V. (1993). Temperature-dependent absorption of water in the red and near-infrared portions of the spectrum. Limnology and Oceanography, 38(1) :188–192.

-
- Piskozub, J. and McKee, D. (2011). Effective scattering phase functions for the multiple scattering regime. Optics express, 19(5) :4786–4794.
- Pope, R. M. and Fry, E. S. (1997). Absorption spectrum (380–700 nm) of pure water. ii. integrating cavity measurements. Applied optics, 36(33) :8710–8723.
- Preisendorfer, R. (1986). Secchi disk science : Visual optics of natural waters. Limnology and Oceanography, 31(5) :909–926.
- Preisendorfer, R. W. (1961). Application of radiative transfer theory to light measurements in the sea. Institut géographique national.
- Preisendorfer, R. W. (1976). Hydrologic optics. vol. i. introduction. us department of commerce, national oceanic and atmospheric administration. Environment Research Laboratory.
- Quinby-Hunt, M. and Hunt, A. (1989). Polarized-light scattering studies of marine Chlorella. Limnology and Oceanography, 34(8) :1587–1600.
- Quirantes, A. and Bernard, S. (2004). Light scattering by marine algae : two-layer spherical and nonspherical models. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 89(1) :311–321.
- Quirantes, A. and Bernard, S. (2006). Light-scattering methods for modelling algal particles as a collection of coated and/or nonspherical scatterers. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 100(1) :315–324.
- Quirantes, A. and Delgado, A. (2001). Scattering cross sections of randomly oriented coated spheroids. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 70(3) :261–272.
- Renge, I., Van Grondelle, R., and Dekker, J. (1996). Matrix and temperature effects on absorption spectra of β -carotene and pheophytin a in solution and in green plant photosystem ii. Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry, 96(1) :109–121.

-
- Reynolds, R. A., Stramski, D., and Neukermans, G. (2016). Optical backscattering by particles in arctic seawater and relationships to particle mass concentration, size distribution, and bulk composition. Limnology and Oceanography, 61(5) :1869–1890.
- Rosen, B. and Lowe, R. (1984). PHYSIOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL RESPONSES OF CYCLOTELLA MENEGHINIANA (BACILLARIOPHYTA) TO LIGHT INTENSITY AND NUTRIENT LIMITATION. Journal of phycology, 20(2) :173–183.
- Smith, D. C., Steward, G. F., Long, R. A., and Azam, F. (1995). Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography, 42(1) :75–97.
- Stephens, F. (1995). Variability of spectral absorption efficiency within living cells of *pyrocystis lunula* (dinophyta). Marine Biology, 122(2) :325–331.
- Stramska, M. and Stramski, D. (2005). Variability of particulate organic carbon concentration in the north polar atlantic based on ocean color observations with sea-viewing wide field-of-view sensor (seawifs). Journal of Geophysical Research : Oceans, 110(C10).
- Stramski, D. (1999). Refractive index of planktonic cells as a measure of cellular carbon and chlorophyll a content. Deep Sea Research Part I : Oceanographic Research Papers, 46(2) :335–351.
- Stramski, D., Boss, E., Bogucki, D., and Voss, K. J. (2004). The role of seawater constituents in light backscattering in the ocean. Progress in Oceanography, 61 :27–56.
- Stramski, D., Bricaud, A., and Morel, A. (2001). Modeling the inherent optical properties of the ocean based on the detailed composition of the planktonic community. Applied optics, 40(18) :2929–2945.
- Stramski, D. and Kiefer, D. A. (1991). Light scattering by microorganisms in the open ocean. Progress in Oceanography, 28(4) :343–383.

-
- Stramski, D. and Mobley, C. D. (1997). Effects of microbial particles on oceanic optics : A database of single-particle optical properties. Limnology and Oceanography, 42(3) :538–549.
- Stramski, D. and Reynolds, R. A. (1993). Diel variations in the optical properties of a marine diatom. Limnology and Oceanography, 38(7) :1347–2364.
- Stramski, D., Reynolds, R. A., Babin, M., Kaczmarek, S., Lewis, M. R., Röttgers, R., Sciandra, A., Stramska, M., Twardowski, M., Franz, B., et al. (2008). Relationships between the surface concentration of particulate organic carbon and optical properties in the eastern south pacific and eastern atlantic oceans. Biogeosciences, 5(1) :171–201.
- Stramski, D., Reynolds, R. A., Kahru, M., and Mitchell, B. G. (1999). Estimation of particulate organic carbon in the ocean from satellite remote sensing. Science, 285(5425) :239–242.
- Sullivan, J. M., Twardowski, M. S., Donaghay, P. L., and Freeman, S. A. (2005). Use of optical scattering to discriminate particle types in coastal waters. Applied Optics, 44(9) :1667–1680.
- Sullivan, J. M., Twardowski, M. S., Ronald, J., Zaneveld, V., and Moore, C. C. (2013). Measuring optical backscattering in water. In Light Scattering Reviews 7, pages 189–224. Springer.
- Svensen, O., Frette, O., and Erga, S. R. (2007). Scattering properties of microalgae : the effect of cell size and cell wall. Applied optics, 46(23) :5762–5769.
- Szeto, M., Werdell, P. J., Moore, T. S., and Campbell, J. W. (2011). Are the world’s oceans optically different ? Journal of Geophysical Research : Oceans, 116(10) :1–14.
- Tassan, S. and Ferrari, G. (2002). A sensitivity analysis of the transmittance–reflectancemethod for measuring light absorption by aquatic particles. Journal of Plankton Research, 24(8) :757–774.

-
- Tassan, S. and Ferrari, G. M. (1995). An alternative approach to absorption measurements of aquatic particles retained on filters. Limnology and Oceanography, 40(8) :1358–1368.
- Thyssen, M., Alvain, S., Lefèbvre, A., Dessailly, D., Rijkeboer, M., Guiselin, N., Creach, V., and Artigas, L.-F. (2014). 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., Alvain, S., Lefèbvre, A., Dessailly, D., Rijkeboer, M., Guiselin, N., Creach, V., and Artigas, L.-F. (2015). High-resolution analysis of a North Sea phytoplankton community structure based on in situ flow cytometry observations and potential implication for remote sensing. Biogeosciences, 12(13) :4051–4066.
- Twardowski, M., Claustre, H., Freeman, S., Stramski, D., and Huot, Y. (2007). Optical backscattering properties of the " clearest " natural waters. Biogeosciences Discussions, 4(4) :2441–2491.
- Vaillancourt, R. D., Brown, C. W., Guillard, R. R. L., and Balch, W. M. (2004). Light backscattering properties of marine phytoplankton : relationships to cell size, chemical composition and taxonomy. Journal of Plankton Research, 26(2) :191–212.
- Van de Hulst, H. (1981). Light scattering by small particles. Dover Publication, Inc. New York, USA.
- Vantrepotte, V., Danhiez, F.-P., Loisel, H., Ouillon, S., Mériaux, X., Cauvin, A., and Dessailly, D. (2015). Cdom-doc relationship in contrasted coastal waters : implication for doc retrieval from ocean color remote sensing observation. Optics express, 23(1) :33–54.
- Veldhuis, M., Kraay, G., and Timmermans, K. (2001). Cell death in phytoplankton : correlation between changes in membrane permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth. European Journal of Phycology, 36(2) :167–177.

-
- Veldhuis, M. J., Cucci, T. L., and Sieracki, M. E. (1997). Cellular dna content of marine phytoplankton using two new fluorochromes : Taxonomic and ecological implications1. Journal of Phycology, 33(3) :527–541.
- Volten, H., De Haan, J., Hovenier, J., Schreurs, R., Vassen, W., Dekker, A., Hoogenboom, H., Charlton, F., and Wouts, R. (1998). Laboratory measurements of angular distributions of light scattered by phytoplankton and silt. Limnology and Oceanography, 43(6) :1180–1197.
- Voss, K. J., Balch, W. M., and Kilpatrick, K. A. (1998). Scattering and attenuation properties of emiliania huxleyi cells and their detached coccoliths. Limnology and Oceanography, 43(5) :870–876.
- Whitmire, A., Pegau, W., and Karp-Boss, L. (2010). Spectral backscattering properties of marine phytoplankton cultures. Optics Express, 18(14) :1680–1690.
- Wilhelm, C., Jungandreas, A., Jakob, T., and Goss, R. (2014). Light acclimation in diatoms : From phenomenology to mechanisms. Marine Genomics, 16(1) :1–11.
- Wilhelm, S. W. and Suttle, C. A. (1999). Viruses and nutrient cycles in the sea viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. Bioscience, 49(10) :781–788.
- Witkowski, K., Król, T., Zielinski, A., and Kuten, E. (1998). A light-scattering matrix for unicellular marine phytoplankton. Limnology and oceanography, 43(5) :859–869.
- Witkowski, K., Woliński, L., Turzyński, Z., Gedziorowska, D., and Zielifiski, A. (1993). The investigation of kinetic growth of chlorella vulgaris cells by the method of integral and dynamic light scattering. Limnology and oceanography, 38(7) :1365–1372.
- Wriedt, T. et al. (1998). A review of elastic light scattering theories. Particle & Particle Systems Characterization, 15(2) :67–74.
- Xu, Y. L. (1995). Electromagnetic scattering by an aggregate of spheres. Applied optics, 34(21) :4573–4588.

-
- Xu, Y.-l. and Gustafson, B. Å. (2001). A generalized multiparticle mie-solution : further experimental verification. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 70(4) :395–419.
- Yang, W. (2003). Improved recursive algorithm for light scattering by a multilayered sphere. Applied optics, 42(9) :1710–1720.
- Zaneveld, J. R. V. and Kitchen, J. C. (1995). The variation in the inherent optical properties of phytoplankton near an absorption peak as determined by various models of cell structure. Journal of Geophysical Research, 100(C7) :309–313.
- Zhai, P.-W., Hu, Y., Trepte, C. R., Winker, D. M., Josset, D. B., Lucker, P. L., and Kattawar, G. W. (2013). Inherent optical properties of the coccolithophore : *Emiliana huxleyi*. Optics express, 21(15) :17625–17638.
- Zhang, X. and Hu, L. (2009). Estimating scattering of pure water from density fluctuation of the refractive index. Optics express, 17(3) :1671–1678.
- Zhang, X., Hu, L., and He, M.-X. (2009). Scattering by pure seawater : effect of salinity. Optics Express, 17(7) :5698–5710.

Liste des abréviations et acronymes

La liste suivante inclut seulement les éléments qui sont utilisés à plusieurs reprises dans le texte

Symbole ou abréviation	Définition et dimension
a	Coefficient d'absorption (m^{-1})
a_1	Fonction de phase (-)
b	Coefficient de diffusion (m^{-1})
\mathbf{B}	Champ magnétique (V.m^{-1})
b_b	Coefficient de rétrodiffusion (m^{-1})
c	Coefficient d'atténuation (m^{-1})
d	Diamètre (m^2)
D_e	Diamètres de sphères équivalentes en surface (m)
D	Distance entre la particule et le centre de la ligne de flux (m)
eps	Excentricité (-)
\mathbf{E}	Champ électrique (V.m^{-1})
\mathbf{F}	Matrice de diffusion (m^2)
$\langle \mathbf{F} \rangle$	Matrice de diffusion moyenne par particule (m^2)
\mathbf{F}_{ens}	Matrice de diffusion d'un élément de volume (m^2)
$\tilde{\mathbf{F}}$	Matrice de diffusion normalisé (-)
G	section géométrique (m^2)
I^P	Intensité de lumière polarisée (W.m^{-2})
\mathbf{I}	Vecteur de Stokes (W.m^{-2})
\mathbf{I}_i	Paramètres de Stokes du rayonnement incident (W.m^{-2})
\mathbf{I}_d	Paramètres de Stokes du rayonnement diffusé (W.m^{-2})
I_i	Intensité de l'onde incidente (W.m^2)
I_d	Intensité de l'onde diffusé (W.m^2)
I, Q, U, V	Paramètres de Stokes (W.m^{-2})
k	Nombre d'onde (m^{-1})
L_r	Repère du laboratoire (ou de référence) (-)
L_p	Repère de la particule (-)
$m = m_r + i m_i$	Indice de réfraction complexe (-)
m_j	Indice de réfraction complexe par rapport au milieu environnant de la j^{me} couche (-)
$m(\text{Si})$	Indice de réfraction complexe de la couche de silice (-)
$m(\text{Chl})$	Indice de réfraction complexe du chloroplaste (-)
$m(\text{Cyto})$	Indice de réfraction complexe du cytoplasme (-)
N	Nombre de particules (-)
N_m	Nombre de particules par unité de volume (m^{-3})
\mathbf{n}	Vecteur unitaire (-)
\mathbf{n}^i	Vecteur unitaire dans la direction de l'onde incidente (-)

Symbole ou abréviation	Définition et dimension
\mathbf{n}^d	Vecteur unitaire dans la direction de l'onde diffusé (-)
$p(\mathbf{x})$	Fonction de densité de probabilité (\mathbf{x}^{-1})
P	Degré de polarisation (-)
Q_b	Efficacité de diffusion (-)
Q_a	Efficacité d'absorption (-)
Q_{bb}	Efficacité de rétrodiffusion (-)
Q_{FSC}	Efficacité de diffusion avant (-)
Q_{SSC}	Efficacité de diffusion de côté (-)
\mathbf{R}	Vecteur position (m)
R	Distance par rapport au centre de l'objet diffusant (m)
r	Rayon de l'objet diffusant (m)
r_s	Rayon d'une sphère équivalente ayant la même surface (m)
r_v	Rayon d'une sphère équivalente ayant le même volume (m)
s	Paramètre de taille (-)
S	Paramètre du profil du flux de Poiseuille ($\text{m}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
t	Temps (s)
dV	Elément de volume (m^3)
$V(\text{Si})$	Volume relatif de la paroi de silice (-)
$V(\text{Chl})$	Volume relatif du chloroplaste (-)
$V(\text{Cyto})$	Volume relatif du cytoplasme (-)
V_{max}	Vitesse au centre du flux ($\text{m}.\text{s}^{-1}$)
R_c	Rayon de la cuvette d'écoulement (m)
w	Fréquence angulaire ($\text{rad}.\text{s}^{-1}$)
W_{FSC}	Fonction de pondération du détecteur avant (-)
W_{SSC}	Fonction de pondération du détecteur côté (-)
$\tilde{\mathbf{Z}}$	Matrice de phase normalisée (-)
\mathbf{Z}_{ens}	Matrice de phase d'un élément de volume (m^2)
$\langle \mathbf{Z} \rangle$	Matrice de phase moyenne par particule (m^2)
\mathbf{Z}	Matrice de phase (m^2)

Symbole ou abréviation	Définition et dimension
α	Fraction de lumière provenant du faisceau de lumière polarisé à $+45^\circ$ (-)
λ	Longueur d'onde (m^2)
λ_r	Longueur d'onde par rapport au milieu environnant (m^2)
ρ	Décalage de phase (-)
θ	Angle zénital (rad)
ϕ	Angle azimutal (rad)
ϵ	Angle entre l'axe de symétrie d'une particule non sphérique avec la ligne de flux (rad)
ϵ	Permittivité électrique du milieu ($F.m^{-1}$)
μ	Perméabilité magnétique du milieu ($H.m^{-1}$)
Θ	Angle de diffusion (rad)
σ_1, σ_2	Angles de rotation (rad)
σ_d	Section efficace de diffusion (m^2)
σ_{bb}	Section efficace de rétrodiffusion (m^2)
σ_{FSC}	Section efficace de diffusion avant (m^2)
σ_{SSC}	Section efficace de diffusion de côté (m^2)
α, β, γ	Angles d'Euler (rad)
$\langle \sigma_d \rangle$	Section efficace de diffusion moyenne par particule (m^2)
β	Indicatrice de diffusion (m^{-1})
$\Phi(\lambda)$	Puissance spectrale ($W.nm^{-1}$)

Indices utilisés pour les coefficients :

w	Eau de mer pure
phy	Phytoplancton
DOM	Matière organique dissoute
p	Particules
nap	Particules non algales

Acronymes :

IOP	Propriété optique inhérente
CDOM	Matière organique dissoute colorée
POC	Matière organique particulaire
MEB	Microscope à balayage électronique
PMTs	Photomultiplicateurs
MIO	Institut méditerranéen d'océanologie
PRECYM	Plateforme régionale de cytométrie pour la microbiologie
CN	Compte numérique
PS	Polystyrène
Chl- <i>a</i>	Chlorophylle- <i>a</i>
PSD	Distribution en taille des particules
SEHS	Sphère homogène de surface équivalente
DTB1	Base de données numéro 1
DTB2	Base de données numéro 2
inc	incrément

CINQUIÈME PARTIE

Annexes

Determination of backscattering cross section of individual particles from cytometric measurements: a new methodology

Lucile Duforêt-Gaurier,^{1,*} William Moutier,¹ Natacha Guiselin,¹
Mélilotus Thyssen,² George Dubelaar,³ Xavier Mériaux,¹ Lucie
Courcot,¹ David Dessailly,¹ and Hubert Loisel^{4,5,1}

¹Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG), Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), CNRS UMR 8187, 32 avenue Foch, 62930 Wimereux, France

²Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), Université d'Aix-Marseille (AMU), CNRS/IRD UMR 7294, Campus de Luminy, 13288 Marseille, France

³CytoBuoy b.v., Jan Steenstraat 1, 3443 GP WOERDEN, The Netherlands ⁴Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Université de Toulouse, UPS (OMP), CNRS, UMR 5566 LEGOS, 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France

⁵Space Technology Institute (STI), Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

*lucile.duforet@univ-littoral.fr

Abstract: A methodology is developed to derive the backscattering cross section of individual particles as measured with the CytoSense (CytoBuoy b.v., NL). This *in situ* flow cytometer detects light scatter in forward and sideward directions and fluorescence in various spectral bands for a wide range of particles. First, the weighting functions are determined for the forward and sideward detectors to take into account their instrumental response as a function of the scattering angle. The CytoSense values are converted into forward and sideward scattering cross sections. The CytoSense estimates of uniform polystyrene microspheres from 1 to 90 μm are compared with Mie computations. The mean absolute relative differences ΔE are around 33.7% and 23.9% for forward and sideward scattering, respectively. Then, a theoretical relationship is developed to convert sideward scattering into backscattering cross section, from a synthetic database of 495,900 simulations including homogeneous and multi-layered spheres. The relationship follows a power law with a coefficient of determination of 0.95. To test the methodology, a laboratory experiment is carried out on a suspension of silica beads to compare backscattering cross section as measured by the WET Labs ECO-BB9 and derived from CytoSense. Relative differences are between 35% and 60%. They are of the same order of magnitude as the instrumental variability. Differences can be partly explained by the fact that the two instruments do not measure exactly the same parameter: the cross section of individual particles for the CytoSense and the bulk cross section for the ECO-BB9.

© 2015 Optical Society of America

OCIS codes: (010.4450) Oceanic optics; (010.5620) Radiative transfer; (010.1350) Backscattering; (120.4640) Optical instruments; (120.5820) Scattering measurements; (290.5850) Scattering, particles.

References and links

1. R. W. Preisendorfer, "Hydrologic optics, Vol.1: Introduction," Springfield National Technical Information Service. Also available on CD, Office of Naval Research, (1976).
2. D. Stramski, A. Bricaud, and A. Morel, "Modeling the inherent optical properties of the ocean based on the detailed composition of the planktonic community," *Appl. Opt.* **40**(18), 2929–2945 (2001).
3. A. Morel and A. Bricaud, "Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton," *Deep Sea Res.* **28**, 1375–1393 (1981).
4. A. Bricaud and A. Morel, "Light attenuation and scattering by phytoplanktonic cells: a theoretical modeling," *Appl. Opt.* **25**(4), 571–580 (1986).
5. Y. H. Ahn, A. Bricaud, and A. Morel, "Light backscattering efficiency and related properties of some phytoplankters," *Deep Sea Res.* **39**, 1835–1855 (1992).
6. D. Stramski and D. A. Kiefer, "Light scattering by microorganisms in the open ocean," *Prog. Oceanogr.* **28**(4), 343–383 (1991).
7. R. D. Vaillancourt, C. W. Brown, R. R. L. Guillard, and W. M. Balch, "Light backscattering properties of marine phytoplankton: relationships to cell size, chemical composition, and taxonomy," *J. Plankton. Res.* **26**(2), 191–212 (2004).
8. H. Volten, J. F. de Haan, J. W. Hovenier, R. Schreurs, W. Vassen, A. G. Dekker, H. J. Hoogenboom, F. Charlton, and R. Wouts, "Laboratory measurements of angular distributions of light scattered by phytoplankton and silt," *Limnol. Oceanogr.* **43**, 1180–1197 (1998).
9. M. S. Quinby-Hunt, A. J. Hunt, K. Loffitus, and D. Shapiro, "Polarized-light scattering studies of marine *Chlorella*," *Limnol. Oceanogr.* **34**(8), 1587–1600 (1989).
10. O. Svensen, O. Frette, and S. R. Rune Erga, "Scattering properties of microalgae: the effect of cell size and cell wall," *Appl. Opt.* **46**(23), 5762–5769 (2007).
11. J. C. Kitchen and J.R. Zaneveld, "A three-layered sphere model of the optical properties of phytoplankton," *Limnol. Oceanogr.* **37**(8), 1680–1690 (1992).
12. A. Quirantes and A. V. Delgado, "The scattering of light by a suspension of coated spherical particles: effects of polydispersity on cross sections," *J. Phys. D: Appl. Phys.* **30**, 2123–2131 (1997).
13. W. R. Clavano, E. Boss, and L. Karp-Boss, "Inherent optical properties of non-spherical marine-like particles - from theory to observations," *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **45**, 1–38 (2007).
14. A. L. Whitmire, W. S. Pegau, L. Karp-Boss, E. Boss, and T. J. Cowles, "Spectral backscattering properties of marine phytoplankton cultures," *Opt. Express* **18**(14), 15073–15093 (2010).
15. A. Cunningham and G. A. Buonaccorsi, "Narrow-angle forward light scattering from individual algal cells: implications for size and shape discrimination in flow cytometry," *J. Plankton. Res.* **14**, 223–234 (1992).
16. S. G. Ackleson and R. W. Spinrad, "Size and refractive index of individual marine particulates: a flow cytometric approach," *Appl. Opt.* **27**(7), 1270–1277 (1988).
17. R. E. Green, H. M. Sosik, R. J. Olson, and M. D. DuRand, "Flow cytometric determination of size and complex refractive index for marine particles: comparison with independent and bulk estimates," *Appl. Opt.* **42**(3), 526–540 (2003).
18. R. E. Green, H. M. Sosik, and R. J. Olson, "Contributions of phytoplankton and other particles to inherent optical properties in New England continental shelf waters," *Limnol. Oceanogr.* **48**(6), 2377–2391 (2003).
19. C. Dupouy, H. Loisel, J. Neveux, C. Moulin, S. Brown, J. Blanchot, A. Leboutteiller, and M. Landry, "Microbial absorption and backscattering coefficients from in situ and POLDER satellite during an El Niño-Southern Oscillation cold phase in the equatorial Pacific (180)," *J. Geophys. Res.* **108**(C12), 8138 (2003).
20. A. Malkasian, D. Nerini, M. A. van Dijk, M. Thyssen, C. Mante, and G. Gr'gory, "Functional analysis and classification of phytoplankton based on data from an automated flow cytometer," *Cytometry Part A* **79**(4), 263–275 (2011).
21. G. B. Dubelaar, P. J. Geerders, and R. R. Jonker, "High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics," *J. Environ. Monit.* **6**(12), 946–952 (2004).
22. M. I. Mishchenko, L. D. Travis, and A. A. Lacis, *Scattering, Absorption and Emission of Light of Small Particles* (Cambridge University Press, 2002).
23. M. E. Lee and M. R. Lewis, "A new method for the measurement of the optical volume scattering function in the upper ocean," *J. Atmos. Oceanic Technol.* **20**(4), 563–571 (2003).
24. M. Twardowski, X. Zhang, S. Vagle, J. Sullivan, S. Freeman, H. Czerski, Y. You, L. Bi, and G. Kattawar, "The optical volume scattering function in a surf zone inverted to derive sediment and bubble particle subpopulations," *J. Geophys. Res.* **117**, C00H17 (2012).
25. T. Oishi, "Significant relationship between the backward scattering coefficient of sea water and the scatterance at 120°," *Appl. Opt.* **29**(31), 4658–4665 (1990).
26. R. A. Maffione and D. R. Dana, "Instruments and methods for measuring the backward-scattering coefficient of ocean waters," *Appl. Opt.* **36**(24), 6057–6067 (1997).

27. E. Boss and S. Pegau, "Relationship of light scattering at an angle in the backward direction to the backscattering coefficient," *Appl. Opt.* **40**(30), 5503–5507 (2001).
28. M. Chami, E. Marken, J. J. Stamnes, G. Khomenko and G. Korotaev, "Variability of the relationship between the particulate backscattering coefficient and the volume scattering function measured at fixed angles," *J. Geophys. Res.* **111**(C05), C05013 (2006).
29. J. F. Berthon, E. Shybanov M. Lee, and G. Zibordi, "Measurements and modeling of the volume scattering function in the coastal northern adriatic sea," *Appl. Opt.* **46**(22), 5189–5203 (2007).
30. J. M. Sullivan and M. S. Twardowski, "Angular shape of the oceanic particulate volume scattering function in the backward direction," *Appl. Opt.* **48**(35), 6811–6819 (2009).
31. X. Zhang, H. Lianbo, and M. X. He, "Scattering by pure water: effect of salinity," *Opt. Express*, **17**, 5698–5710 (2009).
32. J. M. Sullivan, M. S. Twardowski, J. R. V. Zaneveld, and C. Moore, "Measuring optical backscattering in water," A. Kokhanovsky, ed. *Light Scattering Reviews 7: Radiative Transfer and Optical Properties of Atmosphere and Underlying Surface* (Springer Praxis Books, 2013), pp. 189–224.
33. V. L. Dolman, "Meerhoff Mie Program User Guide," in *Internal Report Astronomy Dept.* (Free University, 1989).
34. W. Yang, "Improved recursive algorithm for light scattering by a multilayered sphere," *Appl. Opt.* **42**(9), 1710–1720 (2003).
35. O. Pena and U. Pal, "Scattering of electromagnetic radiation by a multilayered sphere," *Comput. Phys. Commun.* **180**(11), 2348–2354 (2009).
36. D. A. Siegel, "Resource competition in a discrete environment: why are plankton distributions paradoxical?" *Limonol. Oceanogr.* **43**, 1133–1146 (1998).
37. E. Aas, "Influence of shape and structure on light scattering by marine particles," *Report of Department of Geophysics* (University of Oslo, 1984), Vol. 53.
38. S. Bernard, T. A. Probyn, and A. Quirantes, "Simulating the optical properties of phytoplankton cells using a two-layered spherical geometry," *Biogeosci. Discuss.* **6**, 1497–1563 (2009).
39. M. Thyssen, G. A. Tarran, M. V. Zubkov, R. J. Holland, G. Grgori, P.H. Burkill, and M. Denis, "The emergence of automated high frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability," *J. Plank. Res.* **30**(3), 333–343 (2008).
40. M. I. Mishchenko, "Calculation of the amplitude matrix for a nonspherical particle in a fixed orientation," *Appl. Opt.* **39**, 1026–1031 (2000).
41. D. W. Mackowski and M. I. Mishchenko, "A multiple sphere T-matrix Fortran code for use on parallel computer clusters," *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* **112**, 2182–2192 (2011).

1. Introduction

Seawater constituents (pure water molecules, suspended particles, dissolved substances and air bubbles) impact the propagation of light through absorption and scattering processes. Absorbing and scattering characteristics of water constituents are described by the inherent optical properties (IOPs) ([1]), that do not depend on the radiance distribution. The most fundamental IOPs are the absorption coefficient $a(\lambda)$ and the volume scattering function $\beta(\lambda)$ with λ the wavelength of the radiation. From $a(\lambda)$ and $\beta(\lambda)$, three other IOPs can be defined: the backscattering coefficient $b_b(\lambda)$, the total scattering coefficient $b(\lambda)$, and the attenuation coefficient defined as $c(\lambda) = a(\lambda) + b(\lambda)$.

Since a few years now, optical instruments, such as optical backscattering sensors (Hobilabs Hydroscat, WET Labs ECO-BB or ECO-VSF) or flow-through attenuation and absorption meter (WET Labs AC-9), are dedicated to routine *in situ* measurements of IOPs. These instruments can be deployed on a large variety of platforms at different time and space scales, relevant to the sediment or phytoplankton dynamics. However, such instruments are not able to efficiently isolate and monitor the individual effects of particles on IOPs. For this reason, the particle community is treated in bulk, and the bulk IOPs of a water body result from additive contributions of all individual constituents that absorb or scatter light [2]. Note that the contribution of the dissolved matter to the scattering signal is supposed to be negligible and is therefore omitted. The dominant ecological role of phytoplankton in both open and coastal waters and the great impact on lithogenic particles in coastal waters requires that the relative contribution of the particle community on the IOPs has to be well characterized.

Although a complete optical model incorporating each and every individual component of

seawater is a very difficult task, some previous studies furthered our understanding of how the planktonic community influences the IOPs. As radiative transfer simulations provide an alternative to direct measurements, many studies were based on Mie theory assuming particles as homogeneous spheres [2–6]. These studies modeled IOPs on a detailed composition of the phytoplanktonic community, considering also non-algal particles, as viruses and heterotrophic bacteria, and non-living particles as detritus, sediments and air bubbles. Findings showed that, the relative contribution of planktonic microorganisms to light scattering is smaller than of non-living particles as detritus and sediments. However, while the absorption, attenuation and total scattering of algal cells are correctly described using the Mie theory, direct measurements realized on the volume scattering function of algal cells showed that Mie theory is less appropriate to model the backscattering [7–10]. Whitmire et al., 2010 showed from a laboratory analysis of thirteen phytoplankton species that phytoplankton cells may backscatter light at significantly higher efficiencies than what is predicted by Mie theory. Unfortunately, bulk measurements did not allow to determine precisely the individual contribution of phytoplankton, bacteria and detritus compartments.

Radiative transfer simulations realized for heterogeneous particles as coated spheres produce higher backscattering coefficient than for homogeneous spheres [11, 12]. Kitchen and Zaneveld, 1992 showed that when heterogeneous particles are considered, it is not necessary to have a high percentage of mineral-like particles or very high concentrations of submicron particles to match the observed IOPs. Bernard et al., 2009 confirmed that algal backscattering coefficients associated with coated spheres are between 5 and 25 times higher than their homogeneous volume equivalent counterparts. Cell shape can also impact the backscattering signal, more particularly for large particles as compared to the wavelength [13]. Comparisons of computations for monodispersion of randomly oriented spheroids to the computations obtained for monodispersion of volume equivalent spheres showed a strong dependence of the biases in the IOPs on particle size and shape. Biases on IOPs for polydispersions of spheroids are greater and can be higher than a factor two when the population is enriched with large particles. All these studies based on simulations or *in situ* bulk measurements resulted in controversial results. In many papers, the authors agree that further studies are required to better characterize the impact of individual cells on IOPs [13, 14].

Flow cytometry is one of the few tools used to analyse the optical properties of individual particles. A particle can be enumerated, identified and classified by analysing the scattered signals and also the fluorescence emitted by the intracellular pigments. Few approaches were developed in the past to retrieve particles properties from cytometry [15–17]. One of the more recent methods developed by Green et al., 2003 allows estimates of size and complex refractive index (real (m_r) and imaginary part (m_i)) of particles from forward and sideward scattering, and chlorophyll fluorescence combined with Mie theory. This method was used to realize particle budgets including phytoplankton, detritus and minerals from *in situ* measurements in New England continental shelf waters [18]. They showed that the summed contributions of individual particles to phytoplankton absorption and particle scattering were close to values derived from bulk measurements. Their findings highlighted that minerals contribute an important amount in the backscattering signal and detritus have a significant contribution in summer because of their high concentration at submicron sizes. In their conclusions, the authors suggest to conduct more studies to determine how their results apply in broader conditions and for some other water types, as waters with bloom conditions, new approaches will be needed because Mie theory leads to ambiguous estimates [18]. They also tested their method by comparing results from a large variety of phytoplankton cultures with Coulter Counter estimates of cell diameter and estimates of m_r and m_i resulting from inversions (using Mie theory) of bulk measurements [17]. Comparisons showed that flow cytometric estimates of m_i were well correlated with intracellu-

lar chlorophyll concentration, whereas flow cytometric estimates of m_r were not correlated with bulk estimates but stay within the range of expected values for phytoplankton cells. Dupouy et al., 2003 showed from *in situ* measurements performed in the Equatorial Pacific using FACSscan flow cytometer, that while they were able to close the budget for particulate absorption, this was not the case for the particulate backscattering coefficient [19]. Green et al., 2003 concluded that their methodology is useful for distinguishing between organic and mineral particles but the accurate determination of the real part of the refractive index using flow cytometry requires some additional information about cell shape and internal heterogeneity. They indicated clearly that there is a need for new particle approaches that overcome the limitations of Mie Theory.

In this study, we developed a new methodology to derive the backscattering cross section of individual particles from measurements conducted with the benchtop and *in situ* deployable flow cytometer CytoSense (CytoBuoy b. v.). Opposed to single datapoints in conventional flow cytometers the CytoSense continuously digitizes and stores the running detector outputs while a particle flows at constant velocity through the sharply focused laser beam. Additional descriptors (length, total, maximum, average, inertia, center of gravity, fill Factor, asymmetry, number of cells, time of flight) are calculated based on pulse shapes. They allow for a better classification of particles, and detection of the location of specific internal cell structures [20]. Although, the proposed approach derives only the backscattering signal and does not go further the particle characterization, it is valid for homogeneous and heterogeneous spherical particles contrary to previous methodologies deriving particle diameter and complex refractive index but assuming particles as homogeneous spheres. In a first step, weighting functions were determined for the forward and sideward detectors to take into account their instrumental response as function of the scattering angle and cytometer channel values are converted into forward or sideward scattering cross section. In a second step, a theoretical relationship is developed, based on 495, 900 radiative transfer simulations for homogeneous and heterogeneous phytoplankton cells, to convert the sideward scattering cross section as measured by CytoSense into backscattering cross section. Finally, cytometric measurements on bead suspensions have been compared to bulk measurements realized with a WET Labs ECO-BB9 backscattering sensor.

2. Flow cytometry

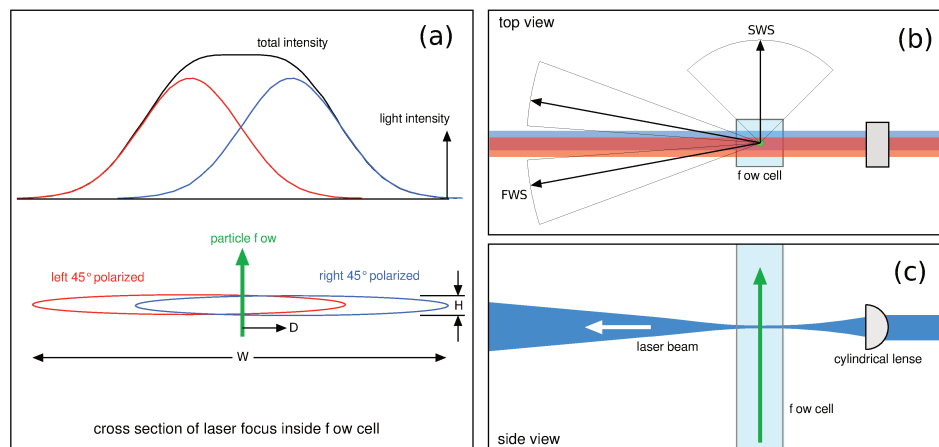


Fig. 1. CytoSense design: (a) beam shaping and light intensity distribution; (b) and (c) principle of flow cytometry.

In this study, we use the Cytosense of the PRECYM flow cytometry platform of the MIO

(<http://precym.mio.univ-amu.fr>). The CytoSense benchtop flow cytometer (Cytobuoy b.v., NL) was designed for the observation of phytoplankton cells. It measures optical properties (forward and sideward scattering, FWS and SWS, respectively) and fluorescence of their natural pigments. The practical detection level used is ca. $1\ \mu\text{m}$ (smaller for higher refractive index particles). The maximum cell size is determined by the smallest orifice in the fluid system (0.8 mm for standard CytoSenses). Digital data acquisition is initiated as each particle enters the laser beam and is terminated when the particle leaves the laser beam. The light scatter and fluorescence from each particle are collected by digitizing the data from all sensors every $0.5\ \mu\text{m}$. These digitized pulse shapes can be analyzed, giving additional information on size and internal structure. The fluorescence emitted by photosynthetic pigments in algal cells are detected at three different spectral bands. The resulting signatures are displayed as red, orange and yellow fluorescence respectively, which assist in determining the pigment type of each particle.

The sample is dosed by a peristaltic pump set at a rate of $2.47\ \mu\text{l s}^{-1}$ (selectable range $0.1 - 20\ \mu\text{l s}^{-1}$). In the flow cell, the sample stream is surrounded by the sheath fluid (saline or pure water), which fixes the final velocity of the line of particles passing through the laser (about $2\ \text{m s}^{-1}$). The flow cell has an internal fluid channel of $1 \times 1\ \text{mm}$. The material of the flat, transparent walls is quartz glass (refractive index of 1.46).

The laser is a Coherent Inc. Saphyre, 488 nm, with a power of 15 mW, a beam diameter of 0.7 mm, vertically polarized. The CytoSense beam shaping, converts the single beam in two horizontally displaced beams with polarization of $+45^\circ$ and -45° relative to the original polarisation of the laser beam. The superposition of these two Gaussian beams, with partly overlapping light distributions provides a flat light distribution over the sensing zone of the detectors. Thus, in the plane of the particle flow path, the resulting laser beam height (H) is reduced to $5\ \mu\text{m}$, and the resulting beam width (W) is about $600\ \mu\text{m}$ to encompass the suspension stream and the sheath fluid (Fig. 1(a)). The suspension stream has a width of ca. $20\text{-}200\ \mu\text{m}$ depending on the dosing rate and flows in the middle of the light distribution, where the intensity is constant. Thus, particles flowing through the intersection volume outside the middle receive the same light intensity. With this double beam solution, particles are illuminated by radiation coming from the $+45^\circ$ and -45° polarized beams. If a particle is flowing in the middle of the flow cell, the light scattered by the particle contains equal amounts of both polarization states. If a particle is flowing through the combined irradiance profile of both laser beams at some distance D away from the middle, the scattered light will contain proportionally more light from one beam than from the other one with the other polarization state. The forward scattered light (FWS) is collimated and directed onto two PIN photodiode detectors, one with a $+45^\circ$ angle polarizer in front of the photodiode and one with a -45° angle polarizer (Fig. 1(b)). In the analysis software, the signals from the two detectors are summed together to provide the forward scattering (FWS) of each particle. Their separate outputs yield the illumination ratio (and therewith the value of D) of the particle. The laser beam exiting the flow cell is absorbed in a beam stop (Fig. 1(b)). Therefore the collection solid angle of the forward scatter detectors starts at ca. 2° , going up to ca. 15° . The sideward scattered light (SWS), together with the fluorescence emission, is collected at 90° (solid angle between 45° and 135°) by a N.A.=1 objective and is directed to a series of PMT's, using a set of dichroic mirrors and band pass filters (Fig. 1(b)).

The proprietary Cytoclus software (Cytobuoy b.v., NL) was used to manually analyse the data collected by the CytoSense [21]. It enables the clustering of data points representing cells having similar optical properties, constituted by their forward and sideward scattering, and their various fluorescence signals. The clustering uses up to 10 simple mathematical signal descriptors of each available detector signal (for example, length, height, centre of gravity, assymetry, number of humps...). The various clusters are selected manually by drawing gates in correlated bivariate scatter plots. This combines objective factors from the cytograms and

subjective considerations linked to the experience of the observer. The data of the various types of beads used could be easily discriminated in this way. A minimum detection threshold of 16mV was selected for the SWS to avoid instrumental noise and optimize the detection of calibration beads.

3. Theoretical considerations

Light scattering is produced by the presence of an object (such as a particle) with a refractive index different from that of the surrounding medium. The refractive index is expressed in complex form as $m(\lambda) = m_r(\lambda) + i m_i(\lambda)$, where λ is the wavelength of the radiation. The real part determines the phase velocity of the wave ($v(\lambda) = c/m_r(\lambda)$) with c the speed of light in a vacuum. The imaginary part represents the absorption of light as it propagates through the particle with $a_{cm}(\lambda)$ the absorption coefficient of the cellular material equal to $4\pi m_i(\lambda)/\lambda$. The angular distribution and polarization of the scattered field depend on the polarization, directional characteristics of the incident field, and on the properties of the particle as its size parameter ($x(\lambda) = \pi d/\lambda$ with d its diameter), its shape, composition, structure and orientation. The single scattering of light by an object is described by the scattering cross section $C_{sca}(\lambda)$ (units, m^2) and the phase matrix $\tilde{Z}(\lambda, \mathbf{n}_{sca}, \mathbf{n}_{inc})$ with \mathbf{n}_{inc} and \mathbf{n}_{sca} the direction of the incident and scattered radiation. The scattering cross section is defined by [22]:

$$C_{sca}(\lambda) = \frac{r^2}{I_{inc}(\lambda, \mathbf{n}_{inc})} \int_{4\pi} d\mathbf{n}_{sca} I_{sca}(\lambda, \mathbf{n}_{sca}) \quad (1)$$

with r^2 the distance from the particle. The scattered intensity I_{sca} is defined from the incident Stokes vector as follows:

$$I_{sca} = \frac{1}{r^2} (Z_{11} I_{inc} + Z_{12} Q_{inc} + Z_{13} U_{inc} + Z_{14} V_{inc}), \quad (2)$$

Note that, in Eq. (2), the spectral and directional dependency are omitted for clarity. For a spherical particle, we assume that the incident light propagates along the positive z -axis of the laboratory reference frame ($L(x, y, z)$) and that the xz -plane with $x \geq 0$ is the meridional plane of the incident beam. In this case, the Stokes vector of the scattered beam can be computed with respect to its own reference plane and the phase matrix can be written as:

$$\begin{aligned} \tilde{Z}(\lambda, \mathbf{n}_{sca}, \mathbf{n}_{inc}) &= \tilde{F}(\lambda, \theta) \tilde{L}(\phi) \\ &= \begin{pmatrix} F_{11}(\lambda, \theta) & F_{12}(\lambda, \theta) \cos 2\phi & -F_{12}(\lambda, \theta) \sin 2\phi & 0 \\ F_{12}(\lambda, \theta) & F_{22}(\lambda, \theta) \cos 2\phi & -F_{22}(\lambda, \theta) \sin 2\phi & 0 \\ 0 & F_{33}(\lambda, \theta) \sin 2\phi & F_{33}(\lambda, \theta) \cos 2\phi & F_{34}(\lambda, \theta) \\ 0 & -F_{34}(\lambda, \theta) \sin 2\phi & -F_{34}(\lambda, \theta) \cos 2\phi & F_{44}(\lambda, \theta) \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (3)$$

with θ and ϕ the zenith and azimuthal angle of the scattered radiation and $\tilde{L}(\phi)$ the rotation matrix (see Fig. 4.6 p. 96 in [22]). The scattering matrix $\tilde{F}(\lambda, \theta)$ describing the light scattering is independent on the particle orientation and is constant with respect to the azimuth. Combining Eq. (1-3), the backscattering cross section can be written as follows:

$$C_{sca}^{bb}(\lambda) = 2\pi \int_{\pi/2}^{\pi} F_{11}(\lambda, \theta) \sin(\theta) d\theta \quad (4)$$

In marine optics, most of the commercial instruments do not measure the scattering of individual particles, so the particle community is treated in bulk. Consequently, modelling approaches have to take into account the particulate size distribution (PSD) (units, number of

particles per unit volume) that describes how particulate concentration varies with size. The ensemble-averaged quantities are defined as:

$$\langle X \rangle = \int_{d_{min}}^{d_{max}} n(d) \times X(d) dd, \quad (5)$$

with X standing for $F(\lambda, \theta)$, $C_{sca}(\lambda)$ and $C_{sca}^{bb}(\lambda)$. In theoretical modelling, the integration of the PSD over the size range is often set to unity so that radiative transfer computations are independent on the particle concentration. It results that the backscattering coefficient (b_b , units m^{-1}) and the volume scattering function (VSF, units $m^{-1}sr^{-1}$), commonly used in the formalism of marine optics, are defined from ensemble-average quantities as follows:

$$\beta(\lambda, \theta) = \langle F_{11}(\lambda, \theta) \rangle \times \frac{N}{V} \quad (6)$$

and

$$b_{bp}(\lambda) = \langle C_{sca}^{bb}(\lambda) \rangle \times \frac{N}{V}, \quad (7)$$

with N/V the particle concentration (particles per cubic meter).

4. *In situ* measurements of backscattering

In seawater, b_b and β can be partitioned into their water and particulate components: (β_w and b_{bw}) and (β_p and b_{bp}), respectively. Measurements of the VSF involve performing a very large number of measurements at discrete angles over the full angular range (from 0° to 180°). Instruments satisfying this requirement exist but are not commercially available [23, 24]. For twenty years, b_{bp} has been retrieved using a single VSF measure or a couple of VSF measures in the backward direction. For example, the WET Labs ECO-VSF measures $\beta(\theta)$ at three centroid angles (104° , 130° and 151°) and one wavelength, whereas the WET Labs ECO-BB or the HOBI Labs Hydrosat realize multi-wavelength measurements at a single angle ($\theta_s=124^\circ$ for ECO-VSF and $\theta_s=140^\circ$ for Hydrosat).

For multiple angle measurements, the VSF is simply integrated assuming a constant angular shape whatever the oceanic environments. Sullivan and Twardowski, 2009 found a remarkable consistency in shape of particulate VSF in the backward directions using a large dataset of three millions VSF measurements over oceanic and coastal waters. As only a few measurements are made, b_b is integrated over a polynomial fit to the available data.

For a single measurement of the VSF, b_b can be estimated using a conversion coefficient, named the χ factor. VSF shape analysis from Mie calculations or *in situ* measurements demonstrated that $\beta(\theta)$ at a single angle θ_s greater than 90° provides a good proxy for b_b ([25–30]):

$$b_b = 2\pi \chi(\theta_s) \beta(\theta_s) \quad (8)$$

Similar nondimensional variables ($\chi_w(\theta_s)$ and $\chi_p(\theta_s)$) can be introduced for each constituents (pure water and particles) to derive b_{bw} and b_{bp} from $\beta_w(\theta_s)$ and $\beta_p(\theta_s)$. In the vicinity of θ_s of 117° - 120° , $\chi_w(\theta_s)$, $\chi_p(\theta_s)$ and $\chi(\theta_s)$ are equal and errors in backscattering estimates are reduced to a few percent. For measurements at other angles than 117° , Boss and Pegau, 2001 suggested that the contribution of pure water (i.e., $\beta_w(\theta_s)$) to the total VSF should be removed before the conversion to yield more accurate estimates:

$$b_{bp} = 2\pi \chi_p [\beta(\theta_s) - \beta_w(\theta_s)] \quad (9)$$

Values of $\beta_w(\theta_s)$ and b_{bw} , obtained from Zhang et al., 2009, are expected to be the most accurate at this time with an accuracy around 2%. Values of $\beta_w(\theta_s)$ and b_{bw} depend on temperature and

salinity and are obtained for depolarization factor of 0.039. Sullivan et al., 2013, who examined the values of χ_p as a function of θ_s showed that χ_p has the lowest uncertainty in the range 110° - 120° : mean value of χ_p is around 1.0 and the standard deviation is around 0.03%.

5. Bead method calibration

Our objective is to convert FWS and SWS magnitudes, measured by a CytoSense at 488 nm, into scattering cross sections (C_{sca}^{FWS} and C_{sca}^{SWS} , respectively). For this purpose, we calculated the forward (W_{FWS}) and sideward (W_{SWS}) weighting functions, used to describe the optical response of the two detectors, as a function of the scattering angle θ . Light is scattered from each particle through the flow cell walls onto the forward and sideward collection lens and then reaches the forward or sideward detector. The optical response of the forward detector is proportional to the area enclosed by a circle corresponding to the projection, onto the collection lens, of a cone of light, with a major half-angle of θ . Moreover, the FWS weighting function accounts for the refraction of light through the water-quartz glass interface and then through the quartz glass-air interface. Real refractive indices are $m_{HS}=1.46$ and $m_w=1.34$ for the quartz glass and water, respectively. This leads to:

$$W_{FWS}(\theta) = \pi \times [d_1 \tan(\theta) + d_2 \tan(\beta) + d_3 \tan(\gamma)]^2 \quad (10)$$

with

$$\beta = \sin^{-1} \left(\frac{m_w}{m_{HS}} \sin \theta \right) \quad (11)$$

$$\gamma = \sin^{-1}(m_w \sin \theta) \quad (12)$$

The distance d_1 is the distance from the particle to the flow cell wall (= 0.0005 m); d_2 is the thickness of the flow cell wall, (= 0.002 m); and d_3 is the distance between the cuvette to the collection lens (= 0.017 m). As the sideward scattering is too complex, a sine function was chosen to represent the weighting function as previously done by Green et al., 2003. The following relationship gave the best agreements between cytometric measurements and Mie theory:

$$W_{SWS}(\theta) = \sin \left[\frac{\pi}{2} - \sin^{-1}(m_w \sin \theta) \right] \quad (13)$$

For each detector, each weight $W(\theta)$ is normalized so the sum of all $W(\theta)$ is equal to unity.

Considering the CytoSense design, ignoring a multiplication factor, the Stokes parameters of the incident light are defined by $(I, 0, (2\alpha - 1)I, 0)$ with α the fraction of light coming from the beam with a $+45^\circ$ polarization. As the forward detected signal is the sum of the intensity of the two forward detectors, it is proportional to: $Z_{11}(\theta)I + (2\alpha - 1)Z_{13}(\theta)I$ with $Z_{11}(\theta)$ and $Z_{13}(\theta)$ the elements of the phase matrix (Eq. (3)). For the sideward detector with no polarizer, the detecting signal (SWS) is also proportional to $Z_{11}(\theta)I + (2\alpha - 1)Z_{13}(\theta)I$. For spherical particles, the integration of $Z_{13}(\theta) = -F_{12}(\lambda, \theta) \sin 2\phi$ over the azimuth angle is null and consequently the forward or sideward signal is only a function of $Z_{11}(\theta)I (= F_{11}(\theta)I)$, according to Eq. (3)). It means that for spherical particles, the FWS and SWS detected signals do not depend on the polarization state of the incident light.

For a given particle, the phase function is computed from Mie theory considering the particle size and refractive index. The phase function and the weighting function are computed in 0.1° increments and their product is then numerically integrated across 2° - 15° (Eq. (14)) and 45° -

135° (Eq. (15)) to calculate the theoretical forward and sideward cross sections:

$$FWS_{Mie} = \sum_{\theta=2^{\circ}}^{\theta=15^{\circ}} W_{FWS}(\theta) F_{11}(\theta) \sin(\theta) d\theta \quad (14)$$

$$SWS_{Mie} = \sum_{\theta=45^{\circ}}^{\theta=135^{\circ}} W_{SWS}(\theta) F_{11}(\theta) \sin(\theta) d\theta \quad (15)$$

The upper and lower limits (2°-15°) and (45°-135°) correspond to the field of view of the forward and sideward detectors. These estimates include the refraction at exiting the quartz.

Polystyrene (PS) beads of several sizes (1.0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 10.0, 20.0, 25.0, 45.0, 75.0, 90.0 μm) (Polysciences Inc., cat. 07310-15, 17133-15, 17134-15, 17135-5, 07312-5, 17136-5, 18329-5, 07313-5, 07314-5, 24049-5, 07315-5) are used to compare the theory-based estimates (FWS_{Mie} and SWS_{Mie}) (Eqs. (14) and (15)), and the CytoSense measurements (FWS_{cyto} and SWS_{cyto}) for forward and sideward scattering. For a bead with a diameter d , the signal as measured by the CytoSense FWS_{cyto} (in numerical counts, NC) is converted into forward or sideward cross section (μm²) using a reference bead (RF):

$$FWS(d) = \frac{FWS_{Mie}(RF)}{FWS_{cyto}(RF)} \times FWS_{cyto}(d). \quad (16)$$

The same equation can be written for the sideward scattering with SWS instead of FWS. The refractive index of polystyrene is 1.20 relative to pure water at 488 nm. Beads are supposed to be non-absorbing. Images obtained from scanning electron microscopy (SEM LEO 438VP, accelerating voltage of 15 keV with a beam current of 10 pA) show that PS beads are uniform spheres. For each size samples, diameters of a hundred of beads randomly chosen were measured from micrographs. Results show that the measured mean diameter is close to the diameter indicated by the manufacturer and the coefficients of variation range between 1 and 10% according to the bead size.

For each detected particles, the CytoSense records the complete pulse shape, as opposed to single datapoints in conventional flow cytometers. By integrating the complete pulse shape, we can reconstruct the entire signal scattered by the particle in the forward and sideward directions. The integrated FWS and SWS are then reported on cytograms. Eleven clusters corresponding to the eleven samples of different bead sizes were selected from cytograms using CytoClus software. For each cluster, we calculated the mean FWS and SWS signals and their coefficients of variation. For the PRECYM CytoSense, coefficients of variations range between 1.6% and 8.4% for forward scatter and between 0.7% and 20.2% for sideward scatter. Figure 2 compares the forward and sideward scattering cross section as predicted by Mie theory and measured by the PRECYM CytoSense, as a function of the particle diameter. Microspheres of 10 μm diameter were selected as reference particles as they were in the middle of the distribution in particle size. For forward scattering, the linear regression between Mie estimates and cytometric measurements gives a coefficient of determination R^2 of 0.88. Absolute relative differences ΔE , between Mie and CytoSense estimates, are between 4.8% and 88.1% with a mean value of 27.9%. ΔE of 88.1% is obtained for beads with a diameter of 3 μm. If we disregarded 3 μm beads, ΔE are between 4.8% and 48.7%, and the mean value decreases (= 21.3%). For sideward scattering, ΔE are between 10.5% and 87.5% with a mean value of 41.8%. Highest ΔE are obtained for largest particles. Good agreements are observed especially in the size range of 1 to 20 μm. If we considered only particles less than 25 μm, the mean ΔE decreases from 41.8% to 20.1% for SWS. Note that mean absolute relative differences have the same order of magnitude as values previously observed by Ackleson and Spinrad, 1988 on a similar exercise realized from measurements of the Coulter EPICS V flow cytometer. The authors found mean ΔE of 16.9% for FWS and 30.1% for SWS considering beads between 1.5 and 32 μm.

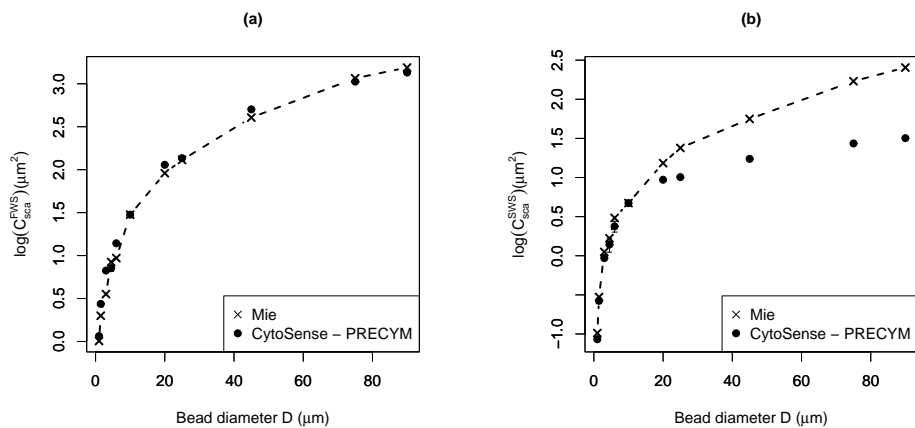


Fig. 2. Comparison of measured scattering cross sections (dots) and scattering cross sections as predicted by Mie theory (crosses) in (a) forward and (b) backward directions for the PRECYM CytoSense.

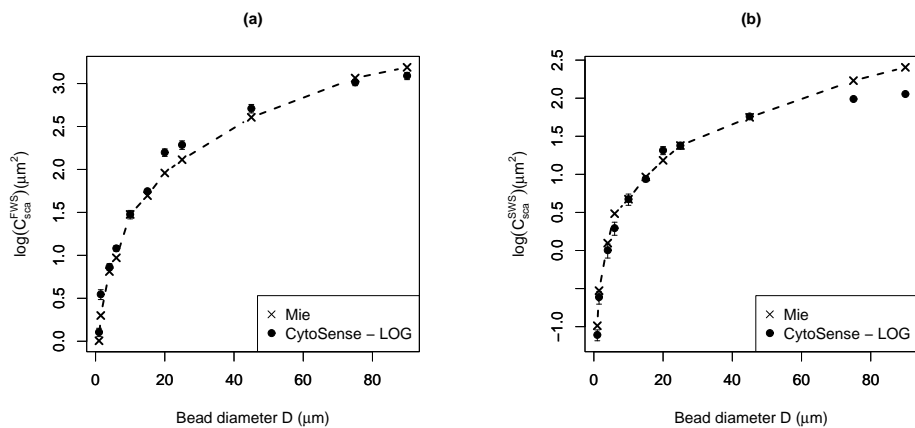


Fig. 3. Same as Fig. 2 for the LOG CytoSense.

The PRECYM CytoSense tends to underestimate the scattered for large particles, especially in the sideward direction. It is due to the saturation of the photomultipliers (PMT's) used for the detection of sideward scattering. To test this hypothesis, measurements on polystyrene beads were realized with another CytoSense belonging to the LOG laboratory (<http://log.univ-littoral.fr/>). The LOG CytoSense is quasi-identical to the PRECYM CytoSense, except that it is equipped with two different sets of photomultiplier tubes with low and high sensitivity (instead of one single PMT's set for the PRECYM CytoSense). As expected, Figure 3 shows that the signal saturation of SWS detectors is less pronounced for the LOG instrument. It results that the LOG instruments give better estimates for large particles. For FWS, ΔE range between 11% and 76% with a mean relative difference (ΔE) of 33.7%. For SWS, ΔE range between 0.2 and 55%, with a mean value of to 23.9%. For particles with diameters below 60 μm , the maximum ΔE value is equal to 35%. Over the vertical height of 5 μm the initial light distribution of the resulting laser beams remains approximately more or less Gaussian. Consequently, the assumption of Mie theory considering the spatial distribution of incident radiation as homogeneous, can be a source of errors. This point has already been discussed by Ackleson and Spinrad, 1988. As the differences between predicted and observed cross sections did not increase with particle size, Ackleson and Spinrad, 1988 concluded that errors due to Mie assumption were probably small because the horizontal dimension of the laser beam was large relative to the size of the particles. When we considered the LOG CytoSense and particles between 1 and 40 μm (no light saturation of the FWS and SWS detectors), we did not observe a increase of errors with the particle size. As microspheres are smaller than the horizontal dimension of the beam, we assume, as in Ackleson and Spinrad, 1988, that the Mie theory can be used in this calibration exercise.

6. Backscattering estimates from CytoSense

Table 1. Statistical relationship between the sideward and the backward cross sections, $C_{sca}^{bb}(488\text{nm}) = 10^B \times [C_{sca}^{SWS}(488\text{nm})]^A$, calculated from theoretical computations for homogeneous and two or three-layered spheres.

Model*	A	B	R^2
100%	1.16	-0.77	0.96
80%-20%	1.10	-0.52	0.98
70%-30%	1.12	-0.59	0.98
60%-40%	1.14	-0.62	0.98
80%-10%-10%	1.11	-0.51	0.95
80%-18.63%-1.37%	1.09	-0.51	0.87

*Percentages are the relative proportions of the cytoplasm, chloroplast and silica wall. 100% represents an homogeneous sphere.

The angular dependence of phase functions, observed from literature, seems to present a constant proportionality between the sideward scattering and the backscattering. The objective of this section is to develop a theoretical relationship to convert C_{sca}^{SWS} into C_{sca}^{bb} from radiative transfer simulations.

The Meerhoff Mie program, version 3.0, [33] and the Scattnlay algorithm [34, 35] were used to simulate the scattering and absorbing properties of homogeneous and multi-layered spheres, respectively. The Mie code is mainly used to simulate scattering properties of reference beads (polystyrene and silica beads), whereas the Scattnlay algorithm is dedicated to model

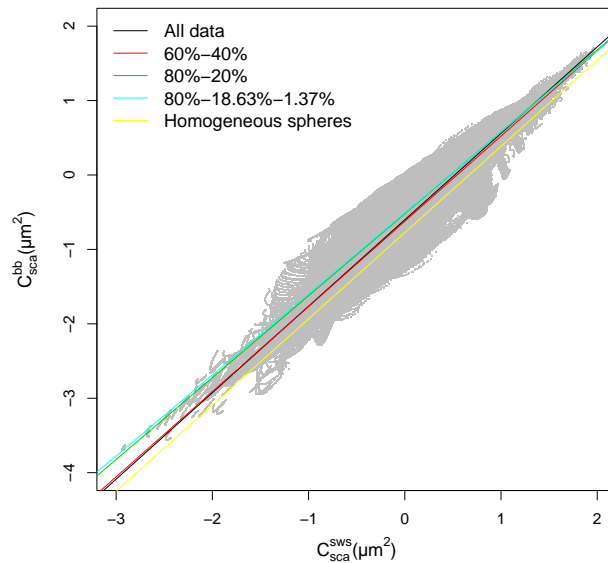


Fig. 4. Backscattering cross section as a function of sideward scattering cross section. Color lines corresponds to regression slopes performed for the whole dataset (black), homogeneous spheres (yellow), two-layered spheres (red and green) and three-layered spheres (light blue)

phytoplankton cells. The phase function is simulated, from 0° to 180° , in 0.2° increments. The 0.2° increments are required to obtain accurate numerical integrations. The theoretical phase function will be integrated later over θ to calculate theoretical sideward scattering cross section (C_{sca}^{sws}) as measured by a CytoSense and the theoretical backscattering cross section (C_{sca}^{bb}).

In marine optics, suspended particulate matter includes particles with sizes ranging between 0.2 and $200 \mu\text{m}$ in diameter ([36]). The lower bound is an operational cutoff value between dissolved and particulate material, corresponding to the pore size of a polycarbonate membrane filter. The upper bound stands for the upper bound of particles that can still be assumed to be distributed as a continuum in operational optical measurements. Although contemporary CytoSenses and other flow cytometers can analyse smaller particles, radiative transfer simulations were limited to particles with diameters larger than $1 \mu\text{m}$ for practical reasons. Moreover, due to the saturation of PMT's, C_{sca}^{sws} estimates are correct for particles with a diameter up to $20 \mu\text{m}$ and $40 \mu\text{m}$, for PRECYM and LOG CytoSense, respectively. Consequently, simulations are carried for diameters between 1 to $40 \mu\text{m}$.

Firstly, phytoplankton cells are considered as homogeneous spheres. Values of m_r , from 1.03 to 1.09 , corresponds to cells with a high water content. The imaginary part m_i spans from 0.001 to 0.015 with an upper limit associated with strongly absorbing bands of photosynthetic pigments ([2, 3, 12]). Secondly, the morphology of phytoplankton cells is modeled as a two or three-layered sphere. The inner layer stands for the cytoplasm, which dominates the cell volume and is considered weakly absorbing as it is mostly composed of water. For two-layered spheres, the outer layer represents the chloroplast containing highly-absorbing pigment-protein, responsible for photosynthesis. For three-layer spheres, the chloroplast is the middle layer and

the outer layer is the frustule, a silica wall. An exhaustive review of appropriate relative volume and refractive index ranges for cellular chloroplast, cytoplasm and frustule were realized by Bernard et al., 2009, from the available literature. In our computations, for the three-layered sphere model, the relative proportions of cytoplasm/chloroplast/silica wall are 80%-18.63%-1.37% and 80%-10%-10%. For the two-layered spheres model, the relative proportions of cytoplasm/chloroplast are: 80%-20%, 70%-30% and 60%-40%. The complex refractive indices of cytoplasm ($m_r(\text{cyto}) + i m_i(\text{cyto})$) and silica wall ($m_r(\text{wall}) + i m_i(\text{wall})$) are set equal to $1.02 + i 2.07E10^{-4}$ and $1.07 + i 0.0001$, respectively. Concerning the chloroplast, $m_r(\text{chloro})$ and $m_i(\text{chloro})$ are chosen so that the equivalent m_r and m_i of the phytoplankton cell are between values of m_r and m_i selected for homogeneous spheres. Volume equivalent m_r and m_i are calculated from the Gladstone-Dale relationship [37]:

$$\sum_j m_r^j V_j = m_r \sum_j V_j \quad (17)$$

where the subscript j ($=1,2$ or $1,2,3$) refers to the j -th component and V_j is the respective volume of the j -th layer. In the same way, Eq.(17) can be written for m_i . Note that $m_r(\text{chloro})$ and $m_i(\text{chloro})$ as calculated from the Gladstone-Dale formula range between published values of chloroplast refractive indices [38].

From the synthetic database made up of 495,900 computations realized at 488 nm, the relationship between C_{sca}^{SWS} and C_{sca}^{bb} is examined. Figure 4 suggests that the theoretical relationship follows a power law:

$$C_{sca}^{bb}(488nm) = 10^B \times [C_{sca}^{SWS}(488nm)]^A, \quad (18)$$

with A and B the slope and the intercept of the regression calculated from data in log space. For the whole dataset, $A = 1.16$ and $B = -0.60$, and the coefficient of determination R^2 is of 0.95. If we consider the different models independently, the regression slope varies between 1.09 and 1.16 and the intercept varies between -0.51 and -0.77 (Fig. 4 and Table 1). It shows that the model (homogeneous or heterogeneous with two or three layers) impacts the scattering of data around the mean relationship calculated over the whole dataset. As expected homogeneous particles have a smaller C_{sca}^{bb} for a given C_{sca}^{SWS} (due to the weaker intercept) confirming that homogeneous particles backscatter less than heterogeneous particles. Particle diameter, refractive index (real and imaginary part) impacts the scattering of data and their influence varies according the considered model (Figs. 5, 6, 7). For homogeneous particles, the scattering of data seems to be more impacted by the real refractive index than by the particle size. Data corresponding to particles with d ranging between [1-10] μm , [10-20] μm , [20-40] μm , are dispersed along the slope (Fig. 5(a)) (with small C_{sca}^{SWS} and C_{sca}^{bb} corresponding to small sizes), whereas data corresponding to particles with m_r between [1.03-1.05], [1.05-1.07], [1.07-1.09] are dispersed from either side of the regression (Fig. 6(a)). Similar observations can be done for the two-layered particles corresponding to the 60%-40% model. However, this is not the case, for example, for the 80%-18.63%-1.37% or 80%-20% model where data corresponding to d between 1-10 μm and 10-20 μm overlap data corresponding to different ranges of m_r and m_i (Figs. 5-7(b) and Figs. 5-7(d)). In these cases, the scattering of data results from a combination of the influence of d , m_r and m_i . Smallest R^2 values are observed for three-layered spheres with R^2 around 0.9. The refractive index greatly influences the scattering of heterogeneous particles when the relative proportions of the peripheral layers is greater. It is consistent with Bernard et al., 2009's findings who showed that the real refractive index of any peripheral layer can be considered as one of the most important parameters causing variations on backscattering. For applications in a natural environment, it is obvious that C_{sca}^{SWS} will be converted into C_{sca}^{bb} using the regression performed on the whole dataset (Eq. (18), with $A = 1.16$ and $B = -0.60$) as in natural environments the morphology of particles is unknown in most cases.

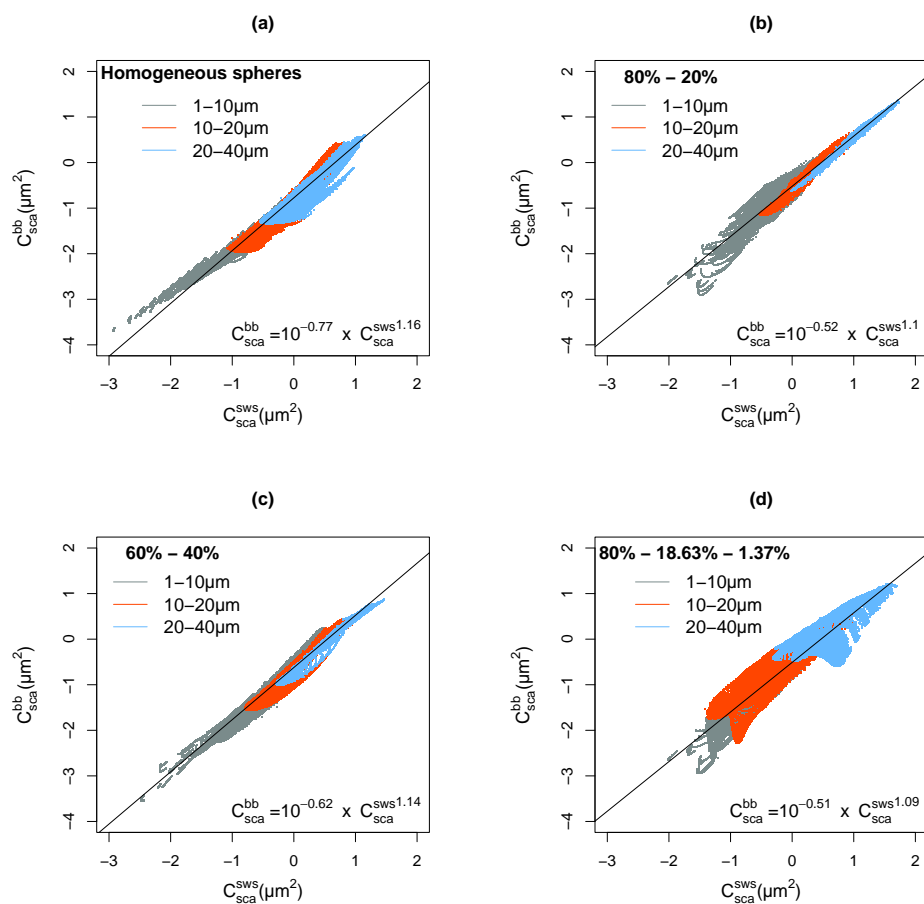


Fig. 5. Backscattering cross section as a function of sideward scattering cross section. (a) homogenous spheres (b)-(c) heterogenous spheres with 80%-20% and 60%-40% of relative proportions of cytoplasm and chloroplast (d) heterogenous spheres with 80%-18.63%-1.37% of relative proportions of cytoplasm, chloroplast and silica wall. A distinction is made between data corresponding to different diameters: $1 \leq d < 10 \mu\text{m}$ (grey dots), $10 \leq d < 20 \mu\text{m}$ (red dots), $20 \leq d \leq 40 \mu\text{m}$ (blue dots).

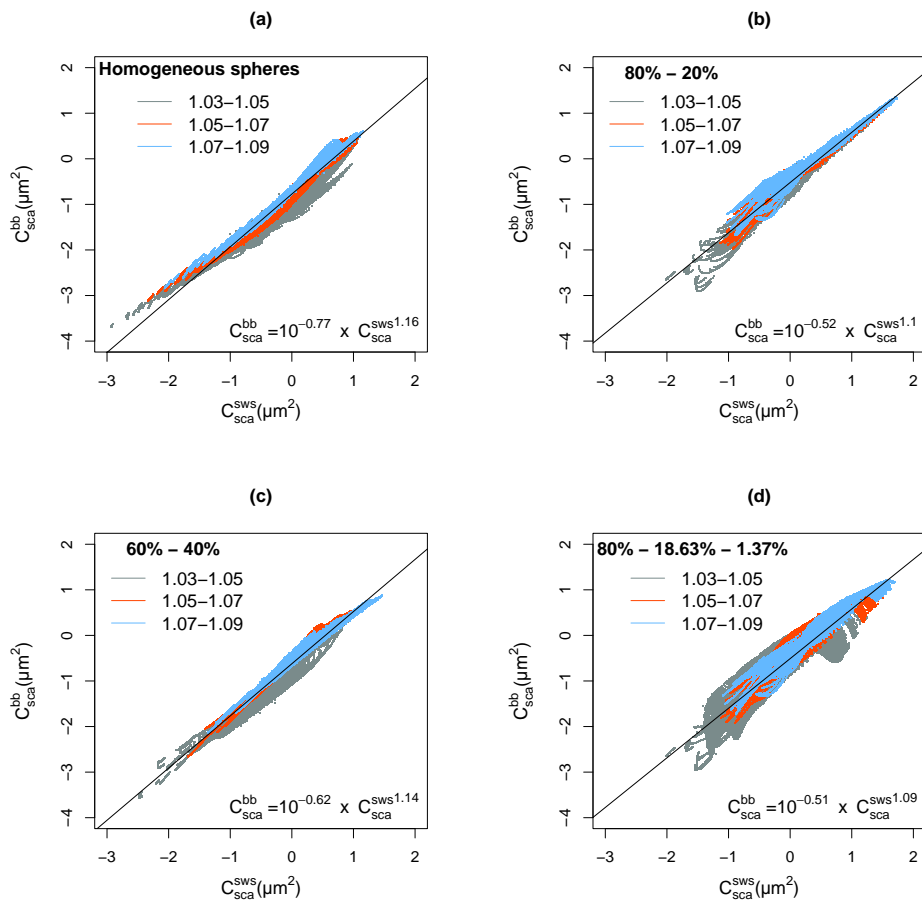


Fig. 6. Same as Fig. 5. A distinction is made between data corresponding to different volume equivalent refractive indices (real part): $1.03 \leq m_r \leq 1.05$ (grey dots); $1.05 < m_r \leq 1.07$ (red dots) and $1.07 < m_r \leq 1.09$ (blue dots).

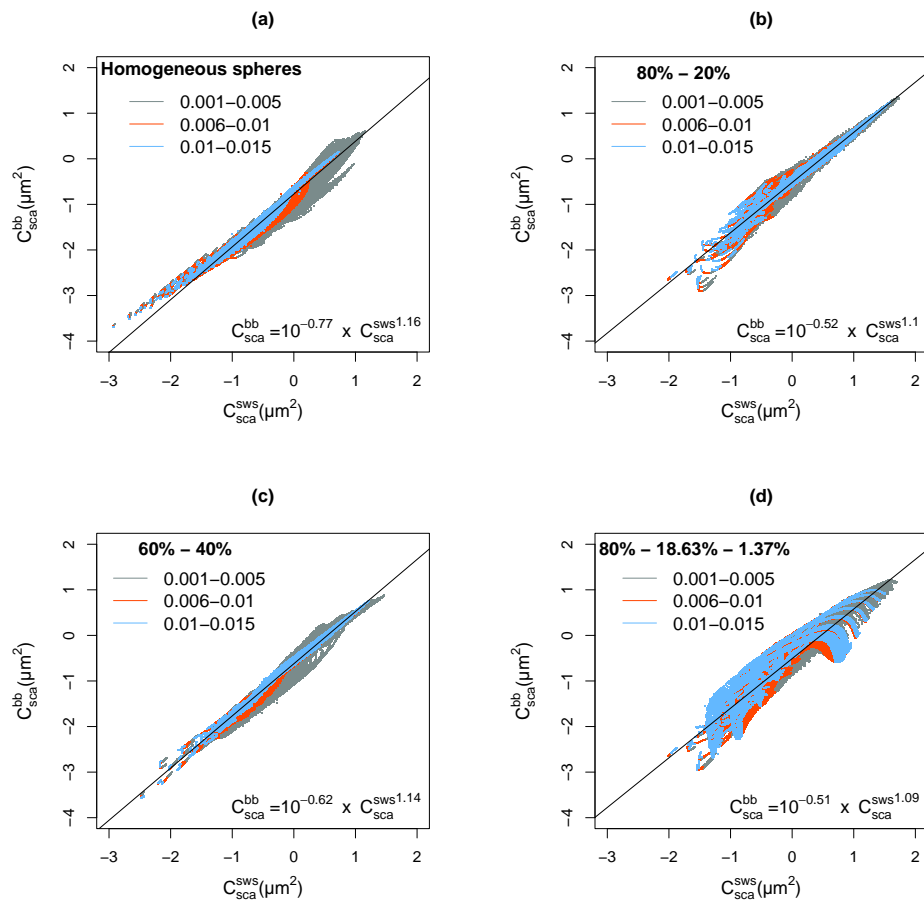


Fig. 7. Same as Fig. 5. A distinction is made between data corresponding to different different volume equivalent refractive indices (imaginary part) : $0.001 \leq m_i < 0.005$ (grey dots); $0.006 \leq m_i < 0.01$ (red dots) and $0.01 \leq m_i \leq 0.015$ (blue dots).

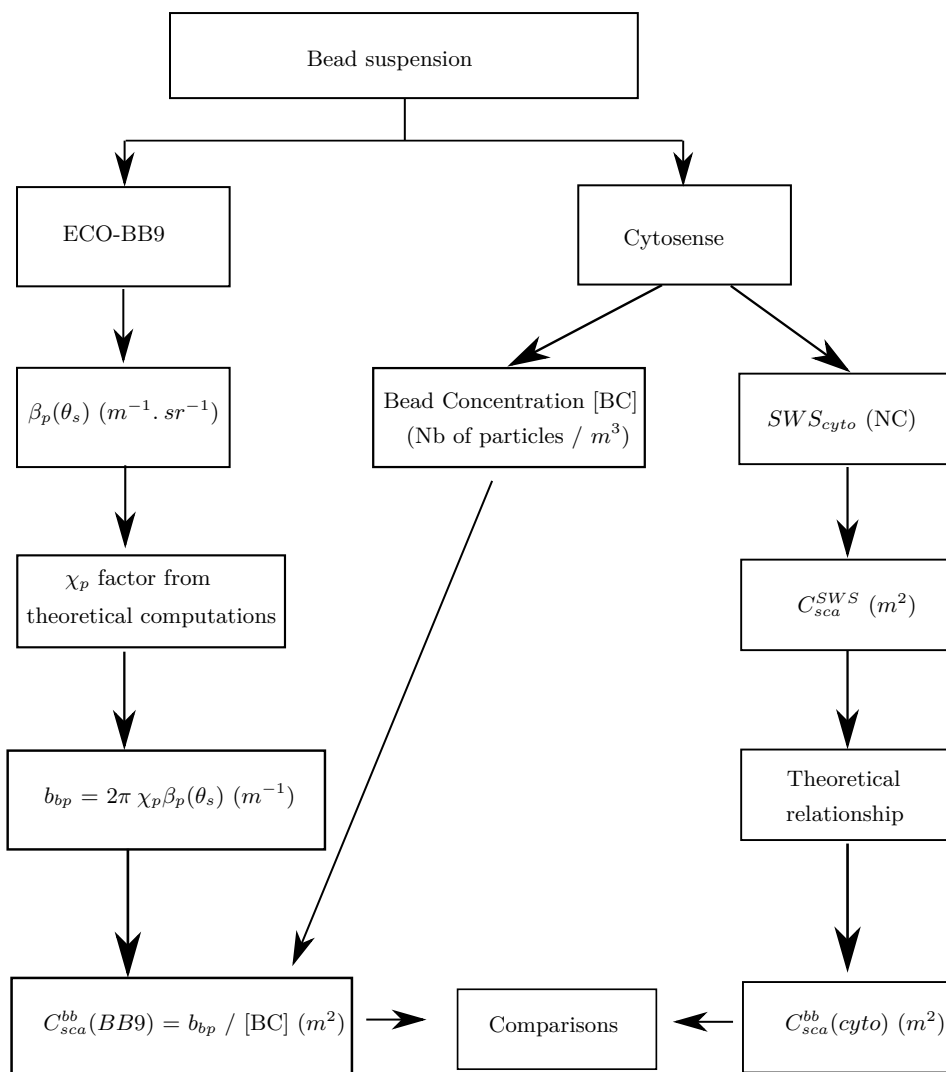


Fig. 8. Flowchart showing how CytoSense measurements and ECO-BB9 are converted into backscattering cross section to be compared

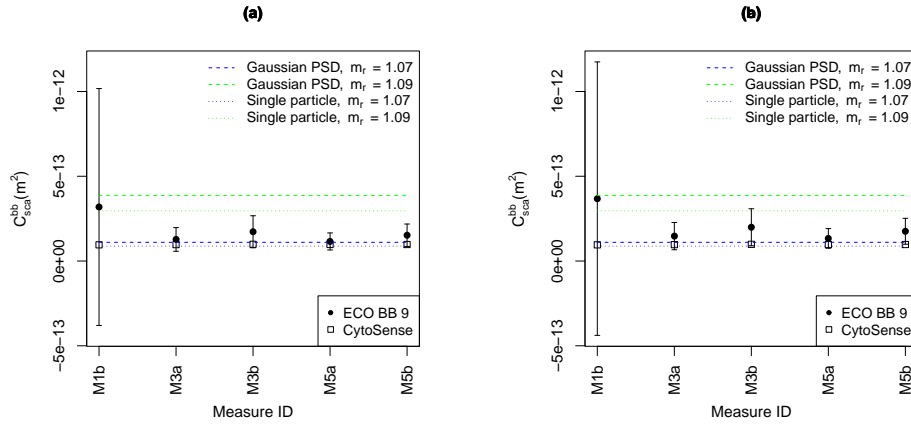


Fig. 9. Optical backscattering cross section of silica beads ($5 \mu\text{m}$ in diameter) from ECO-BB9 (black dots), CytoSense (open squares) and Mie theory with $m_r = 1.07$ (blue lines), and 1.09 (green lines). Dotted and dashed lines correspond to simulations for perfect monodispersion and gaussian PSD with a CV of 30%, respectively. Error bars stand for the standard deviation over the mean C_{sca}^{bb} (BB9). Standard deviation over the mean C_{sca}^{bb} (cyto) are not represented as it is small compared to standard deviation over the BB9 cross section. ECO-BB9 signal was converted using (a) χ_p of 1.1 (b) χ_p of 1.27

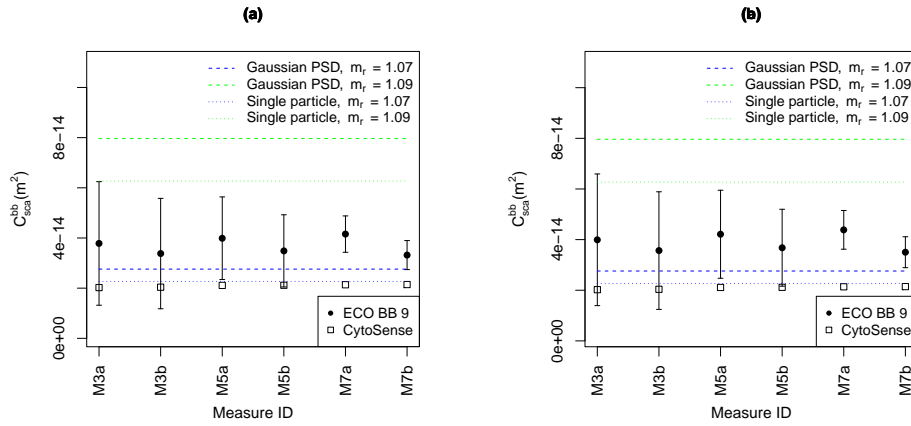


Fig. 10. Same as Fig. 9 but for $3 \mu\text{m}$ beads. ECO-BB9 signal was converted using (a) χ_p of 1.26 (b) χ_p of 1.33

7. Comparison

This section is dedicated to the comparison of the backscattering cross-section C_{sca}^{bb} as estimated from cytometric measurements and the backscattering coefficient of particles b_{bp} as measured by the WET Labs ECO-BB9 backscattering sensor (at 440, 488, 510, 530, 595, 650, 676, 715, 865 nm). The backscattering coefficient of particles is related to the backscattering coefficient cross-section C_{sca}^{bb} of a single particle using N/V the particulate concentration (particles per cubic meter) as shown in Eq. (7). Measurements of the VSF were conducted in a cylindrical polyethylene black tank (20.0 cm in diameter and 40.6 cm deep). The inside walls of the tank have a minimally reflective surface as they are black and flat. The tank was filled with 20 liters of Milli-Q water and measurements were performed to check for reflections in the tank. The instrument was handled vertically and lowered into the container until its face (with optical windows) was about 5 cm from the bottom. The instrument was then raised in steps and measurements were performed until no further changes in the raw signal, due to reflection on the walls of the tank, were observed. The backscattering remains constant when the instrument face is about 15 cm from the bottom. In this study, all measurements were realized with the instrument face immersed approximately 10 cm below the air-water interface (20 cm from the bottom of the tank). The experiment was conducted under dark conditions to prevent extraneous light entering the tank.

Comparisons between C_{sca}^{bb} (*cyto*) and C_{sca}^{bb} (*BB9*) were realized on dilutions of silica microspheres (Bangs Laboratories, Inc.) of 3 (L020503D-5412) and 5 (L100218C-9601) μm in diameter (Fig. 8). Beads were sonicated prior to use as recommended by the manufacturer. First, a steady clean-seawater baseline was measured to estimate the backscattering of pure water and if the Milli-Q water is contaminated, the backscattering of bacteria. The acquisition time was approximately 2 minutes with a sampling rate of 1Hz for the ECO-BB9 at 488 nm. The mean dark offset was calculated for each sensor over the corresponding time period. Then 1 or 2 ml of bead suspension were, several times, put into the tank to perform measurements on different bead concentrations. For each bead addition, the suspension was mixed up manually for approximately 3 minutes to obtain a homogeneous concentration. Measurements were performed with the ECO-BB9 and a water sample is taken for cytometric analysis. The raw signal was averaged over the acquisition time and the standard deviation was calculated. The mean signal was converted into $\beta_p(\theta_s)$ by first subtracting the mean dark offset, and then by multiplying the resulting value by the scaling factor as provided by WET Labs. Note that the last calibration of the instrument was realized December 18, 2013 and the experiment was conducted less than 4 months after this date (April, 2014). The ECO-BB9 single measurement $\beta_p(\theta_s)$ was converted into backscattering coefficient of particles as explained in section 4 using a χ_p factor. The ECO-BB9 measurements show a linear response of the backscattering signal to the bead addition (not shown here). It highlights that no tank effects and no multiple scattering occurred.

The χ_p factors, based on average phase functions from natural and poly-dispersed particle population, are not valid for monodispersions of beads. The phase function of a quasi monodispersed population is not smooth but exhibits a sequence of maxima and minima in the backward direction [22], contrary to the phase function for natural populations. The χ_p values for quasi monodispersed particles as reference bead were examined using Mie computations. As the real refractive index of silica beads is between 1.07 and 1.09 according to Bang Laboratories Inc., Mie computations were conducted for m_r of 1.07, 1.08 and 1.09. Mie computations were realized for silica beads modeling the particle size distribution (PSD) according to a Gaussian shape with a mean diameter of 3 or 5 μm and using a coefficient of variation (CV) of 30 %. The bead supplier indicated a coefficient of variation of 15% but measurements of bead diameters from scanning electron micrographs showed a higher coefficient of variation, around 30%. A non-negligible fraction of smaller or larger beads is observed. Larger beads are mainly

Table 2. Estimates from CytoSense - Silica beads of 3 μ m

Volume of the bead bead suspension (ml)	Sample ID	Number of particle $\times 10^{11}$ per m ³	Mean SWS $\times 10^{-12}$ (m ²)
3.0	M3a	1.3122	0.097
3.0	M3b	1.5010	0.097
5.0	M5a	4.5519	0.100
5.0	M5b	5.0954	0.100
7.0	M7a	7.2906	0.101
7.0	M7b	8.3442	0.0102

Table 3. Estimates from CytoSense - Silica beads of 5 μ m

Volume of the bead bead suspension (ml)	Sample ID	Number of particle $\times 10^{11}$ per m ³	Mean SWS $\times 10^{-12}$ (m ²)
1.0	M1a	0.0404	0.444
1.0	M1b	0.1735	0.434
3.0	M3a	1.1878	0.439
3.0	M3b	0.8768	0.446
5.0	M5a	2.1565	0.442
5.0	M5b	1.6367	0.442

due to two beads fused together. The angular weighting function of the ECO-BB9, $W_{bb}^{BB9}(\theta)$, is defined according to Sullivan et al., 2013 to account for the precise angular response of the sensor. Simulated values of $\beta_p(\theta)$ are multiplied by $W_{bb}^{BB9}(\theta)$ and then integrated over the field of view of the sensor to simulate the signal measured by the ECO-BB9 named $\beta_p(124^\circ)$ as the weighting function is centered around 124° .

The χ_p value is obtained according to Eq. (8) from the simulated values of $\beta_p(124^\circ)$ and b_{bp} . The χ_p factor increases with the refractive index and decreases with the particle size. It is due to the position of angular minima and extrema which slightly changes with size and refractive index. To convert $\beta_p(124^\circ)$ into b_b , two χ_p values are considered for a given diameter. For 3 μ m beads, a χ_p value, equal to 1.26 or 1.33, corresponds to m_r of 1.07 and 1.09, respectively. For 5 μ m beads, a χ_p equal to 1.10 and 1.27 corresponds to m_r of 1.07 and 1.09, respectively.

Cytometric measurements (abundance and sideward scattering) were realized twice on the same water sample to examine the reproducibility of the measurements, particularly in particle counting. Table 2 and 3 display the particle concentration and the mean SWS converted into C_{sca}^{SWS} as explained in Section 5. Samples are named M1, M3, M5 with 1, 3, and 5 corresponding to the volume of bead suspension in the container (named V in the following) and with letters (a) or (b) distinguishing the duplicates.

The variability of particulate abundance is larger when the concentration of particles decreases. It is due to variability of particle counting CV_p , which follows a Poisson's law and is inversely proportional to \sqrt{n} , where n is the number of counted particles in a given sample volume per unit time. In addition to CV_p , the instrument variability (CV_c) has to be considered. The instrument variability (CV_c) is determined from repeated measurements (5-15 times) on the

same sample and is defined as the ratio of the mean abundance to the standard deviation. From analysis of 3 μm and 10 μm bead suspensions, Thyssen et al., 2008 showed that if the number of particles is large enough within the analyzed volume (>1000), the reproducibility of particle counting was achieved with $(CV_c + CV_p) < 3\%$. Comparisons of bead counts with a CytoSense (CytoBuoy b.v.), a Moflo (Dako) and a Cytoron (Cytoron Absolute ORTHO Diagnostic Systems) cytometer were performed by Thyssen et al., 2008. Results showed similar counts within the experimental uncertainties with no systematic bias for the CytoSense [39].

For a given bead size, the sideward cross section C_{sca}^{SWS} is relatively constant whatever the sample ID (Table 2 and 3). The mean C_{sca}^{SWS} is $0.0998\text{E-}12\text{ m}^2$ and $0.4413\text{E-}12\text{ m}^2$ for beads of 3 μm and 5 μm , respectively. These values are relatively close to values calculated from Mie theory ($0.082\text{E-}12\text{ m}^2$ and $0.367\text{E-}12\text{ m}^2$) for monodisperse silica beads considering m_r equal to 1.07 and no bead absorption.

The backscattering cross sections $C_{sca}^{bb}(BB9)$ derived from the ECO-BB9 at 488 nm are shown in Figs 9 and 10 and are compared with Mie computations. Error bars represent the associated standard deviations due to the instrumental variability of the ECO-BB9. Cytometric estimates were obtained by converting the measured C_{sca}^{SWS} into $C_{sca}^{bb}(cyto)$ using the theoretical relationship developed in Section 6 with the slope and the intercept calculated over the whole dataset ($A = 1.16$ and $B = -0.60$). For a given volume of bead suspension (1, 3, 5 or 7 ml), b_{bp} as measured by the ECO-BB9 leads to two values of $C_{sca}^{bb}(BB9)$ as it is divided by the particle abundance quantified from the (a) or (b) duplicates. Results corresponding to M1a sample are not displayed on Fig. 9 because the measured abundance was too low and hence unreliable.

For 5 μm beads, values of $C_{sca}^{bb}(BB9)$ at 488 nm range between $0.115\text{E-}12$ and $0.319\text{E-}12\text{ m}^2$ for χ_p of 1.10 (Fig. 9(a), black dots) and between $0.133\text{E-}12$ and $0.368\text{E-}12\text{ m}^2$ for χ_p of 1.27 (Fig. 9(b), black dots). For 3 μm beads, values of $C_{sca}^{bb}(BB9)$ are between $0.033\text{E-}12$ and $0.042\text{E-}12\text{ m}^2$ for χ_p of 1.26 (Fig. 10(a)) and between $0.035\text{E-}12$ and $0.044\text{E-}12\text{ m}^2$ for χ_p of 1.33 (Fig. 10(b)). Note that the variability of $C_{sca}^{bb}(BB9)$ is due to variability of particulate abundance as measured by the CytoSense. These values range between C_{sca}^{bb} values computed with Mie theory considering a Gaussian PSD and a CV of 30%. The mean value of $C_{sca}^{bb}(cyto)$ is $0.097\text{E-}12 \pm 0.0011\text{E-}12$ for 5 μm beads and $0.021\text{E-}12 \pm 0.0005\text{E-}12$ for 3 μm beads. Relative differences are defined as follows:

$$\Delta E(\%) = \frac{C_{sca}^{bb}(BB9) - C_{sca}^{bb}(cyto)}{C_{sca}^{bb}(BB9)}. \quad (19)$$

For 5 μm beads, relative differences between $C_{sca}^{bb}(cyto)$ and $C_{sca}^{bb}(BB9)$ range between 15% and 70% with a χ_p of 1.1 and between 27% and 74% for a χ_p of 1.27. Note that these differences are smaller than the instrumental variability. If M1b is not considered, the upper values of ΔE becomes 43% with a χ_p of 1.1 and 50% for a χ_p of 1.27. For 3 μm beads, relative differences ΔE are more important than the instrumental variability. They are between 35% and 48% with a χ_p of 1.26 and between 49% and 59% with a χ_p of 1.33.

The bead supplier indicates that an antibacterial agent is added in bead suspensions to avoid bacteria growth. Nevertheless, silica bead suspensions of 3 and 5 μm were examined using scanning electron microscopy to check the absence of such a particle background. No bacteria or other contaminating particles were detected from SEM micrographs. Consequently, discrepancies cannot be explained by a background particle contamination in bead suspensions. Differences between $C_{sca}^{bb}(cyto)$ and $C_{sca}^{bb}(BB9)$ can be partly explained by the impact of the particulate size distribution on the measured signal. As the CytoSense measures the scattering of individual particles, its measurement is not influenced by the particle size distribution contrary to ECO-BB9 measurements. Mie computations show that C_{sca}^{bb} increases when a Gaussian PSD is considered and increases with the coefficient of variation. For example, considering 5 μm

beads and m_r of 1.07, C_{sca}^{bb} increases from 0.088E-12 for a perfect monodispersion to 0.110E-12 for a CV of 30%. For 3 μm beads, this value becomes 0.0230E-12 for a perfect monodispersion and 0.028E-12 for a CV of 30%. It implies that the minimum relative difference between CytoSense and ECO-BB9 measurements is around 20-25% and can not be attributed to uncertainties in calibrating the CytoSense, or inaccuracies introduced by the theoretical relationship used to convert C_{sca}^{SWS} into C_{sca}^{bb} . Such differences are due to the measured parameter itself which is the scattering of individual particles for CytoSense and the bulk scattering for ECO-BB9. Notice that, for 3 μm beads, the mean $C_{sca}^{bb}(\text{cyto})$ ($= 0.115\text{E-}12 \text{ m}^2$) is very close to the Mie value ($=0.110\text{E-}12 \text{ m}^2$).

Note that C_{sca}^{SWS} have been converted into C_{sca}^{bb} using the general relationship established from the 495,900 computations considering homogeneous and heterogeneous spheres. If we consider only computations corresponding to silica beads with m_i null, m_r of 1.07, 1.08 and 1.09, d between 1 and 40 μm (708 computations), the slope and the intercept are equal to 1.11 and -0.39, respectively. As these values are relatively close to A and B as previously calculated for the whole dataset, relative differences between CytoSense and VSF measurements are very close to previous ΔE values.

8. Concluding remarks

A very simple methodology has been developed to derive the backscattering cross section of individual particles from cytometric measurements. Possible sources of errors are firstly instrumental limitations and calibration errors or inaccuracies in the modelling of weighting functions. Comparisons were realized between CytoSense measurements and Mie theory on suspensions of polystyrene microspheres. Comparisons show mean absolute relative differences between 27.9% (FWS) and 41.8% (SWS). The larger relative differences have been observed on the sideward signal for large particles (above 20 μm in diameter) caused by light saturation of detectors which is more important for PMTs (sideward detectors) than for PIN photodiodes (forward detectors). For the LOG CytoSense less affected by the light saturation, the mean absolute relative differences are 33.7% (FWS) and 23.9% (SWS).

In a second step, a power law was used to convert the sideward cross section as measured by the CytoSense into the backscattering cross section. The scattering of data around the mean relationship, built from the whole dataset, introduces inaccuracies on backscattering estimates and constitutes a second source of errors. Particle diameter, refractive index (real and imaginary part) impacts the scattering of data, around the mean relationship and deviations from the mean relationship varies according the considered model (homogeneous spheres or heterogeneous spheres with two or three layers). More particularly, data points are more variable when the thickness of the outer layers is more important. Quantifying errors introduced by the use of a such mean relationship, is quite challenging as the structure and the refractive index of particles are unknown in the natural environment. Information on particle diameter could be obtained from the CytoSense measurements but cytometric estimates of particle diameter are, in some cases, inaccurate (for example diameter/length estimates from pulse shapes of small particles $< 5 \mu\text{m}$ become increasingly inaccurate with decreasing particle size).

To test the accuracy of the proposed methodology, a laboratory experiment was carried out on a suspension of silica beads to compare the backscattering cross section as measured by the ECO-BB9 backscattering sensor and the CytoSense flow cytometer. As the ECO-BB9 measures the VSF at one single angle, a conversion factor is required to derive the backscattering coefficient. As the χ_p factor defined by Sullivan et al., 2013 is valid only for natural polydispersed populations, a χ_p factor for quasi monodispersed silica beads was calculated using Mie computations. Comparisons showed relative differences of the same order of magnitude as instrumental variability. Relative differences can be quite large but they can partly be explained

by the fact that the CytoSense measures the cross section of individual particles, whereas the ECO-BB9 measures the bulk cross section.

The choice of bead suspensions instead of phytoplankton cultures was motivated by the fact that a population made up of spherical particles of known sizes can be more easily characterized. Scanning electron micrographs, realized in the framework of this study, did not show evidence for background particle contamination from submicron particle as bacteria in bead suspension. For phytoplankton cultures, the absence of non algal submicron particles as bacteria could not be guaranteed (even for axenic cultures) and submicron detritus also might have been present. In this case, direct comparison of bulk measurements and measurements on individual particles will be less obvious. Differences between the backscattering cross section as estimated by the ECO-BB9 and the CytoSense could be attributed to a “bulk effect” instead of inaccuracies coming from the proposed methodology. In future studies, it could be helpful to identify separately the impact of submicron particles as bacteria, which can impact greatly the bulk backscattering. A possible method is to perform measurements of bulk backscattering before and after filtration. Another option would be to use a CytoSense with high sensitivity performance (the trigger level of 16 mV on side scatter might be low enough to detect certain submicron particles or larger bacteria) or a dedicated cytometer to measure the bacterial abundance. Then, the bacterial backscattering cross section could be simulated from the bacterial abundance using Mie theory and the backscattering signal could be estimated by adding the bacterial contribution to the contribution of phytoplankton cells and non-living particles.

In phytoplankton cultures, particles can be non-spherical. For oriented non-spherical particles, the signal measured by CytoSense can depend on the first element of the scattering matrix Z_{11} but also on the element Z_{13} . Indeed, the scattering matrix (and so the phase matrix) becomes a function of the zenith and azimuth angles of the incident and scattered radiation and the Z_{13} element is not null. In this case, the CytoSense signal cannot be converted in terms of backscattering coefficient and comparisons with the ECO-BB9 signal are not valid. However, first radiative transfer simulations with the T-matrix code dedicated to non spherical particles in a fixed orientation [40], show that for small oriented spheroids with a weak aspect ratio, Z_{13} is negligible and particles can be considered as spherical. Consequently, the proposed methodology will be still valid. These results should be confirmed with a large database of study cases, including also computations for spheroids with a large aspect ratio and also computations of the T-matrix code dedicated to externally aggregated multi-sphere clusters in fixed orientations [41]. Note that, even if the theoretical relationship is not valid for oriented particles/aggregates with a high aspect ratio, the sideward scattering as measured by CytoSense can be still used in addition with measurements of backscattering sensors.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the support from the French Space Agency (CNES) through the TROPHY project (CNES/TOSCA program). The authors thank Prof. Alexander Cunningham (University of Strathclyde, Scotland) and Dominic Stuart (CytoBuoy, b.v., NL) for the precious advices. Thanks to Laurent Brutier (LOG/ULCO) for his technical help. We appreciate thoughtful comments from two reviewers, which helped to improve this manuscript.

Discrimination des cellules

Suite à l'analyse des cytogrammes, deux types de cellules ont été identifiées pour CHLAM et THAL : les cellules phytoplanctoniques (clusters en vert pour THAL et en bleu pour CHLAM) et les cellules en dégénérescence (Dege; cluster orange et jaune) (Figs. 7.8 et 7.9). Notons qu'une contamination des cellules de CHLAM a été observée dans les bacs de THAL (cluster bleu) (Fig. 7.8). Les cellules de CHLAM étaient identifiables par une fluorescence orange (FLO en unité arbitraire : u.a) importante tout en ayant un Total SSC (u.a) plus faible que les cellules de THAL. Comme le montre les figures 7.8 et 7.9, les cellules en dégénérescence ont un total FSC (u.a) qui correspondent aux cellules vivantes mais avec une fluorescence rouge (FLR; u.a) plus faible. Cette baisse de fluorescence est causée par une diminution de la quantité en Chl-*a*.

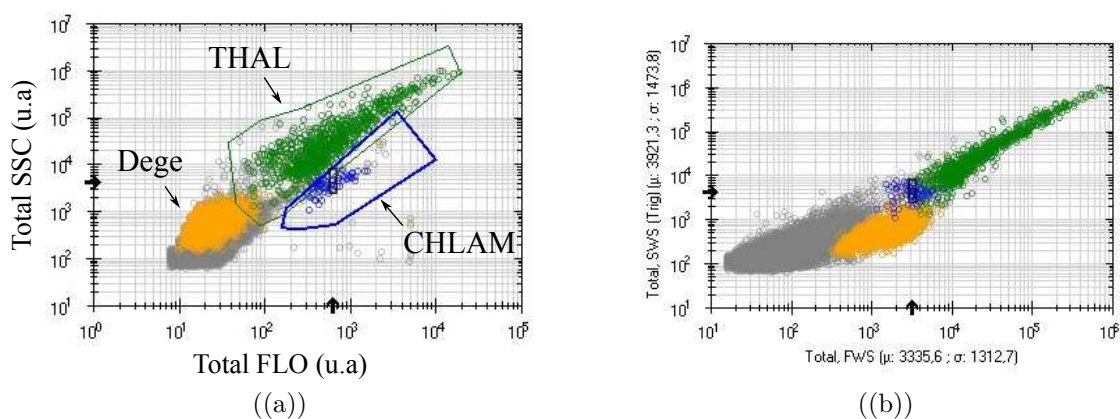


FIGURE 7.8 – Cytogrammes illustrant la discrimination des cellules de THAL (en vert), des cellules en dégénérescence (Dege; en orange) et des cellules de CHLAM (en bleu). a) Cytogramme Total FSC (u.a) vs. Total FLO (u.a) et b) cytogramme Total SSC (u.a) vs. Total FSC (u.a).

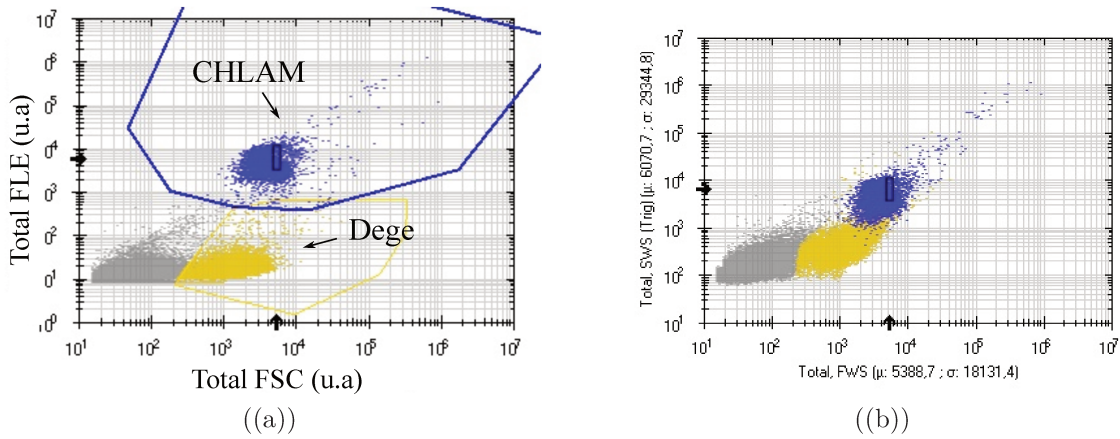


FIGURE 7.9 – Cytogrammes illustrant la discrimination des cellules de CHLAM (en bleu) et des cellules en dégénérescence (Dege; en jaune). a) Cytogramme Total FLR (u.a) vs. Total FSC (u.a) FSC et b) cytogramme Total SSC vs. Total FSC.

Descripteurs de signaux mathématiques

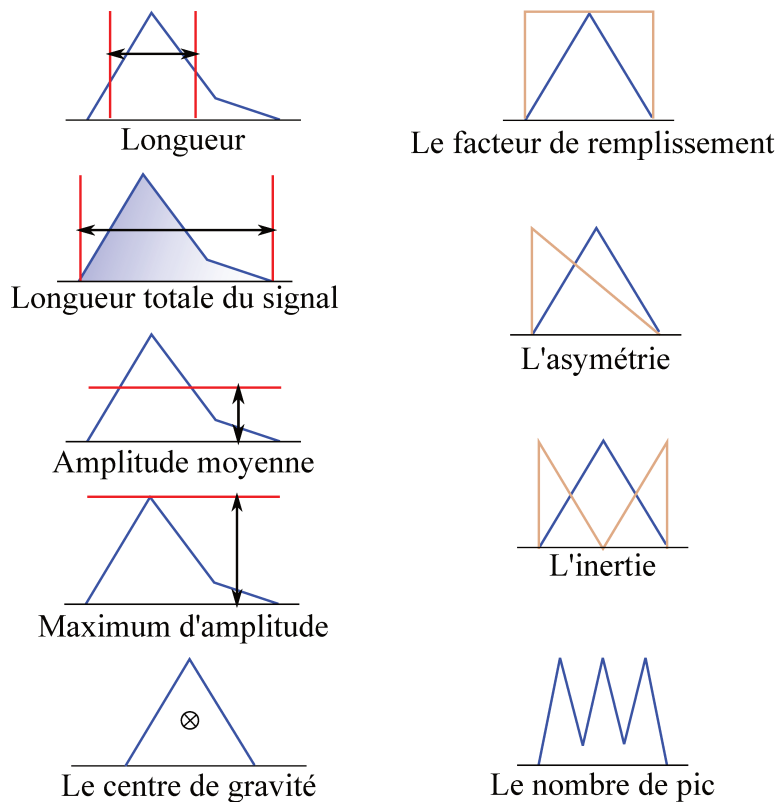


FIGURE 7.10 – Principe du scanning du Cytosense

1. La longueur brute est déterminée à partir du temps de passage entre les points à 50% du seuil maximal. Cette longueur brute est ensuite corrigée par l'application d'une courbe de correction qui a été déterminée à partir de considérations physiques

combinées avec les mesures.

2. Le total est la somme de tous les points mesurés au dessus du seuil de déclenchement.
3. Le maximum est la valeur maximale mesurée par le détecteur lors du passage de la particule.
4. La moyenne est égale à la somme divisée par le nombre de points de données.
5. L'inertie est définie comme étant le second moment de la forme d'impulsion. L'inertie donne une indication sur la répartition de l'aire du signal. Par exemple, une faible inertie signifie que l'aire du signal se situe principalement au centre.
6. Le centre de gravité se calcule en divisant le premier instant de la forme l'impulsion par le total.
7. Le facteur de remplissage entre 0 et 1 donne une indication sur la forme de l'impulsion. Par exemple, une facteur de remplissage proche de 1 signifie que le signal est très étroit.
8. L'asymétrie donne une indication sur la distribution du signal sur toute la longueur de la particule.
9. Le nombre de cellules donne une information sur le nombre de pics dans le profil.
10. Le TOF ("time of flight") correspond au temp de passage de la particule au-dessus du niveau de déclenchement.